

## Testes de citotoxicidade e de solubilidade em um compósito cerâmico a base de alumina-zircônia

(Cytotoxicity and solubility tests on a alumina-zirconia ceramic composites)

Gomes, R. M. T.<sup>1</sup>; Paiva, M. P.<sup>1</sup>; Cossu, C. M. F. A.<sup>2</sup>; Candido, J. V.<sup>3</sup>; Magnago, R.O.<sup>1,4</sup>; Santos, C.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Centro Universitário de Volta Redonda - UniFOA.

Avenida Paulo Erlei Alves Abrantes, 1325, Três Poços, Volta Redonda - RJ.

<sup>2</sup> Escola de Engenharia de Lorena - USP.

Estrada Municipal do Campinho, s/n, Ponte Nova, Lorena - SP.

<sup>3</sup> Universidade Estadual Paulista - UNESP.

Avenida Ariberto Pereira da Cunha, 333, Portal das Colinas, Guaratinguetá - SP.

<sup>4</sup> Faculdade de Tecnologia, Campus Regional de Resende - UERJ.

Rodovia Presidente Dutra km 298, Polo Industrial, Resende - RJ.

[roberto.magnago@foa.org.br](mailto:roberto.magnago@foa.org.br)

### Resumo

Este trabalho buscou a realização de testes de citotoxicidade *in vitro* e solubilidade química em um material cerâmico compósito a base de  $Al_2O_3-ZrO_2(Y_2O_3)$ . Para verificar a citotoxicidade, a viabilidade celular expõe a existência de corantes vitais como o vermelho neutro que dissolvido em água atravessa a membrana celular, se concebendo centralmente nos lisossomos, por ligações eletrostáticas hidrofóbicas em sítios aniônicos na matriz lisossomal onde este se fixa. Este teste foi realizado pelo IPEN. Teste de solubilidade química foi realizado em condições normais de temperatura durante 5 min e em temperatura controlada a 80 °C durante 1 hora, ambas utilizando ácido acético 5% com água grau 2. Compósitos com alumina de alta pureza foram misturadas em diferentes teores de 3%, 5%, 10% e de 15% em massa de zircônia nano particulada da marca ZPex. Os pós foram homogeneizados e peneirados. As misturas de pós foram prensadas uniaxialmente com prensa de dupla ação de pistão a 100 MPa por 60 segundos. Compactos de 100 mm de diâmetro com 22 mm de altura. Os compactos foram pré-sinterizados, aplicando-se temperatura de 1100 °C, com patamar de 120 min. A taxa de aquecimento foi de 2 °C/min até a temperatura final pré-estabelecida com objetivo de reduzir empenos e facilitar a liberação de ligantes e lubrificantes orgânicos utilizados na prensagem. Os resultados mostraram que o compósito não apresentou nenhuma alteração no teste de citotoxicidade e também se mostrou inerte para o teste de solubilidade química com nenhuma perda de massa evidente.

**Palavras chave:** Compósito, Alumina-Zircônia, Citotoxicidade, Solubilidade.

### Abstract

*This work aimed to perform in vitro cytotoxicity tests and of chemical solubility in a composite ceramic material based on  $Al_2O_3-ZrO_2 (Y_2O_3)$ . To verify cytotoxicity, cell viability exposes the existence of vital dyes such as the neutral red that dissolves in water through the cell membrane. This test carried out by IPEN. Chemical solubility test performed under normal temperature conditions for 5 min and at controlled temperature at 80 °C for 1 hour,*

*both using 5% acetic acid with grade 2 water. High purity alumina composites mixed at different levels of 3 %, 5%, 10%, and 15% by mass of ZPex brand nano particulate zirconia. The powders were homogenized and sieved. The powder mixtures uniaxial pressed with double piston press at 100 MPa for 60 seconds. Compacts 100 mm in diameter with 22 mm height madid. The compacts were pre-sintered applying a temperature of 1100 °C, with a 120min. The heating rate was 2 °C/min to the pre-set final temperature in order to reduce bending and facilitate the release of organic binders and lubricants used in the pressing. The results showed that the composite showed no change in the cytotoxicity test and was inert to the chemical solubility test with no apparent mass loss.*

**Keywords:** Composite, Alumina-Zirconia, Cytotoxicity, Solubility.

## INTRODUÇÃO

A integração de materiais com diferentes propriedades funcionais inseridos no mesmo produto está crescendo nas indústrias de manufatura, com ênfase especial em: Aeronáutica, ferramentas de usinagem, molduras e biomateriais [1-4].

Compósitos cerâmicos  $Al_2O_3/Y-TZP/$  têm sido extensivamente estudados, a fim de aliar a dureza do  $Al_2O_3$  com a alta tenacidade à fratura do  $ZrO_2$  tetragonal [5-9]. Estes compósitos estão bem estabelecidos em numerosas aplicações, como tribocomponentes, ferramentas de corte e implantes biomédicos [5-9]. Neste sistema, o  $ZrO_2-Y_2O_3$  (Y-TZP) também é responsável pela melhoria da sinterabilidade do  $Al_2O_3$ , redução do crescimento de grãos e aumento da tenacidade à fratura da matriz de  $Al_2O_3$ . No entanto, o aumento do conteúdo de Y-TZP resulta em perda considerável de dureza e consequente resistência ao desgaste, bem como aumento dos coeficientes de expansão térmica e mudanças significativas na condutividade térmica [10, 11].

É sempre necessário verificar a biocompatibilidade e citotoxicidade no desenvolvimento de novos compósitos cerâmicos que ambicionam ser utilizados em seres humanos [12]. A ISO 6872 de 2015 [13] e a ISO 10993-5 de 2009 [14] determinam a realização de testes para analisar as características químicas, físicas e biológicas a fim de compreender os materiais conformados e suas possíveis aplicabilidades. O presente trabalho apresenta como objetivo a realização de ensaios para a validação e desenvolvimento de um novo material a base de  $Al_2O_3$  reforçada com  $ZrO_2(Y_2O_3)$  através de testes de citotoxicidade in vitro e solubilidade química.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Materials

Nesse trabalho foram utilizados pós de alumina,  $Al_2O_3$ , e nanopós de dióxido de zircônio estabilizados com 3% mol de óxido de ítria ( $ZrO_2-Y_2O_3$ ) da marca TOSOH. As características mais matérias-primas são apresentadas a seguir na Tabela I.

É importante ressaltar que a utilização de pós de alumina,  $Al_2O_3$ , como matriz do compósito, e diferentes proporções de zircônia estabilizada com ítria,  $ZrO_2(Y_2O_3)$ , demonstra

as principais características das matérias primas utilizadas para confecção dos compósitos caracterizados e discutidos, posteriormente.

Tabela I – Características das matérias primas utilizadas no trabalho.

CARACTERÍSTICAS	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	ZrO <sub>2</sub> (Y <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )
FABRICANTE	Almatis CT - 3000	TOSOH - Zpex
TAMANHO MÉDIO DE PARTICULAS	0,4 µm	40 nm
MASSA ESPECÍFICA	3,98 g/cm <sup>3</sup>	6,05 g/cm <sup>3</sup>
PUREZA	99,9%	97% ZrO <sub>2</sub> Y <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 3% mol (5,6% peso)
FASES CRISTALINAS	100% Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	95% Tetragonal / 5% Monoclínica
ÁREA SUPERFICIAL	7,0 m <sup>2</sup> /g	16,2 m <sup>2</sup> /g

Os pós foram misturados nas proporções de 85%, 90%, 95% e 97% em peso de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> com 15%, 10%, 5% e 3% de ZrO<sub>2</sub>(Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) respectivamente. A moagem foi realizada à úmido utilizando álcool isopropílico como veículo e jarros de esferas de WC. Foi utilizado moinho planetário (Pulverisette5, Fritsch) [15]. Lotes de 100 g de mistura dos pós foram moídos com a quantidade de esferas de moagem (diâmetro 5 e 10 mm) durante 5 minutos. Em seguida as suspensões foram encaminhadas para estufa de secagem e mantidas por 24 horas a 120 °C [14].

### Processamento

Os pós foram prensados uniaxialmente com prensa de dupla ação de pistão, a 100 MPa e 60 segundos. Compactos de 10 mm de diâmetro com 2 mm de altura. O primeiro estágio do processamento de mistura constituiu-se na calcinação dos pós de ZrO<sub>2</sub>(Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) a 900 °C por uma 1 hora, com taxa de aquecimento de 20 °C/min, sendo promovido a remoção de partículas voláteis e ligantes, fazendo com que após o processo de calcinação, sejam os pós de ZrO<sub>2</sub>(Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) sejam peneirados para atingir em a granulação inferior a 32µm.

No segundo estágio do processamento, os pós de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> foram misturados em diferentes proporções, em peso, de sendo que ZrO<sub>2</sub>(Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) estas misturas continham concentrações iguais a 3%, 5%, 10% e 15% de ZrO<sub>2</sub>(Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) as quais foram mescladas a seco utilizando um moinho almofariz MARCONI MA-500 com pistilo motorizado de alumina em dois turnos com tempo de moagem de 1 minuto e intervalos de 1 minuto entre cada turno, com rotação de 50 RPM. Posteriormente a moagem, foi acrescentada na mistura 5wt% de ligante polimérico, o PVA (Álcool Polivinílico), em seguida, as misturas foram peneiradas na malha de 120 Mesh, atingindo granulação de 125 µm.

No último estágio, os pós foram compactados uniaxialmente a uma pressão de ≈ 50 MPa durante 1 minuto, obtendo corpos de prova com dimensão igual a 15 mm de diâmetro e 7 mm de espessura, e em seguida, as amostras foram sinterizadas no forno MAITEC F1650, com rampas de aquecimento: 900 °C por 2 horas, com taxa de aquecimento de 1 °C/min, para eliminação do ligante polimérico, em seguida, 1600 °C por 2 horas, com taxa de aquecimento de 5 °C/min, e por fim, resfriamento à temperatura ambiente, com taxa de resfriamento de 10 °C/min.

Os compactos foram pré-sinterizados, em forno MAITEC F1650, aplicando-se temperatura de 1100 °C, com patamar de 120 min. A taxa de aquecimento foi de 2 °C/min até a temperatura final pré-estabelecida com objetivo de reduzir empenos e facilitar a liberação de ligantes e lubrificantes orgânicos utilizados na prensagem [16].

### **Caracterizações**

O cálculo da massa específica das amostras sinterizadas foi feito através do princípio de Arquimedes. A densidade relativa (%) foi calculada pela relação entre a massa específica da cerâmica sinterizada e a massa específica teórica de cada composição estudada [16].

As fases existentes nas amostras sintetizadas foram identificadas por difração de raios X, utilizando radiação “Cu-K $\alpha$ ”, com varredura entre 10° e 80°, passo angular de 0,05° e velocidade de 3 seg/ponto de contagem. Os picos foram identificados, através de comparação com microfichas do arquivo JCPDS [17]. Difratorômetro de Raios X da marca SHIMADZU e modelo XRD-6100, localizado nos laboratórios do UniFOA.

Para a análise da microestrutura as amostras foram lixadas e polidas [18]. Para revelação dos contornos de grão, as superfícies polidas sofreram ataques térmico, ao ar, a 1350 °C por 15 min, utilizando taxa de aquecimento de 30 °C/min. A distribuição de tamanhos de grão foi avaliada, visando o estudo da influência da temperatura nos parâmetros medidos de resistência mecânica e translucidez [19]. Micrografias obtidas no MEV do UniFOA da marca HITACHI e modelo TM3000 utilizando-se de elétrons secundários.

Baseado na norma ISO 10993-5 (2009) a linhagem celular utilizada foi a NCTC clone L929 (CCIAL 020) de tecido conectivo de camundongo, e o meio de cultura foi o Meio de Eagle (MEM) com adição de 5% de soro fetal bovino, amino ácidos não essenciais e piruvato de sódio (MEM-uso) [20]. A microplaca para o ensaio foi preparada no Núcleo de Culturas Celulares do Instituto Adolfo Lutz. O cultivo das células foi realizado em garrafas de cultura, em meio-uso e após o crescimento das mesmas as células foram destacadas e a suspensão celular foi acertada para 3,5x10<sup>5</sup> células mL<sup>-1</sup>. Os 200 ml da suspensão obtida foram distribuídos em cada poço da microplaca de 96 poços e a placa foi mantida em incubadora úmida a 37 °C e atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> por cerca de 24h, para atingir a confluência desejada [20]. Os extratos das amostras e do controle negativo foram preparados em MEM-uso, na proporção de 1 cm<sup>2</sup> de área superficial ou 0,1 g por ml do meio de cultura, incubados em estufa 37 °C durante 48h. Foi utilizada como controle negativo a alumina e como controle positivo o látex de borracha natural (0,05 g em 8 ml de MEM-uso, incubado por 24h). Os extratos foram submetidos à diluição seriada com MEM-uso obtendo-se concentrações de 100, 50, 25, 12,5 e 6,25% [20]. O controle negativo, material que não causa toxicidade, é utilizado para demonstrar a resposta celular e o controle positivo, material que demonstra resposta citotóxica reprodutível, é utilizado com o propósito de demonstrar uma resposta apropriada ao sistema do teste. [20,21].

As amostras foram pesadas e logo em seguida depositadas em ácido acético de grau analítico, 4% por volume de solução em água de grau 3. Logo em seguida a sua deposição esperou-se por 30 segundos com a amostra imersa na solução e após houve nova avaliação da massa da amostra para alteração no material, conforme ISO 6872 [13].

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os materiais cerâmicos desenvolvidos nesse trabalho apresentaram densificação entre 94% e 98%. A fase predominante no reforço de zircônia é a tetragonal, considerada fase metaestável, é reconhecida como responsável pelo aumento da resistência mecânica das cerâmicas. Porém, a fase monoclinica, considerada como fase estável, ainda é observada de forma residual. A fase monoclinica, da qual não se obtém ganhos de resistência mecânica, foi quase totalmente convertida em tetragonal, após sinterização [22]. A Figura 2 apresenta os DRX dos compósitos sinterizados com diferentes proporções em peso de  $ZrO_2(Y_2O_3)$  nanoparticulada. Observa-se a presença das fases cristalinas de  $\alpha-Al_2O_3$ ,  $ZrO_2$  tetragonal e  $ZrO_2$  monoclinica.

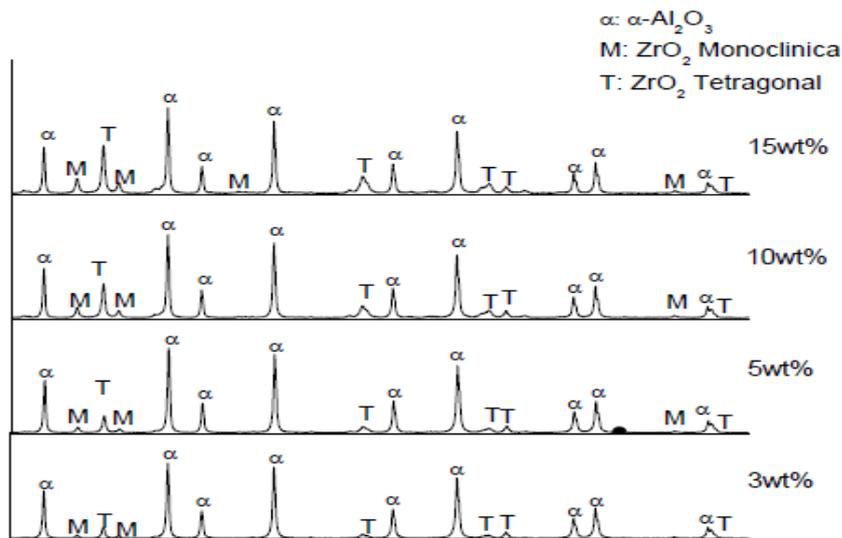


Figura 2 - Difratogramas dos compósitos sinterizados a 1600 °C durante 2h com diferentes teores de  $ZrO_2(Y_2O_3)$  nanoparticulada.

A Figura 3 demonstra os resultados da densidade relativa dos compactos a verde e dos compósitos sinterizados a 1600°C durante 2 horas.

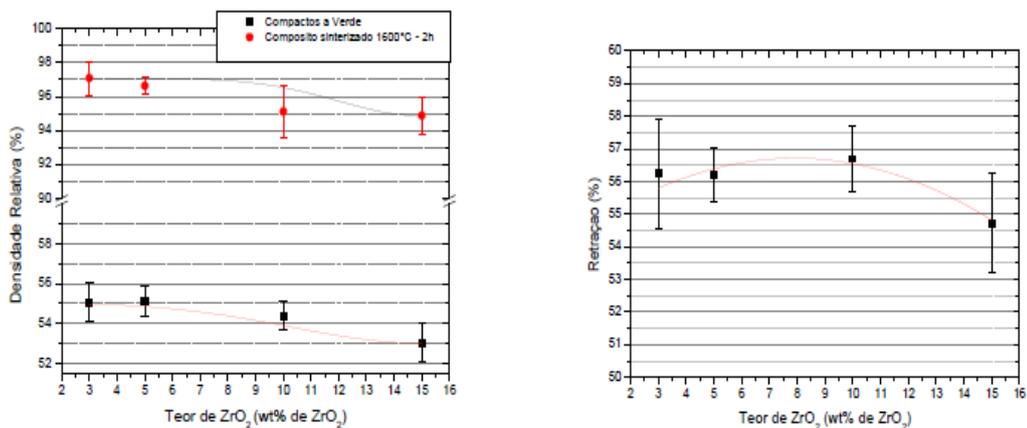


Figura 3 – Densidade relativa e retração volumétrica em função do teor de  $ZrO_2(Y_2O_3)$  nanoparticulada. Compactos a verde (linha vermelha), e compósitos sinterizados (linha preta).

As amostras compactadas demonstram densidade a verde na ordem de 55%. Ocorre que a aplicação de 5% de ligante, em peso, propicia a homogeneidade do compósito, fazendo com que as partículas de  $ZrO_2$  se alojem na matriz de  $Al_2O_3$ , ocasionando alto grau de densidade a verde nas amostras. Posteriormente ao processo de sinterização, o compósito apresentou densidade relativa superior a 95%, o que incita compreender que os ciclos de sinterização das amostras foram eficazes, permitindo a eliminação contínua do ligante utilizado no processo de prensagem, aumento do crescimento dos grãos, que por sua vez, causará a eliminação de poros nas amostras sinterizadas.

Na retração volumétrica do material após o processo de sinterização a 1600 °C por 2 horas atingiu-se o valor máximo de 55%, o que indica que quanto maior a porcentagem, em peso, de  $ZrO_2$  no compósito, menor será a retração volumétrica do material, devido ao coeficiente de expansão térmica do  $ZrO_2$  ( $\alpha = 130 \times 10^{-7} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$ ) ser maior do que o do  $Al_2O_3$  ( $\alpha = 80 \times 10^{-7} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$ ) [23]. É possível notar que os picos cristalinos de  $ZrO_2$  tetragonal (fase metaestável) elevam-se de acordo com os teores  $ZrO_2(Y_2O_3)$  nanoparticulada, quando adicionado na matriz de  $\alpha\text{-}Al_2O_3$ . Observa-se em pequena proporção a presença de  $ZrO_2$  monoclinica, na faixa de análise  $2\theta$  entre  $30^\circ$  a  $50^\circ$ , o que independe dos compósitos cerâmicos analisados.

Na Figura 4 verificam-se os resultados de MEV das amostras sinterizadas. Conforme as micrografias dos compósitos sinterizados observa-se que as partículas de  $ZrO_2$  (imagem clara) estão alinhadas em torno dos contornos de grão da matriz de  $\alpha\text{-}Al_2O_3$  (imagem escura), sendo que se aumentar a fração em massa de  $ZrO_2(Y_2O_3)$ , aumenta-se a quantidade de aglomerados de grãos de  $ZrO_2$  em torno dos contornos de grão, fazendo com que haja o aumento da tenacidade do compósito por transformação de fase.

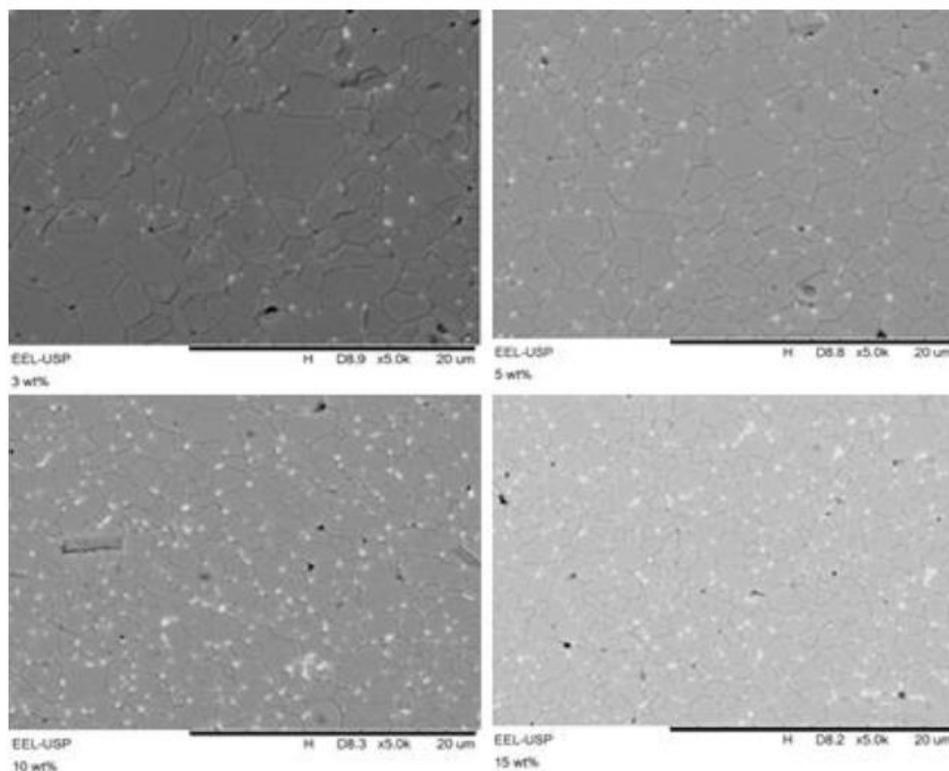


Figura 4 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do compósito  $Al_2O_3$  com diferentes proporções de  $ZrO_2(Y_2O_3)$ : 3wt%  $ZrO_2$ ; 5wt%  $ZrO_2$ ; 10wt%  $ZrO_2$ ; 15wt%  $ZrO_2$ .

A Tabela II apresenta os resultados de citotoxicidade. O teste de citotoxicidade deve estar de acordo com a ISO 10993-5, a fim de que os extratos dos materiais a serem testados sejam colocados em contato com uma cultura de células de mamíferos, em microplacas de 96 poços, de forma que o resultado seja apresentado em índice de citotoxicidade ( $IC_{50}$ ), o qual significa que a concentração do extrato do material provoca 50% de morte na população celular.

Conforme demonstrado, frente a leituras de densidade óptica calculou-se a porcentagem de sobrevivência das células em cada diluição pela comparação com a média do controle de células (100% viabilidade celular). Na curva obtida pela projeção da porcentagem de sobrevivência em função da diluição do extrato em gráfico (curva de viabilidade celular) encontra-se o índice de citotoxicidade ( $IC_{50}$ ) do material. A  $IC_{50}$  define a concentração do extrato que lesa ou mata 50% da população celular no ensaio de citotoxicidade.

Já as curvas de viabilidade celular das amostras que se encontram acima da linha de 50% e que apresenta na concentração de 100% do extrato a viabilidade celular  $\geq 70\%$  são definidas como não citotóxicas, sendo que as que cruzarem esta linha ou estiverem abaixo dela são consideradas citotóxicas, além do  $IC_{50}$  ser obtido na intersecção da curva de viabilidade celular e a linha de 50%.

Com relação ao controle do ensaio, este em regra é realizado pelo controle de células, onde a medida de DO deve ser  $\geq 0,3$ , sendo que a checagem da qualidade da concentração-resposta, demonstra que o  $IC_{50}$  deverá estar entre duas ou três respostas de inibição da incorporação do vermelho neutro, entre 10-90% de viabilidade celular.

Tabela II - Resultados do Ensaio de Citotoxicidade pelo método de incorporação do vermelho neutro.

Concentração Extrato (%)	% Viabilidade celular $\pm$ cv					
	Controle Negativo	Controle Positivo	3% ZrO <sub>2</sub>	5% ZrO <sub>2</sub>	10% ZrO <sub>2</sub>	15% ZrO <sub>2</sub>
100	100 $\pm$ 6	1 $\pm$ 8	104 $\pm$ 4	104 $\pm$ 2	97 $\pm$ 4	95 $\pm$ 5
50	105 $\pm$ 2	30 $\pm$ 5	106 $\pm$ 2	107 $\pm$ 1	97 $\pm$ 10	103 $\pm$ 1
25	106 $\pm$ 5	105 $\pm$ 3	93 $\pm$ 10	95 $\pm$ 6	92 $\pm$ 5	88 $\pm$ 14
12,5	104 $\pm$ 4	104 $\pm$ 3	105 $\pm$ 1	104 $\pm$ 1	100 $\pm$ 2	98 $\pm$ 3
6,25	102 $\pm$ 3	101 $\pm$ 3	99 $\pm$ 11	98 $\pm$ 1	101 $\pm$ 1	95 $\pm$ 6

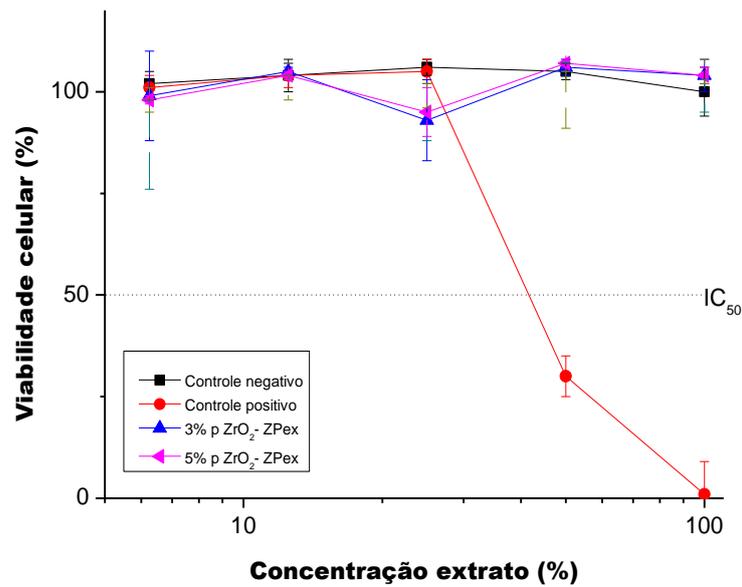


Figura 5 - Curvas de Viabilidade Celular obtidas no Ensaio de Citotoxicidade pelo método de incorporação do vermelho neutro.

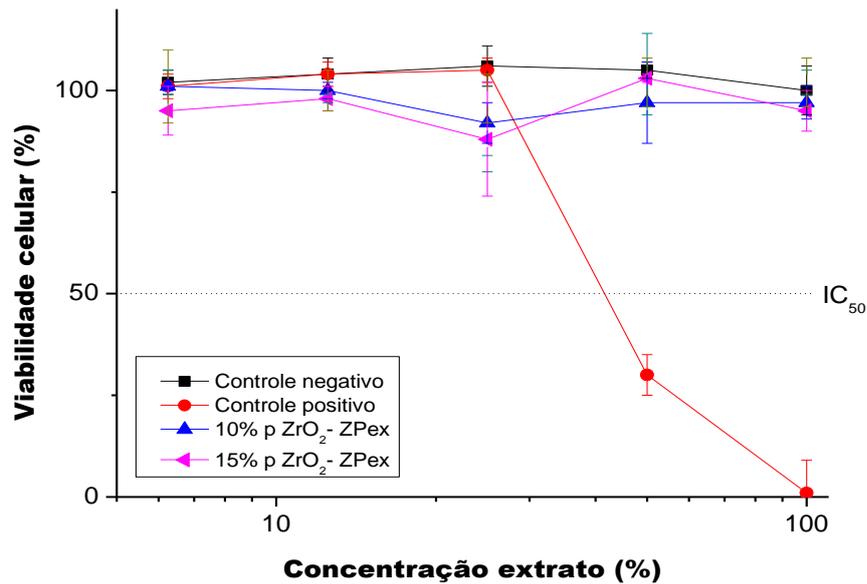


Figura 6 - Curvas de Viabilidade Celular obtidas no Ensaio de Citotoxicidade pelo método de incorporação do vermelho neutro.

A solubilidade química foi avaliada e seus resultados são expressos na Tabela III. É importante demonstrar que as amostras dos compósitos foram submetidas aos ensaios de solubilidade química em condições normais de temperatura durante 5 minutos e em temperatura controlada de 80°C durante 1 hora.

Tabela III – Resultados do teste de Solubilidade Química.

<b>Compósito Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/Y-TZP - Condições Normais (T<sub>AMB</sub> por 5 min)</b>			
Composição	Massa inicial (g)	Massa final (g)	Diferença (%)
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> /3%p Y-TZP	2,1149	2,1148	<1
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> /5%p Y-TZP	2,1153	2,1153	0
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> /10%p Y-TZP	2,2561	2,2558	<1
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> /15%p Y-TZP	2,3970	2,3968	<1
<b>Compósito Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/Y-TZP - Forno (80°C por 1 hora)</b>			
Composição	Massa inicial (g)	Massa final (g)	Diferença (%)
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> /3%p Y-TZP	2,1148	2,1148	0
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> /5%p Y-TZP	2,1153	2,1156	<1
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> /10%p Y-TZP	2,2558	2,2557	<1
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> /15%p Y-TZP	2,3970	2,3968	<1

A importância do teste de solubilidade se faz para uma análise geral do compósito desenvolvido, se houve ou não perda de material. Insinuando se o compósito é capaz de evitar qualquer tipo de dano à exposição orgânica, averiguando a presença de alteração na estrutura do material.

## CONCLUSÕES

Os compósitos cerâmicos Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/Y-TZP desenvolvido neste trabalho possuem alumina e zircônia tetragonal como fases majoritárias, além de densidade relativa média superior a 95%. Os testes de citotoxicidade indicam biocompatibilidade, em todas composições desenvolvidas nesse trabalho. Da mesma forma os testes de solubilidade indicam que as amostras não demonstraram alterações significativas. Portanto, constatou-se que esses compósitos desenvolvidos não são agressivos ou nocivos ao organismo humano.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a FAPERJ (processo E26-202.997/2017) e ao CNPq (processo 311119/2017-4) pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

- [1] H. Sarraf, R. Herbig, M. Maryška, Fine-grained Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-ZrO<sub>2</sub> composites by optimization of the processing parameters, Scripta Materialia, 59 (2) (2008) pp. 155–158.
- [2] W.H Tuan, R.Z Chen, T.C Wang, C.H. Chang, P.S Kuo. Mechanical properties of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/ZrO<sub>2</sub> composites. Journal of the Europe Ceramic Society 22 (2002).
- [3] J.L. Shi, Z.L.Lu, J.K.Guo, Model analysis of boundary residual stress and its effect on toughness in thin boundary layered yttria-stabilized tetragonal zirconia polycrystalline ceramics, Journal Materials Research 15 (3) (2000) pp.727-732.
- [4] J.L.Shi, L.Li, J.K. Guo, Boundary stress and its effect on toughness in thin boundary layered and particulate composites: model analysis and experimental test on T-TZP based ceramic composites, J Eur Ceram Soc, 18 (1998) pp.2035-2043.
- [5] S.M. Naga, E.M.Abdelbary, M.Awaad, Y.I.El-Shaer, H.S.Abd-Elwahab Effect of the preparation route on the mechanical properties of Ytria-Ceria doped Tetragonal Zirconia/Alumina composites, Ceramics International 39 (2013) 1835–1840

- [6] Yongsheng Zhang Litian Hua, Jianmin Chena, Weimin Liu, Fabrication of complex-shaped Y-TZP/ $\text{Al}_2\text{O}_3$  nanocomposites, *Journal of materials processing technology* 209 (2009) 1533–1537
- [7] F. Sommer, R. Landfried, F. Kern, R. Gadow, Mechanical properties of zirconia toughened alumina with 10–24 vol.% 1.5 mol% Y-TZP reinforcement, *Journal of the European Ceramic Society* 32 (2012) 3905–3910
- [8] Kunyang Fan, Jesús Ruiz-Hervias, Jose Ygnacio Pastor, Jonas Gurauskis, Carmen Baudín, Residual stress and diffraction line-broadening analysis of  $\text{Al}_2\text{O}_3$ /Y-TZP ceramic composites by neutron diffraction measurement, *Int. Journal of Refractory Metals and Hard Materials* 64 (2017) 122–134
- [9] Kunyang Fan, Jose Ygnacio Pastor, Jesus Ruiz-Hervias, Jonas Gurauskis, Carmen Baudin, Determination of mechanical properties of  $\text{Al}_2\text{O}_3$ /Y-TZP ceramic composites: Influence of testing method and residual stresses, *Ceramics International* 42(2016)18700–18710.
- [10] ASTM: C-1327-15, Standard Test Method for Vickers Indentation Hardness of Advanced Ceramics, 1999, pp. 1-9.
- [11] ASTM: C-1421-10, Standard Test Method for Determination of Fracture Toughness of Advanced Ceramics at Ambient Temperature, 2010, pp. 1-33.
- [12] Ciapetti, G., Granchi, D., Verri, E., Savarino, L., Cavedagna, D., Pizzoferrato, A. Application of a combination of neutral red and amido black staining for rapid, reliable cytotoxicity testing of biomaterials, *Biomaterials*, v. 17, p. 1259-1264, 1996.
- [13] ISO 6872
- [14] ISO 10993-5 - Biological evaluation of medical devices part 5: Test of *in vitro* cytotoxicity. Third edition 2009-06-01.
- [15] SOUZA, Fernando Barcelos Marcolino de. Caracterização de cerâmicas porosas de alumina reforçada com zircônia produzidas pelo método da réplica. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 65 f.2008
- [16] SILVA, Larissa Bezerra da. Estudo da sinterização de resíduo odontológico microparticulado do sistema cerâmico  $\text{ZrO}_2$ - $\text{Y}_2\text{O}_3$ . Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 2014
- [17] JCPDS – International center for diffraction data 2000, *Advances in x ray, Analysis*.
- [18] COSSU, C. M. F. A. et al.  $\text{Al}_2\text{O}_3$  reforçado com nanopartículas de  $\text{ZrO}_2$  (3% mol  $\text{Y}_2\text{O}_3$ ). 22º CBECiMat - Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais. Natal: RN. 2016.
- [19] CANGANI, Maxwell Pereira. Caracterização microestrutural de  $\text{ZrO}_2$  estabilizada com  $\text{Y}_2\text{O}_3$  sinterizada a partir de pós nanocristalinos. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2011
- [20] Rogero, S.O., Lugão, A.B.; Ikeda, T.I.; Cruz, A.S. Teste in vitro de citotoxicidade: Estudo comparativo entre duas metodologias. *Materials Research, Brasil*, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.
- [21] TOMPSON, J. Y; STONER, B. R.; PIASCIK JR. Ceramics for restorative dentistry: critical aspects for fracture and fatigue resistance. *Mater Sci Eng.* 2006; 5: 327-34.
- [22] PALMEIRA, A.A. Estudo comparativo da sinterização de pós nanoestruturados e microestruturados de  $\text{ZrO}_2$  tetragonal estabilizado com  $\text{Y}_2\text{O}_3$ . 2012, 165pp. (Tese de Doutorado em Ciências dos Materiais) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, USP, São Paulo-SP.
- [23] FRANCISCO, M.G. Propriedades mecânicas de cerâmicas de zircônia tetragonal policristalina contendo ítrio (Y-TZP) após aplicação de cerâmica, 2009, 89pp. (Tese de Doutorado em Ciências dos Materiais) – Universidade de Taubaté, UNITAU, Taubaté-SP.