

OBTENÇÃO DE CERÂMICAS POROSAS DE ALUMINA-ZIRCÔNIA PELO MÉTODO DA RÉPLICA RECOBERTAS COM FOSFATO DE CÁLCIO

Silva, A.D.R.*; Rigoli, W.R.*; Osiro, Denise*; Pallone, E.M.J.A.*; Lobo, A.O.**

*FZEA – USP- Pirassununga-SP

**Univap- São José dos Campos-SP
adinizrs@yahoo.com.br

Resumo

Os biomateriais, empregados na substituição óssea, dentre eles as biocerâmicas porosas, são muito utilizados como estrutura de suporte para formação e reparação óssea. As biocerâmicas porosas, são utilizadas por apresentarem características como biocompatibilidade, alta porosidade, morfologia de poros adequada que conferem resistência mecânica e induzem o crescimento ósseo. Neste trabalho, foram obtidos corpos porosos de alumina contendo 5% em volume de inclusões de zircônia, produzidos pelo método da réplica. Esses corpos porosos tiveram sua superfície tratada quimicamente com ácido fosfórico e foram recobertos, com fosfato de cálcio. Para esse recobrimento, foi utilizado o método biomimético, em solução de SBF 5 X (Simulated Body Fluid - fluido corpóreo simulado). O período de incubação foi de 14 dias e pH inicial de 6,1. Os corpos porosos foram caracterizados utilizando as técnicas: porosidade aparente, ensaios de compressão axial, microtomografia, microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de energia dispersiva (EDS), difratometria de Raio X (DRX) e medidas do pH da solução de SBF. Os resultados obtidos mostram um material com morfologia de poros adequada para aplicação como biomaterial e o favorecimento da formação de fases de fosfatos de cálcio sobre a superfície material, em um tempo de incubação reduzido.

Palavras-chave: método da réplica; biocerâmicas porosas; recobrimento biomimético.

Introdução

As biocerâmicas porosas utilizadas na substituição óssea como estrutura de suporte para formação e reparação, também são denominadas *scaffolds* (suportes). São estruturas tridimensionais, porosas que atuam como matrizes de substituição, proporcionando um ambiente e arquitetura específicos para o desenvolvimento e regeneração do tecido ósseo. São utilizados como implantes promovendo adesão e o crescimento celular agindo ainda como um transportador ou modelo para as células ósseas ^{1; 2}.

Os *scaffolds* cerâmicos bioinertes não apresentam ligação química e nem interação biológica entre o tecido e o implante. Uma alternativa muito utilizada para

que ocorra interação biológica na interface implante-tecido é transformar a superfície desses materiais em bioativa. Isso somente é alcançado quando essas cerâmicas bioinertes são recobertas com um material bioativo, como por exemplo, a fosfato de cálcio, material que faz as ligações entre o osso hospedeiro e o implante permitindo uma eficaz regeneração da parte substituída³. A utilização de cerâmicas bioinertes vem sendo utilizadas como suporte por apresentarem melhores propriedades mecânicas e vem sendo recobertas com um material bioativo, sendo capaz de ligarem-se quimicamente a estrutura depositada ⁴.

Dentre esses materiais, está a matriz de alumina com inclusões de zircônia que sob condições fisiológicas, são praticamente inertes, mantendo-se essencialmente inalterados. Assim, a adição de fosfatos de cálcio, na forma de recobrimento, faz com que esses biomateriais se tornem bioativos e amplamente reconhecidos com potencial na substituição e restauração de tecidos ósseos⁵.

As cerâmicas porosas devem ter poros com tamanho que afetam diretamente a regeneração óssea em consequência, afetam a adesão celular e o crescimento interno do tecido ósseo. No entanto poros interligados são mais propensos a formar osso devido a colonização, neovascularização (formação de novos capilares) e o crescimento de células ósseas (migração e adesão dos osteoblastos e osteoclastos)⁶. Os elementos celulares remodelam continuamente o osso de modo que permitam o seu crescimento e a sua adaptação a tensões de cargas aplicadas ⁷.

Uma forma de se conseguir uma cerâmica porosa é pelo método da réplica ou método da esponja polimérica. Nesse método há um controle do tamanho e morfologia dos poros através da esponja e da quantidade de aditivos utilizados, onde é possível obter materiais altamente porosos, com poros arredondados e interconectados, o que favorece sua aplicação como implante. Para a obtenção de formas complexas, com poros de diferentes diâmetros interconectados e densidades variadas deve-se utilizar um processamento adequado e a otimização de propriedades físico-químicas. Nessa direção, é necessário o desenvolvimento de uma estrutura bioativa para que ocorra interação biológica na interface implante-. Isso somente é alcançado quando o material é recoberto com um material bioativo, como por exemplo, o fosfato de cálcio. Quanto mais eficiente o material for nesse aspecto, mais rápido será o crescimento ósseo e sua ligação com o osso recentemente formado ⁸.

O método biomimético foi introduzido por Abe e colaboradores, o qual permite recobrir praticamente qualquer tipo de substrato com uma camada uniforme de hidroxiapatita, similar à biológica⁹. Este método é realizado com a imersão do substrato a ser recoberto, em uma solução denominada *SBF* (*Simulated Body Fluid*) que apresenta composição química, semelhantes ao plasma sanguíneo e temperatura similar à do corpo humano. Essa concentração iônica e pH devem ser similares aos fluidos corpóreos, para geração dos núcleos que proporcionarão o crescimento apropriado de uma camada de apatita.

Diversos trabalhos mostraram que a utilização da solução de *SBF* 5X (*Simulated Body Fluid* - fluido corpóreo simulado), mais concentrada pelo período de incubação de 14 dias, podendo ser acompanhada pela medida do pH, ocorre um aumento na concentração de Ca, nos primeiros 7 dias e, próximo aos 14 dias, ocorrendo a formação induzida do PO_4^{3-} , que induz o aparecimento da apatita. O aumento do pH ocorre devido a deposição nucleada de apatita por precipitação na superfície dos corpos porosos onde foi depositada. A solução apresenta-se instável, sendo, a precipitação reabsorvida, semelhante a apatita biológica do osso¹⁰.

Nesse trabalho, foram obtidas cerâmicas porosas de alumina contendo 5% em volume de inclusões de zircônia, produzidas pelo método da réplica e, recobertas usando o método biomimético com fosfato de cálcio, visando a sua utilização como implante ósseo.

Materiais e métodos

Para a obtenção dos corpos porosos, foi utilizada alumina AKP-53 produzida pela Sumitomo Chemical, Japão, com tamanho médio de partículas em torno de 0,25 μm , área superficial específica de 13,6 m^2/g e pureza de 99,995 % e zircônia nanométrica parcialmente estabilizada (3 % mol yttria), produzida pela Nanostructured & Amorphous Materials Inc. (MA-USA), com tamanho médio de partículas em torno de 30-65 nm, área superficial 19,8 m^2/g e pureza de 99,9 %. A preparação dos corpos porosos de alumina contendo 5% de inclusões nanométricas de zircônia, foram preparadas usando mistura de suspensões, na proporção de 5% em volume de zircônia, baseado em trabalhos anteriores^{11; 12}.

Após a mistura dos pós de alumina e zircônia, foi preparada uma barbotina em moinho de bolas utilizando usando água deionizada e o poliácrlato de amônia

durante 24 horas. Após esse período, foram adicionados os compostos apresentados na Tab. 1, e levado ao moinho de bolas por mais uma hora.

Tab. 1 Percentagem utilizada de cada composto em relação à massa total produzida

Compostos utilizados	Percentagem utilizada de cada composto (%)
Alumina-Zircônia	55
Poliacrilatos de amônia	1,43
Glicerina	3,03
Polietileno glicol	0,70
Ácido oleico	0,30
Solução CMC	0,83
Solução PVA	14,00
Água deionizada	24,72

Após mistura a esponja no tamanho desejado foi imersa na barbotina e passada por uma calandra para que o excesso da suspensão cerâmica fosse retirado. Esse processo foi repetido por três vezes e, em seguida, a esponja impregnada foram secas em estufa por 24 horas. Posteriormente foram calcinadas sob taxa aquecimento de 0,5°C/min até atingir 600°C/1h, e sinterizadas sob taxa de aquecimento de 5°C/min até 1500°C/1h.

A superfície dos corpos porosos de alumina-zircônia foram tratadas quimicamente com solução de H₃PO₄ 5M, à temperatura de 90°C durante 4 dias, em banho termostático e sob refluxo ¹¹.

Após o tratamento químico, os corpos porosos foram recobertos através do método biomimético, para a deposição de camadas de fosfato de cálcio. Para isso foram imersos em solução de *SBF 5X* por um período de 14 dias baseado na norma ISO-FDIS23317, com tratamento em incubadora de bancada a 36,5°C, a solução *SBF 5X* foi preparada usando os componentes apresentados na Tab.1^{10; 13}.

Tab. 1 - Representação dos componentes e quantidades utilizadas para a produção do *SBF (5X)* ¹³.

Componente	NaCl	MgCl ₂ .6H ₂ O	CaCl ₂ .2H ₂ O	Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	NaHCO ₃	
Quantidade (g/L)	40	1,52	1,84	0,89	1,76	

A caracterização dos corpos porosos foi realizada através da porosidade aparente, pelo método de imersão baseado no Princípio de Arquimedes ¹⁴. A resistência a compressão axial foi realizada em corpos porosos, preparados na forma cilíndrica e ensaiados usando pastilhas de aço fixados, para promove apoio em superfície plana, com taxa de compressão de 1,5 mm/min, em uma máquina

universal de ensaios servo-hidráulica, modelo 370.02, fabricante MTS *Landmark*. Para analisar a distribuição de poros, dos corpos porosos sem nenhum tratamento químico, foi utilizada a microtomografia computadorizada de raios X (μ CT) em um Microtomógrafo de Raios-X Sky Scan 1172). A razão Ca/P, foi obtida utilizando um microscópio eletrônico de varredura, modelo TM-3000, Hitachi Japão com espectroscopia de energia dispersiva (EDS) para mapear os elementos químicos e suas proporções presentes na superfície do recobrimento.

Para a caracterização das fases formadas de fosfato de cálcio, foi utilizado a difratometria de raio X em equipamento da marca Rigaku modelo Miniflex 600, com velocidade de varredura de $0,05^\circ$.

A medida do pH feita em cada recipiente a qual continha uma amostra antes da troca da solução de *SBF*, ocorrida a cada 48 horas. Essa análise é feita para o controle da saturação do fosfato de cálcio, semelhante à apatita do osso ¹⁵. Foi utilizado o pHmetro WTW, modelo pH3210.

Resultados e discussões

A porosidade aparente, dos corpos porosos foi de $69,62\% \pm 0,03$ antes do recobrimento. Valores próximos a estes foram conseguidos após o recobrimento com tempo de incubação de 14 dias onde, foi encontrado $68,04\% \pm 0,06$. É previsto, essa pequena variação da porosidade devido a formação dos cristais de fosfato de cálcio, ocorrido pelo fechamento dos poros.

Os ensaios de resistência mecânica através da compressão axial foram de $6,59 \pm 0,347$ MPa, comparáveis ao tecido ósseo esponjoso (poroso), que variam de 2 a 12 MPa, porém, os corpos ensaiados são altamente porosos $69,62\% \pm 0,03$, sem o recobrimento, o que contribui para o valor obtido de resistência mecânica ¹⁶. No trabalho de Liu (2005), com corpos porosos de alumina, o ensaio resultou nos seguintes resultados: 5,5 – 7,5 MPa¹⁷.

A Figura 1 (a) e (b), apresenta, respectivamente imagem obtido por microtomografia e distribuição de tamanho de poros obtidas pela mesma técnica. Observa-se na distribuição de tamanhos de poros, sendo eles com todas as dimensões, numa ampla faixa entre 10 a 1540 μ m, sendo sua maioria, concentrada de 74,5 a 112 μ m, onde têm-se 23 % e de 40 a 74,5 μ m constando 16,5 % 40 a 70 μ m. Nas regiões de 50-100 μ m ocorre crescimento de osteóides e osteointegração,

100-200 μm , ocorre proliferação de osteoblastos, de 200-300 μm ocorre a osteocondução e maiores que 300 μm ocorre crescimento de osso, vascularização, migração e transporte, como visto em diversos trabalhos, sendo encontrado no corpo poroso, essa ampla faixa de distribuição de tamanho de poro ^{6; 18}.

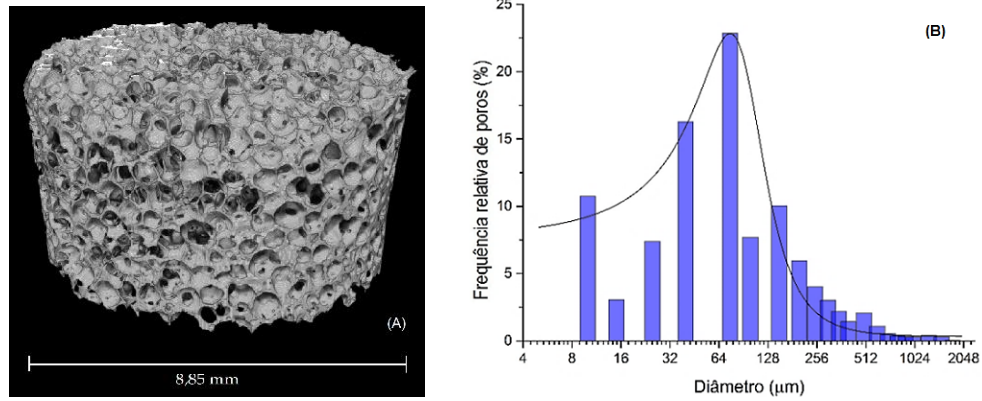


Figura 1 – (A) Figura representando a imagem em 3D, obtida pela técnica de microtomografia. (B) Gráfico representando a distribuição de poros dos corpos porosos de $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-ZrO}_2$.

A Figura 1Figura 2 (A), mostra o difratograma realizado nos corpos porosos e suas fases encontradas e, na Figura 2 (B) destaca a região selecionada do difratograma, podendo observar a formação de diversas fases de fosfato de cálcio. É destacado, α -TCP no plano (511) e/ou β -TCP no plano (02 10), sendo também encontrado a fase β -TCP no plano (128). Também, foi possível distinguir o crescimento de cristais das fases de TTCP, nos planos (-132) e (-212). No plano (121) ocorreu a formação de hidroxiapatita (HA) com menor percentagem de formação. A relação de porcentagem foi encontrada através do *fitting* realizado, utilizando no cálculo percentual, a área sob a curva destacada de cada formação de fase, no programa OriginPro 8.0 e está descrita, na Tab.4.

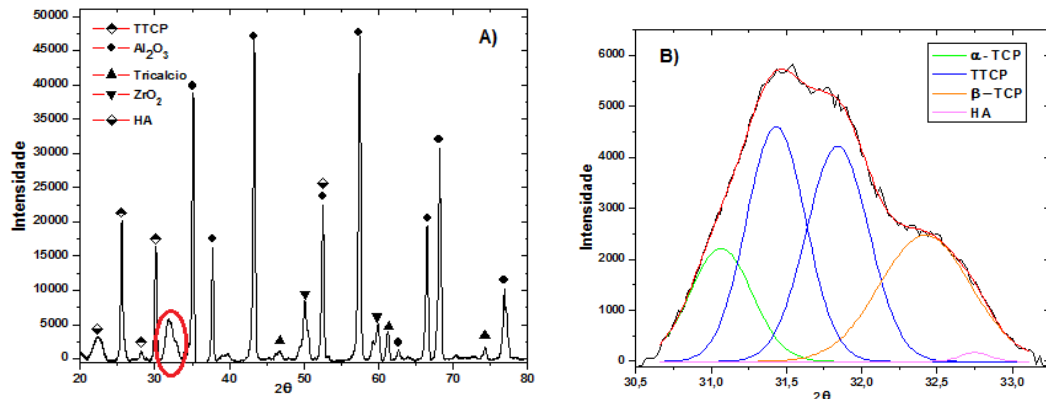


Figura 2 – (A) Difratogramas de Raios-X dos corpos porosos recobertos de Al-Zr, (B) Região onde encontrou-se maior quantidade de fases de fosfato de cálcio, na superfície dos corpos porosos.

Tab. 2 - Relação das fases encontradas, suas referências cristalográficas e a porcentagem encontradas através da técnica de difratometria de Raio-X e o fitting realizado através do Origin.

Amostra	2θ	Referências Cristalográficas	Porcentagem (%)	Fase encontrada
Al-Zr	31,24° /31,03°	(511)/(02 10)	15,29	α-TCP/β-TCP
	31,80°	(-132)	29,96	TTCP
	32,37°	(-212)	29,17	TTCP
	32,49°	(128)	24,99	β-TCP
	33,04°	(121)	0,58	HA

Através dos resultados obtidos pelo EDS, com período de incubação de 14 dias, resultou em $1,87 \pm 0,06$, a razão Ca/P. Essa razão é dada para fases dos cristais de fosfato tetracálcico (TTCP), encontradas também na análise de DRX ^{19; 20}.

Teste feitos anteriormente mostraram que em 14 dias ocorre a formação de uma camada de apatita devido a precipitação do fosfato de cálcio carbonatado ¹⁵. Esta descoberta mostra-se muito atraente para novos estudos em regeneração do tecido ósseo, devido sua bioatividade encontrada a partir desse tempo de incubação. Como apresentado na Figura 3, o aumento do pH ocorre devido a deposição nucleada de apatita por precipitação na superfície dos corpos porosos onde foi depositada. A solução apresenta-se instável, sendo, a precipitação reabsorvida, semelhante a apatita biológica do osso.

O resultado encontrado confirmou a estabilidade que os valores de pH permaneceram praticamente constantes depois de 7 dias. Isso ocorre devido a troca iônica de Ca^{2+} com H^+ e H_3O , como visto em diversos trabalhos ^{15; 21; 22}.

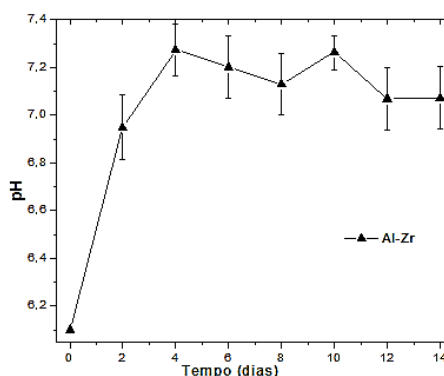


Figura 3 - Gráfico representando a medida de pH realizada a cada 48h nas soluções dos corpos porosos de Al-Zr.

Conclusão

Através dos resultados obtidos pôde-se ressaltar a facilidade da produção de corpos porosos através do método da réplica, pois, apresenta uma ampla faixa de porosidade, estrutura de célula aberta, alta permeabilidade semelhante e resistência mecânica próxima do osso que identifica a possibilidade de aplicação desse corpo poroso como biomaterial.

O recobrimento utilizando solução de *SBF* pelo método biomimético com período de incubação de 14 dias, possibilitou a formação de diferentes fases de fosfato de cálcio sendo identificadas através das análises de difratometria de Raio - X bem como a razão Ca/P, pela espectroscopia de energia dispersiva (EDS). O período de incubação de 14 dias, apresentou-se eficiente como apresentado nos resultados das medidas de pH.

Bibliografia

- 1 FENG, P. et al. Characterization of mechanical and biological properties of 3-D scaffolds reinforced with zinc oxide for bone tissue engineering. **PloS one**, v. 9, n. 1, p. e87755, 2014. ISSN 1932-6203.
- 2 CROTEAU, S. et al. Bone morphogenetic proteins in orthopedics: from basic science to clinical practice. **Orthopedics**, v. 22, n. 7, p. 686-695, 1999. ISSN 0147-7447.
- 3 SUBIA, B.; KUNDU, J.; KUNDU, S. **Biomaterial scaffold fabrication techniques for potential tissue engineering applications**. INTECH Open Access Publisher, 2010. ISBN 953307079X.
- 4 CROVACE, M. C. Obtenção de estruturas porosas altamente bioativas via sinterização do Biosilicato. 2010.
- 5 DENRY, I.; KELLY, J. R. State of the art of zirconia for dental applications. **Dental materials**, v. 24, n. 3, p. 299-307, 2008. ISSN 0109-5641.
- 6 SHAO, R. et al. Porous hydroxyapatite bioceramics in bone tissue engineering: current uses and perspectives. **Journal of the Ceramic Society of Japan**, v. 123, n. 1433, p. 17-20, 2015. ISSN 1882-0743.
- 7 COSTA, H. S. et al. Morphological, mechanical, and biocompatibility characterization of macroporous alumina scaffolds coated with calcium phosphate/PVA. **Journal of Materials science**, v. 43, n. 2, p. 510-524, 2008. ISSN 0022-2461.

- 8 SEPÚLVEDA, P. et al. Hidroxiapatita porosa produzida através do gelcasting de espumas visando aplicações biomédicas. **Cerâmica**, 2014. ISSN 0366-6913.
- 9 ABE, Y.; KOKUBO, T.; YAMAMURO, T. Apatite coating on ceramics, metals and polymers utilizing a biological process. **Journal of materials science: Materials in medicine**, v. 1, n. 4, p. 233-238, 1990. ISSN 0957-4530.
- 10 SIQUEIRA, I. A. et al. In Vitro and in Vivo Studies of Novel Poly (d, l-lactic acid), Superhydrophilic Carbon Nanotubes, and Nanohydroxyapatite Scaffolds for Bone Regeneration. **ACS applied materials & interfaces**, v. 7, n. 18, p. 9385-9398, 2015. ISSN 1944-8244.
- 11 SARTORI, T. A. I. D. C. **Biocerâmicas porosas de alumina e de alumina-zircônia recobertas com fosfato de cálcio para implantes ósseos**. 2015. 89 (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo - USP, Pirassununga - SP.
- 12 PIERRI, J. et al. Compósitos de Al_2O_3/ZrO_2 recobertos com hidroxiapatita dopada com íons Ag. **Cerâmica**, p. 160-164, 2007. ISSN 0366-6913.
- 13 BARRERE, F. et al. Influence of ionic strength and carbonate on the Ca-P coating formation from SBFx 5 solution. **Biomaterials**, v. 23, n. 9, p. 1921-1930, 2002. ISSN 0142-9612.
- 14 ASTM. **C373-88 –Standard Test Method for Water Absorption, Bulk Density, Apparent Porosity, and Apparent Specific Gravity of Fired Whiteware Products**. USA 1999.
- 15 LOBO, A. O. et al. Effect of ultrasound irradiation on the production of nHAp/MWCNT nanocomposites. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 7, p. 4305-4312, 2013. ISSN 0928-4931.
- 16 GARTNER, L.; HIATT, J. **Tratado de Histologia**. Ed: Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ 2003.
- 17 LIU, J.; MIAO, X. Porous alumina ceramics prepared by slurry infiltration of expanded polystyrene beads. **Journal of Materials science**, v. 40, n. 23, p. 6145-6150, 2005. ISSN 0022-2461.
- 18 KLAWITTER, J.; HULBERT, S. Application of porous ceramics for the attachment of load bearing internal orthopedic applications. **Journal of biomedical materials research**, v. 5, n. 6, p. 161-229, 1971. ISSN 1097-4636.
- 19 HENCH, L. L. Sol-gel materials for bioceramic applications. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 2, n. 5, p. 604-610, 1997. ISSN 1359-0286.

- 20 KALITA, S. J.; BHARDWAJ, A.; BHATT, H. A. Nanocrystalline calcium phosphate ceramics in biomedical engineering. **Materials Science and Engineering: C**, v. 27, n. 3, p. 441-449, 2007. ISSN 0928-4931.
- 21 ZANIN, H. et al. Assisted deposition of nano-hydroxyapatite onto exfoliated carbon nanotube oxide scaffolds. **Nanoscale**, v. 7, n. 22, p. 10218-10232, 2015.
- 22 HASHMI, M. U. et al. Dissolution behaviour of bioactive glass ceramics with different CaO/MgO ratios. **Ceramics-Silikaty**, v. 54, n. 1, p. 8-13, 2010. ISSN 0862-5468.

OBTAIN CERAMIC POROUS ALUMINA-ZIRCONIA BY REPLICA METHOD CALCIUM PHOSPHATE COATED

ABSTRACT

Biomaterials used in bone replacement, including porous bioceramics, are often used as support structure for bone formation and repair. The porous bioceramics are used because present features as biocompatibility, high porosity and pore morphology that confer adequate mechanical strength and induce bone growth. In this work were obtained porous specimens of alumina containing 5% by inclusion of volume of zirconia produced by the replica method. The porous specimens had its surface chemically treated with phosphoric acid and were coated with calcium phosphate. The coating was performed using the biomimetic method during 14 days and an initial pH of 6.1. The porous specimens were characterized using the follow techniques: porosity, axial compression tests, microtomography, scanning electron microscopy (SEM), energy dispersive spectroscopy (EDS), X-ray diffraction (XRD) and pH measurements SBF solution. The results showed specimens with suitable pore morphology for application as biomaterial, and even a reduced time of incubation favored the calcium phosphate phases formation on the material surfaces.

Keywords: *Replic method; Porous bioceramics; Biomimetic coating.*