



**INFLUÊNCIA DA FORMAÇÃO DE ZIRCONATO DE CÁLCIO NAS  
PROPRIEDADES DE BIOCERÂMICAS DE HIDROXIAPATITA  
REFORÇADA COM ZIRCÔNIA**

D. R. R. Lazar; S. M. Cunha; V. Ussui; N. B. de Lima; E. Fancio;  
A. C. D. Rodas; O. Z. Higa; A. H. A. Bressiani  
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 –CEP 05508-000 - São Paulo / SP  
E-mail: drlazar@ipen.br

**RESUMO**

*Compósitos à base de hidroxiapatita (HAp) e zircônia ( $ZrO_2$ ) são materiais de interesse para fabricação de implantes ósseos devido à excelente bioatividade da HAp e boas propriedades mecânicas proporcionada pela zircônia. Entretanto, o processamento desta cerâmica pode provocar a formação de fases secundárias, dentre as quais o zirconato de cálcio ( $CaZrO_3$ ). Considerando-se este aspecto, neste trabalho foram avaliadas as propriedades deste composto. Amostras cerâmicas de  $CaZrO_3$ , preparadas por reação no estado sólido, a partir de pós de zircônia, cálcia ou carbonato de cálcio, foram caracterizadas por difração de raios X, microscopia eletrônica de varredura, medidas de densidade pelo princípio de Archimedes e de dureza pelo método de impressão Vickers. O potencial citotóxico foi avaliado por testes *in vitro*, em que análises espectrofotométricas foram realizadas em extratos das amostras expostos à cultura celular. Os resultados obtidos foram comparados aos de cerâmicas de fosfatos de cálcio e compósito HAp- $ZrO_2$ .*

*Palavras-Chave: hidroxiapatita, zircônia; zirconato de cálcio; biocerâmicas; citotoxicidade*

## INTRODUÇÃO

A busca por alternativas que visam o reparo e reconstrução da estrutura óssea do corpo humano tem aumentado muito nos últimos anos em decorrência do aumento da expectativa de vida da população mundial. Sobretudo nos países desenvolvidos, onde este índice pode atingir 80 anos, doenças como a osteoporose ocasionam aumento de fraturas ósseas que devem ser rapidamente reparadas para preservar a qualidade de vida do idoso. Como consequência do desenvolvimento sócio-econômico aumentaram também as fraturas em indivíduos jovens provocados por acidentes automobilísticos, de trabalho e na prática de esportes <sup>(1-4)</sup>.

O uso mais intenso de materiais cerâmicos como implantes iniciou-se na década de 1970 com o emprego da alumina em próteses de cabeça de fêmur <sup>(5)</sup>. A aplicação da zircônia para esta mesma finalidade ocorreu, por sua vez, somente em 1985, dez anos após a descoberta do mecanismo de reforço por transformação de fases <sup>(6,7)</sup>. Assim como a alumina, a zircônia faz parte da primeira geração de implantes cerâmicos, classificados como materiais bioinertes / biotoleráveis, em que a interação com o tecido vivo é a menor possível. Na década de 1980 foi reconhecida a importância da interação do implante com o meio fisiológico, favorecendo a geração de tecido ósseo, comportamento observado nos materiais denominados bioativos e bioreabsorvíveis (segunda geração de implantes) <sup>(3)</sup>.

Dentre a classe de materiais bioativos e bioreabsorvíveis destacam-se os fosfatos de cálcio e, mais especificamente, a hidroxiapatita, (HAp), composto de fórmula  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , de grande semelhança química e cristalográfica à fase mineral dos ossos e dentes. Contudo, HAp sintética apresenta limitações quando comparada ao osso cortical que, por ser um material compósito, constituído por fibras de colágeno, apresenta melhor desempenho mecânico <sup>(4)</sup>. A adição de materiais bioinertes como a alumina e zircônia são alternativas para o reforço mecânico dessas cerâmicas. A formação de zirconato ou aluminato de cálcio, no entanto, pode ocorrer em condições convencionais de processamento cerâmico, ou seja, sinterização ao ar, sem aplicação de pressão externa <sup>(8-10)</sup>.

Tendo em vista que a influência da formação de zirconato de cálcio em implantes cerâmicos é um assunto ainda não elucidado, avaliou-se neste trabalho as características microestruturais, dureza e citotoxicidade deste material. Para esta finalidade as propriedades das cerâmicas de  $\text{CaZrO}_3$ , preparadas por reação no

estado sólido, foram comparadas às dos compósitos HAp-zircônia obtidos por co-precipitação e sinterização convencional ao ar.

## **PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL**

### **Preparação das cerâmicas de hidroxiapatita e de hidroxiapatita-zircônia**

Cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  PA, CAAL, Brasil), dihidrogeno fosfato de amônio ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  PA, CAAL, Brasil) e hidróxido de amônio (Ubq, Brasil) foram os reagentes utilizados para a síntese dos pós de hidroxiapatita (codificação HAp), considerando-se relação atômica estequiométrica ( $\text{Ca/P}=1,67$ ). O procedimento de precipitação, otimizado em trabalhos anteriores<sup>(10,11)</sup>, consistiu na adição de solução aquosa de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  0,2M em solução de  $\text{CaCl}_2$  0,5M, ajustando-se o pH da mistura em 10 com solução de hidróxido de amônio 5,5M. As reações foram conduzidas a 70°C por 1 hora e os precipitados obtidos submetidos à lavagem com água até teste negativo da presença de íons cloretos no filtrado, indicado pela reação com  $\text{AgNO}_3$ . Para evitar a presença de aglomerados fortes, os precipitados foram desidratados com etanol e butanol. Os grânulos formados foram desagregados em almofariz de ágata, mantidos em estufa a 80°C por 24 horas, calcinados a 800°C por 1 hora e submetidos à moagem em etanol por 16 horas. Os pós obtidos foram conformados por prensagem uniaxial e sinterizados a 1250°C por 1 hora. Por sua vez, o compósito hidroxiapatita-zircônia contendo 95% em massa de HAp (codificação 95H5ZY) foi preparado pela adição, sob agitação, de cloretos mistos de zircônio (IPEN, Brasil) e de ítrio (Aldrich, EUA) na suspensão de hidroxiapatita envelhecida por 24 horas, mantida em  $\text{NH}_4\text{OH}$  5,5 molar. Os procedimentos subseqüentes de tratamentos dos precipitados, secagem, calcinação, moagem e sinterização foram os mesmos descritos para a cerâmica de hidroxiapatita.

### **Preparação das cerâmicas de zirconato de cálcio**

Os pós de zirconato de cálcio ( $\text{CaZrO}_3$ ) foram preparados por duas rotas de reação no estado sólido: a partir de pós de zircônia preparados por precipitação de hidróxido e duas matérias-primas de cálcio: óxido de cálcio ( $\text{CaO}$ , PA, Nuclear, Brasil) e carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ , PA, Merck, Alemanha).

A precipitação de hidróxido de zircônio foi realizada pela adição de 1000mL de solução de oxiclreto de zircônio ( $[\text{ZrO}_2] = 40\text{g/L}$ ) em 500mL de solução de hidróxido de amônio 7 molar. Após filtração, etapas de lavagem com água e álcool etílico e

butílico, e destilação azeotrópica, os pós foram submetidos à secagem em estufa a 80°C por 24 horas e calcinação a 800°C por 1 hora.

Visando a obtenção de amostras de zirconato de cálcio, os pós de zircônia, óxido de cálcio ou carbonato de cálcio foram misturados em proporção estequiométrica, em moinho de bolas por 16 horas, em meio etílico. Este procedimento permitiu a preparação de duas misturas: zircônia + óxido de cálcio (CZ01) e zircônia + carbonato de cálcio (CZ02), sendo esta última calcinada a 800°C/1 hora. As pastilhas cerâmicas foram preparadas por prensagem uniaxial e sinterizadas na faixa de temperatura entre 1250 e 1550°C por 1 e 3 horas. As amostras foram codificadas considerando o insumo de cálcio e as condições de sinterização utilizadas. Assim sendo, a amostra CZ01-1250-1 foi preparada com CaO e sinterizada a 1250°C por 1 hora.

### **Caracterização das cerâmicas**

A caracterização das cerâmicas foi realizada por medidas de densidade aparente pelo princípio de Arquimedes, microscopia eletrônica de varredura, difração de raios X e ensaios de impressão Vickers (MicroVickers RS 5112,5114, Buehler) para determinação de dureza.

A análise quantitativa das fases cristalinas formadas nas amostras sinterizadas HAp e 95H5ZY foi realizada pelo método de refinamento de Rietveld dos dados obtidos por difração de raios X, utilizando-se o programa DBWS-9807. Os dados foram coletados na faixa de  $2\theta$  entre 5 e 80°, com passo angular de 0,02° e tempo de contagem de 12 segundos.

O ensaio de biocompatibilidade *in vitro* utilizado no presente trabalho foi realizado com base no procedimento descrito na norma ISO 10993-5<sup>(12)</sup>. Utilizou-se como controle positivo uma solução fenólica a 0,3% e como negativo um pó cerâmico de alumina de alta pureza. Os extratos das amostras cerâmicas previamente esterilizadas (radiação gama 25 kGY) foram mantidos em contato com meio de cultura RPMI 1640 por 48 h em estufa a 37° C e com atmosfera úmida de 5% de CO<sub>2</sub>. A análise espectrofotométrica foi conduzida em uma microplaca de cultura celular contendo diluições crescentes (6,25; 12,5; 25; 50; 100%) do extrato dos materiais, os materiais de controle e a suspensão de células de ovário de hamster chinês (CHO-K1) nos poços. Feito isso, foi realizada a incubação a 37° C da

microplaca sob atmosfera úmida de 5% de CO<sub>2</sub>. Decorridas 72 h a mistura de corantes foi adicionada aos poços testes para avaliação da viabilidade celular.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de composição de fases, apresentados na Tabela 1, indicam que as condições utilizadas neste trabalho visando a obtenção de hidroxiapatita, conduziram à obtenção de hidroxiapatita deficiente em cálcio durante a síntese dos pós e, posteriormente, à cerâmica bifásica HAp -  $\beta$ -TCP na etapa de sinterização. Por sua vez, o processamento cerâmico adotado para o compósito co-precipitado com íons de zircônio e ítrio, propiciou a formação de zirconato de cálcio, não sendo observada a presença de zircônia estabilizada na fase tetragonal, fase esta que promoveria o reforço mecânico do material. Este comportamento, já ressaltado na literatura <sup>(8,9,11)</sup>, pode ser minimizado com o uso de técnicas de prensagem a quente <sup>(13)</sup> e sinterização com arco de plasma (*spark plasma sintering*) <sup>(14)</sup>. Neste caso, a liberação de água da estrutura da hidroxiapatita é impedida, não ocorrendo a formação de vacâncias de oxigênio que favorecem a decomposição deste fosfato de cálcio.

A partir dos valores de densidade relativa da Tabela 2, nota-se a redução de densidade da amostra 95H 5ZY, quando comparada à amostra HAp, conseqüência, provavelmente da liberação de vapor d'água durante a etapa de sinterização ao ar. As superfícies de fratura dessas duas amostras são mostradas nas micrografias da Figura 1.

Os resultados de difração de raios X da Figura 2 indicam que as condições experimentais adotadas para preparação das amostras de zirconato de cálcio foram adequadas. A fase predominante nas duas séries (CZ01 e CZ02) é o zirconato de cálcio de estrutura ortorrômbica (JCPDS 35-0645) com reflexões mais intensas em  $2\theta$  31,520 e 45,162 graus. Picos de baixa intensidade relativos à zircônia cúbica (JCPDS 49-1642) foram observados apenas nas amostras CZ01. Não foram identificados picos relativos ao óxido de cálcio.

Tabela 1 - Composição de fases cristalinas das cerâmicas à base de hidroxiapatita.

Amostra	Composição das fases (% em massa)		
	HAp	$\beta$ -TCP	CaZrO <sub>3</sub>
HAp	83,1 ± 0,6	16,9 ± 1,2	—
95H 5ZY	76,9 ± 0,3	14,8 ± 0,1	8,3 ± 0.1

Tabela 2 – Densidade relativa das cerâmicas à base de hidroxiapatita e zirconato de cálcio.

Amostra	Densidade relativa (% $\rho_t$ )
HAp *	98,4 ± 0,6
95H 5ZY *	89,4 ± 0,6
CZ01-1250-1	67,2 ± 0,4
CZ01-1250-3	69,8 ± 0,7
CZ01-1350-1	75,9 ± 0,2
CZ01-1550-3	94,8 ± 0,7
CZ02-1250-1	47,1 ± 0,4
CZ02-1250-3	49,9 ± 0,9
CZ02-1350-1	52,3 ± 0,2
CZ02-1550-3	60,3 ± 0,2

\* Valores calculados considerando-se a composição de fases apresentada na tabela 1  
 Densidades teóricas:  $\rho_t \text{ HAp} = 3,14 \text{ g.cm}^{-3}$ ;  $\rho_t \text{ 95H5ZY} = 3,22 \text{ g.cm}^{-3}$ ;  $\rho_t \text{ CZ} = 4,61 \text{ g.cm}^{-3}$

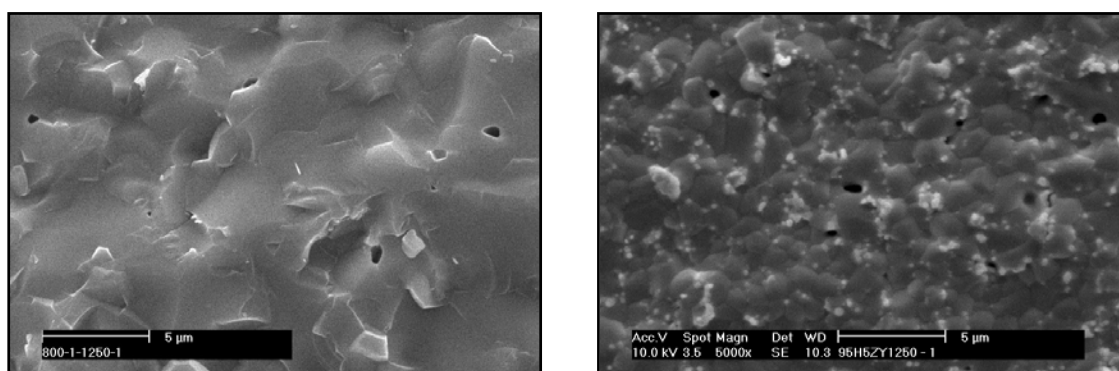


Figura 1 – Micrografias, obtidas por microscopia eletrônica de varredura, de superfícies de fratura de cerâmicas à base de hidroxiapatita: (a) HAp e (b) 95H5ZY.

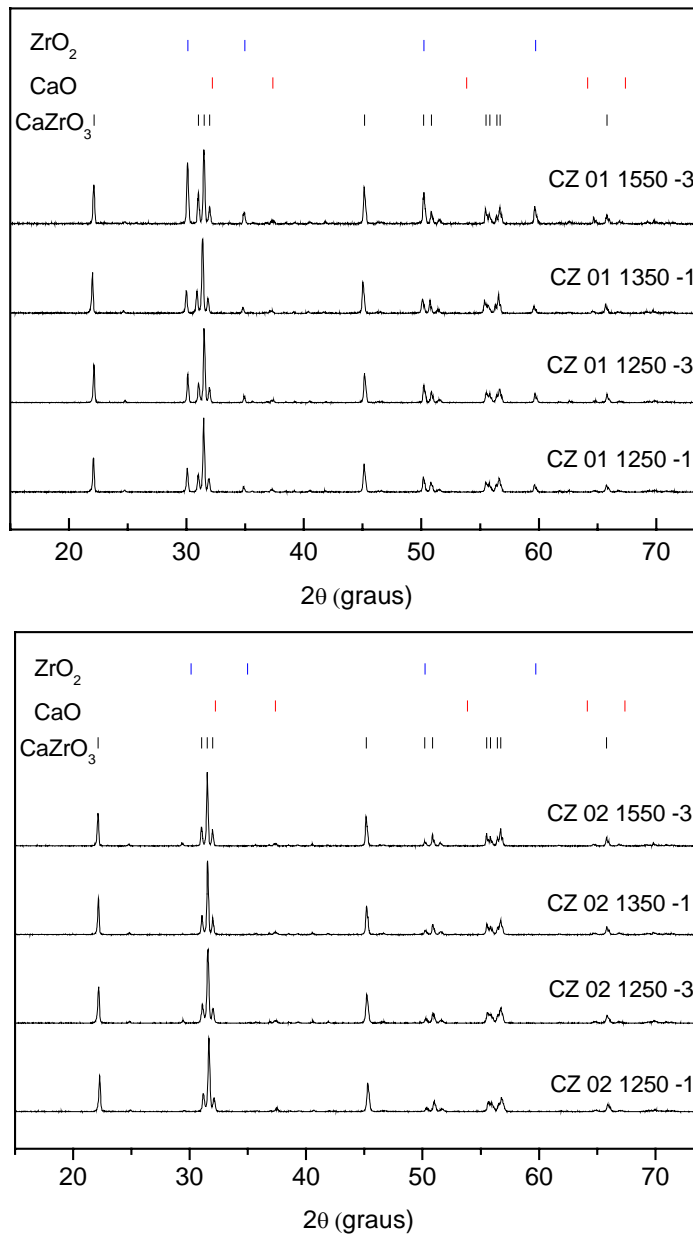


Figura 2 – Difratomogramas de raios-X relativos às amostras de zirconato de cálcio.

Observando-se, na Tabela 2, os valores de densidade relativa das cerâmicas de zirconato de cálcio, verifica-se que a densificação desse material necessita de temperaturas e tempos elevados de sinterização, consequência da rota adotada neste trabalho (reação em estado sólido). Nota-se também que o uso de carbonato de cálcio como insumo de partida não favorece a densificação da cerâmica pois a decomposição deste pode ser incompleta durante a calcinação, provocando a liberação de  $\text{CO}_2$  durante a sinterização. A presença de porosidade nas cerâmicas de zirconato de cálcio obtidas em menores temperaturas de sinterização é confirmada nas micrografias da Figura 3.

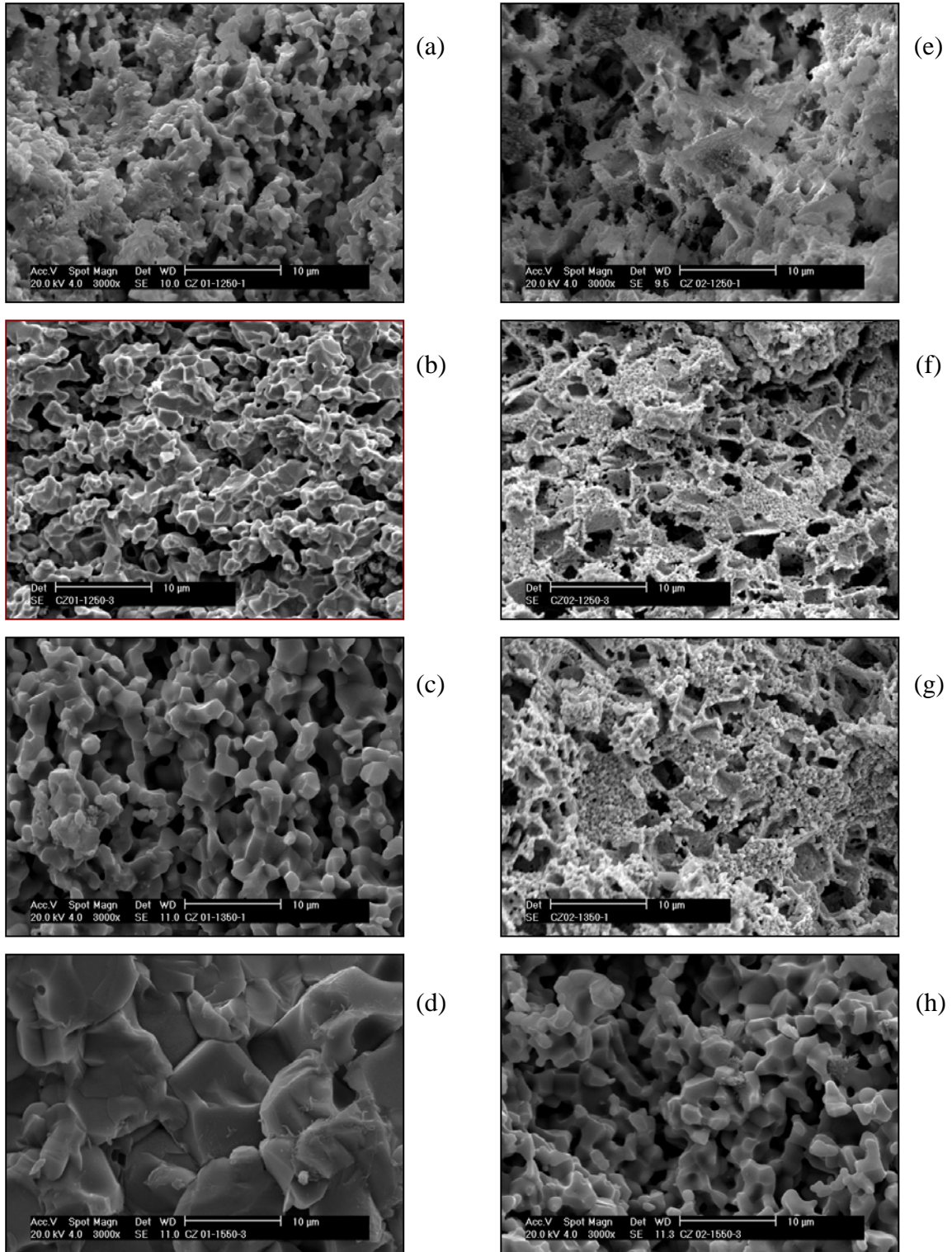


Figura 3 – Micrografias, obtidas por microscopia eletrônica de varredura, de superfícies de fratura de cerâmicas de zirconato de cálcio obtidas em diferentes condições de sinterização:(a) CZ01 1250-1,(b) CZ01 1250-3, (c) CZ01 1350-1, (d) CZ01 1550-3, (e) CZ02 1250-1,(f) CZ02 1250-3, (g) CZ02 1350-1, (h) CZ02 1550-3.

Na Tabela 3 são apresentados os valores de dureza das cerâmicas avaliadas. Após testes preliminares fixou-se a carga 300g para a amostra HAp e 3 Kg para as demais. A determinação da tenacidade à fratura nas amostras submetidas ao ensaio de impressão Vickers não foi possível devido à dificuldade de visualização das trincas e colapso de algumas amostras durante o ensaio. Verifica-se que a presença de carbonato de cálcio na amostra 95H5ZY reduziu o valor de dureza, comparativamente à amostra HAp. Este resultado pode ser explicado pelo baixo valor de dureza da amostra de zirconato de cálcio sinterizada a 1250°C por 1 hora, valor este compatível com o de dureza do osso cortical <sup>(15)</sup>. Somente com a eliminação da porosidade, condição esta obtida em temperaturas mais elevadas de sinterização, é possível a elevação dos valores de dureza (caso da amostra CZ01-1550-3).

Tabela 2 –Dureza das cerâmicas à base de hidroxiapatita e de zirconato de cálcio, determinada por impressão Vickers.

Amostra	Dureza (GPa)
Osso cortical <sup>(15)</sup>	0,6
HAp	3,0 ± 0,1
95H 5ZY	2,5 ± 0,6
CZ01-1250-1	0,7 ± 0,2
CZ01-1550-3	4,6 ± 0,8
CZ02-1550-3	0,3 ± 0,1

Os resultados apresentados na Figura 4 referem-se ao teste de citotoxicidade das amostras cerâmicas estudadas, assim como dos controles positivo e negativo.

O índice de citotoxicidade ( $IC_{50(\%)}$ ) corresponde à concentração de extrato do material que provoca a morte de 50% da população das células. Conforme previsto, o controle positivo (Fenol 0,3%) produz efeito citotóxico, sendo neste caso ( $IC_{50(\%)}=62$ ). Por sua vez, o controle negativo (pó de alumina) não apresenta efeito citotóxico, ( $IC_{50(\%)}>100$ ). As amostras cerâmicas avaliadas também não apresentaram efeito citotóxico. Assim sendo, testes in vivo podem ser programados com o intuito de verificar as interações implante-tecido.

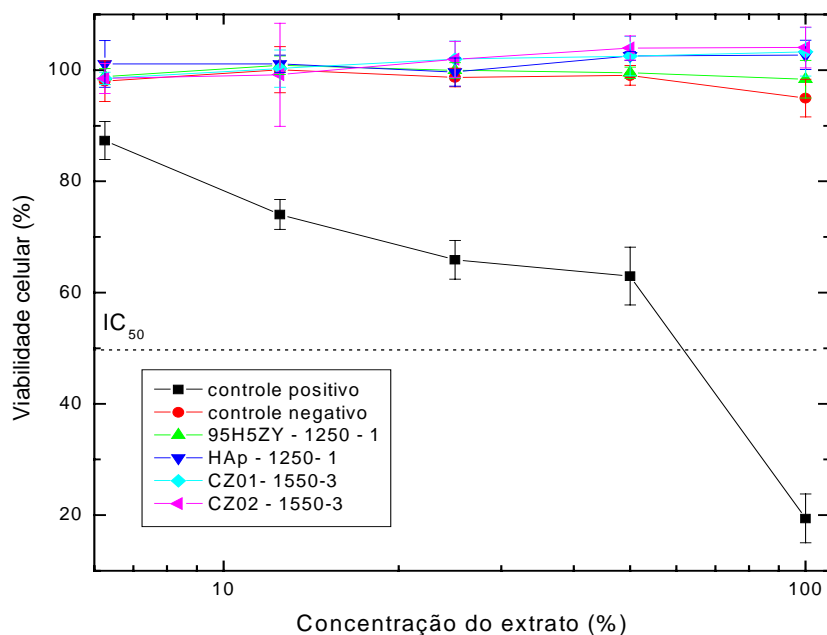


Figura 4: Curvas de viabilidade celular obtidas no teste de citotoxicidade dos extratos das cerâmicas à base de hidroxiapatita, de carbonato de cálcio e controles positivos e negativos.

## CONCLUSÕES

A rota de síntese no estado sólido mostrou-se adequada para preparação de cerâmicas de zirconato de cálcio. Por sua vez, a caracterização física deste material mostrou que a presença deste composto em compósitos hidroxiapatita – zircônia contribui para a formação de porosidade e redução dos valores de dureza, uma vez que o compósito é obtido em temperaturas de sinterização relativamente baixas (1250°C). Contudo, os ensaios *in vitro* indicaram que cerâmicas de zirconato de cálcio não apresentam efeito citotóxico, podendo estar presente no implante na forma de fase secundária.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. VALLET-REGÍ, M. Ceramics for medical applications. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, p. 97-108, 2001.
2. KAWACHI, E. Y.; BERTRAN, C. A.; DOS REIS, R. R.; ALVES, O. L. Bioceramics: Tendências e perspectivas de uma área multidisciplinar. *Quim. Nova*, 23, n.4, 518-522, 2000.
3. SALINAS, A. J.; VALLET-REGÍ, M. Evolution of ceramics with medical applications. *Z. Anorg. Chem.*, p. 1762-1773, 2007.
4. KALITA, S. J.; BHARDWAJ, A.; BHATT, N. A. Nanocrystalline calcium phosphate in biomedical ceramics. *Mater. Sci. Eng.*, C27, p. 441-449, 2007.
5. HULBERT, S.F. The use of alumina and zirconia in surgical implants. In: HENCH, L.L.; WILSON, J. (Eds) *An introduction to bioceramics. Advanced Series in Ceramics – v.1*. World Scientific. Singapore, 1993. p. 25-40.
6. PICONI, C.; MACCAURO, G. Zirconia as ceramic biomaterial. *Biomaterials*, v.20, p. 1-25, 1999.
7. GARVIE, R.C.; HANNINK, R.H.; PASCOE, R.T. Ceramic steel? *Nature*, v.258, p. 703-704, 1975.
8. VISWANATH, B.; RAVISHANKAR, N. Interfacial reactions in hydroxyapatite / alumina nanocomposites. *Scripta Materialia*, 55, p. 863-866, 2006.
9. KUMAR, R.; CHEANG, P.; KHOR, K.A. Radio frequency (RF) suspension plasma sprayed ultra-fine hydroxyapatite (HA)/zirconia composite powders. *Biomaterials*, v.24, p.2611-2621, 2003.
10. CUNHA, S. M. ; USSUI, V. ; FANCIO, E. ; LIMA, N. B. ; BRESSIANI, A. H. A. Effect of calcination conditions on phase formation of calcium phosphates ceramics synthesized by homogeneous precipitation. *Mater. Sci. Forum*, v. 530-531, p. 612-617, 2006
11. LAZAR, D.R.R.; CUNHA, S. M.; USSUI, V.; FANCIO, E.; DE LIMA, N.B.; BRESSIANI, A.H.A. Influence of synthesis route on phase formation and sinterability of hydroxyapatite-zirconia composites. In: Sixth International Latin-American Conference on Powder Technology (PTECH 2007), Buzios, RJ, Brazil, 7-10 November, 2007. *Proceedings...* CD-ROM - Ref. 20-19.
12. ISO document 10993-5 Biological evaluation of medical devices, Part 5, Tests for cytotoxicity: in vitro methods, 1992.
13. AHN, E. S.; GLEASON, N.J.; YING, J. Y. The effect of zirconia reinforcing agents on the microstructure and mechanical properties of hydroxyapatite-based nanocomposites. *J. Am. Ceram. Soc.*, v. 88, p. 3374-3379, 2005.
14. MIAO, X.; CHEN, Y.; GUO, H.; KHOR, K. A. Spark plasma sintered hydroxyapatite-yttria stabilized zirconia composites. *Ceram. Int.*, v. 30, n.7, p. 1793-1796, 2004.
15. OYEN, M. L. Nanoindentation hardness of mineralized tissues. *J. Biomech.*, v.39, p. 2699-2702, 2006.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem aos colegas Joana D. Andrade, Celso V. de Moraes, Nildemar A. Ferreira, Glauson A. Machado e Rene R. de Oliveira pelo auxílio na realização do trabalho experimental.

## **INFLUENCE OF CALCIUM ZIRCONATE FORMATION ON THE PROPERTIES OF ZIRCONIA-REINFORCED HYDROXYAPATITE BIOCERAMICS**

### **ABSTRACT**

*Composites based on hydroxyapatite (HAp) and zirconia ( $ZrO_2$ ) are important materials for fabrication of bone implants due to the excellent bioactivity of hydroxyapatite and good mechanical properties of zirconia. Meanwhile, the ceramic processing can form second phases such as calcium zirconate ( $CaZrO_3$ ). In this sense, it was evaluated in this work the properties of this compound. Calcium zirconate ceramic samples were prepared by solid state reaction from zirconia, calcia or calcium carbonate. Powders were characterized by X-ray diffraction, scanning electron microscopy, apparent densities measurements by Archimedes principle and Vickers indentation test for hardness determination. The citotoxicity evaluation was performed by in vitro tests where sample extract dilutions exposed to a cell culture were analysed by spectrophotometry. Calcium phosphate ceramics and HAp- $ZrO_2$  composites were also analysed for comparison purposes.*

*Key-words: Hydroxyapatite, zirconia, calcium zirconate; bioceramics; citotoxicity.*