
CITOTOXICIDADE DE LIGAS METÁLICAS UTILIZADAS COMO BIOMATERIAIS

Sizue Ota Rogero¹, Mitiko Saiki², Isolda Costa³

Abstract

The cytotoxicity of metallic alloys with distinct compositions was investigated in physiological solutions which were in contact with these materials in the corrosion test. The samples were immersed in Eagle's medium (MEM), a physiological solution that simulates body fluids, at 37°C during 10 days. The extract obtained was analyzed by instrumental neutron activation technique to quantify metal release due to the corrosion process. The same extract was used for *in vitro* cytotoxicity assay by neutral red uptake method. In this work cytotoxicity assay was studied in order to identify which elements or their combinations cause cytotoxicity, utilizing standard solutions like extracts of the elements Co, Cr, Cu and Ni.

Resumo

A citotoxicidade de ligas metálicas de composições distintas foi investigada em soluções fisiológicas mantidas em contato com estes materiais para o teste de corrosão. As amostras de ligas ficaram imersas em meio de cultura de Eagle (MEM), semelhante ao fluido corpóreo, durante 10 dias, na temperatura de 37°C. O extrato obtido neste ensaio de corrosão foi analisado pela técnica de ativação com nêutrons (AAN) para quantificação dos metais liberados. O mesmo extrato foi utilizado no ensaio *in vitro* de citotoxicidade pelo método de incorporação do vermelho neutro. Neste trabalho foi realizado ensaio de citotoxicidade utilizando soluções padrão de elementos Co, Cr, Cu e Ni como extratos, para identificar os elementos ou a combinação destes elementos que estariam causando citotoxicidade.

Palavras-chave: Citotoxicidade, biomateriais metálicos, corrosão

Introdução

Ligas metálicas utilizadas como biomateriais podem apresentar grande susceptibilidade à corrosão no meio biológico. Consequentemente torna-se de grande interesse a avaliação da composição elementar destes materiais, assim como de seus produtos de corrosão, pois podem causar danos no corpo humano.

Os aços moldados por injeção, tais como os aços 316L e 17-4PH, são utilizados em componentes ortodônticos e instrumentos cirúrgicos.

¹ Mestre, Pesquisadora – IPEN/CNEN-SP

² PHD, Pesquisadora – IPEN/CNEN-SP

³ PHD, Pesquisadora – IPEN/CNEN-SP

O objetivo deste trabalho foi avaliar a citotoxicidade causada pelos produtos liberados no processo de corrosão provocado nas ligas metálicas em contato com o meio fisiológico e correlacionar estes íons metálicos lixiviados que apresentaram toxicidade, seja isoladamente ou em combinação com outros íons em diferentes concentrações.

Metodologia

Foram estudadas neste trabalho as ligas metálicas: liga 444, 17-4 PH e AISI 316L obtidos pelo método convencional e as ligas obtidas pela tecnologia de moldagem por injeção de pó (PIM): AISI 316L PIM, 17-4 PH PIM.

Em estudos anteriores foram realizados ensaios de citotoxicidade em brincos perfurantes tendo como substrato o aço inoxidável (brinco da marca Studex) e liga de alpaca (liga de Cu, Ni e Zn) (brinco da marca Perfur), ambos recobertos com ouro, comparados com brinco perfurante de titânio (1).

As amostras de ligas e de brincos foram imersas em meio de cultura celular MEM (meio mínimo de Eagle, que simula o fluido fisiológico) durante 10 dias na temperatura de 37°C, para obtenção do extrato. Este extrato foi utilizado para o ensaio de citotoxicidade e para quantificação dos metais liberados no meio de cultura pela técnica de análise por ativação com nêutrons.

1. Análise das ligas metálicas pela técnica de Ativação com Nêutrons (AAN)

O procedimento experimental da análise das ligas metálicas consistiu em irradiar 30-50mg do material juntamente com os padrões sintéticos dos elementos no reator IEA-R1 sob fluxo de nêutrons térmicos de cerca de $10^{12} \text{n.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$, como descrito em trabalho anterior (2).

2. Ensaio de Corrosão

Os produtos de corrosão obtidos, após imersão em meio de cultura para ensaio de citotoxicidade, foram quantificados pelo método de análise por ativação com nêutrons, conforme procedimento descrito em trabalho anterior (2).

3. Ensaio de Citotoxicidade

A investigação de toxicidade foi realizada pelo ensaio de citotoxicidade utilizando o método de incorporação do vermelho neutro, metodologia esta descrita em trabalho anterior (3). Foram utilizadas células NCTC da linhagem L929 do banco de células da ATCC. O extrato das ligas metálicas, nas diluições de 100, 50, 25, 12,5 e 6,25% foi colocado em contato com a cultura celular em microplacas de 96 poços. A toxicidade foi verificada pela medida da viabilidade das células utilizando o corante vital vermelho neutro e fazendo a leitura da densidade óptica nos poços em espectrofotômetro leitor de ELISA, em 450nm.

A percentagem de viabilidade celular foi calculada em relação às células controle.

Resultados e Discussão

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados da composição química das ligas submetidas ao ensaio de corrosão, os quais foram determinados pelo método de análise por ativação com nêutrons.

Tabela 1

Nos extratos dos ensaios de corrosão em meio de cultura celular onde as ligas ficaram imersas durante 10 dias, foi verificada a liberação de metais, conforme apresentado na Tabela 2. O Co e Cr foram encontrados nos extratos dos aços 444, 17-4 PH, 17-4 PH PIM, 316L e 316L PIM. O Co presente nas ligas em níveis de $\mu\text{g.g}^{-1}$ foi encontrado no extrato em concentrações da ordem de ng.mL^{-1} . Já o Cr que faz parte da composição das ligas, em teores de cerca de 15% foi encontrado no extrato em níveis de ng.mL^{-1} , indicando que na corrosão a liberação de Cr é baixa em relação ao seu alto teor na liga.

Tabela 2

A Tabela 2 com os resultados da análise dos produtos de corrosão mostra que o substrato do brinco perfurante Studex foi a liga que liberou maior quantidade de Co, cerca de 87 ng.mL^{-1} , sendo seguido por Perfur (cerca de 50 ng.mL^{-1}) e Ti (42 ng.mL^{-1}). Os brincos perfurantes recobertos com Au e o de Ti praticamente não liberaram Cr no extrato. Além disso, o Ni foi encontrado nos extratos dos brincos perfurantes recobertos com Au.

Tabela 3

Os resultados da percentagem de viabilidade celular e as concentrações dos elementos Co, Cr e Ni encontrados nos extratos estão apresentados na Tabela 3. Nesta tabela pode-se observar que o aço AISI 316L e os brincos perfurantes recobertos com Au mostraram toxicidade e os elementos que se destacaram foram Co, Cr e Ni, encontrados em diferentes concentrações.

Tabela 4

O ensaio de citotoxicidade foi realizado pelo método de incorporação do vermelho neutro nos aços: 444, 17-4 PH, 17-4 PH PIM, 316L e 316L PIM, sendo que para os brincos perfurantes foi utilizado o método de inibição de crescimento de colônias apresentado em trabalho anterior (Rogerio et al., 2000).

Na Tabela 4 estão apresentadas a percentagem de viabilidade celular e do número de colônias formadas em relação à concentração do extrato das diferentes ligas metálicas, assim como os resultados do controle negativo (placa de Ti) e do controle positivo (solução de fenol 0,02%). Para melhor visualização dos resultados da Tabela 4 foram elaborados os gráficos da Fig 1 e por meio das curvas obtidas foram calculados os índices de citotoxicidade $\text{IC}_{50\%}$ das ligas. $\text{IC}_{50\%}$ significa a concentração do extrato que causa lesão ou mata 50% da população celular no ensaio.

Os aços 444, 17-4 PH, 17-4 PH PIM e o brinco de Ti apresentaram comportamentos semelhantes ao controle negativo, isto é, de não toxicidade. Os brincos perfurantes recobertos com Au mostraram comportamento semelhante ao controle positivo, apresentando $\text{IC}_{50\%}$ de 43 para o Perfur, 78 para Studex e 32 para o controle positivo. O aço 316L apresentou $\text{IC}_{50\%}$ de 92, sendo que o mesmo aço obtido pela técnica de injeção de pó mostrou-se menos tóxico, com $\text{IC}_{50\%}$ muito próximo de 100.

Baseados nos resultados da Tabela 3 foram realizados ensaios de citotoxicidade utilizando soluções padrão dos elementos em lugar dos extratos de corrosão. O objetivo deste ensaio foi verificar quais são os elementos ou a associação deles, assim como as suas concentrações que estariam ocasionando citotoxicidade. A partir de soluções padrão estoque dos elementos Co, Cr, Cu e Ni, adquiridas da Spex Certiprep, USA, foram preparados soluções diluídas em meio de cultura celular, em diferentes concentrações, simulando extrato, conforme apresentadas na Tabela 5. Os resultados do ensaio de citotoxicidade estão apresentados na Tabela 6 e as curvas de viabilidade celular deste ensaio na Fig 2.

Tabela 6

Todas as soluções testadas apresentaram comportamento semelhante ao controle negativo, ou seja, não mostraram citotoxicidade nas concentrações utilizadas neste ensaio.

Figura 2

Na Fig 2 pode ser observado que nenhuma curva de viabilidade celular cruzou a linha do índice de citotoxicidade $IC_{50\%}$, exceto o controle positivo que apresentou $IC_{50\%}$ de cerca de 20, indicando que a solução de fenol 0,02%, na concentração de 20% causou dano em 50% da população celular no ensaio. Portanto, o comportamento das soluções de metais foi o de não toxicidade tanto isoladamente como em diferentes associações.

No ensaio de corrosão os íons metálicos são liberados e ficam em contato com os aminoácidos e os vários complexos existentes no meio de cultura durante 10 dias em temperatura de 37°C. Neste período pode haver fixação ou ligação dos íons metálicos com componentes do MEM, e o complexo assim formado poderia facilitar a entrada dos íons metálicos nas células, provocando alteração e, conseqüentemente, citotoxicidade.

Provavelmente devido à preparação das soluções metálicas terem sido no momento de uso para realização do teste, pode não ter ocorrido ligação da maioria dos íons metálicos com os complexos do meio de cultura, dificultando assim sua penetração nas células e, portanto, não causando toxicidade no ensaio.

Conclusão

Apesar das ligas apresentarem citotoxicidade, as soluções de cada um dos elementos liberados no ensaio de corrosão não mostraram toxicidade, tanto isoladamente como em soluções associadas, utilizadas em concentrações maiores que as encontradas no extrato dos produtos de corrosão. Esta discrepância de resultados de citotoxicidade obtidos entre soluções de elementos químicos e de produtos de corrosão pode ser explicada considerando a não similaridade das condições experimentais.

Estudos com soluções padrão dos metais em condições semelhantes às utilizadas no teste de corrosão de ligas metálicas, ou seja, preparadas em meio de cultura, incubadas por cerca de 10 dias em estufa à 37°C, serão realizados para comprovação da hipótese de ligação dos íons metálicos com radicais que facilitariam a entrada nas células e, conseqüentemente, causando citotoxicidade.

Agradecimentos

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

Agradecemos: a aluna Rezolina Pereira dos Santos do Instituto Adolfo Lutz pela cultura das células e as alunas Renata Hage Amaral e Roberta Momesso do Ipen pelo apoio técnico no ensaio de citotoxicidade.

Referências

1. S.O. Rogero; O.Z. Higa; M. Saiki; O.V. Correa; I. Costa. Cytotoxicity due to corrosion of ear piercing studs. *Toxicology in Vitro*, vol.14, n°.6, pp. 497-504, 2000.
2. M. Saiki; S.O. Rogero; I. Costa; O.V. Correa; O.Z. Higa. Characterization of ear piercing studs and their corrosion products by NAA. *J.Radioanal.Nucl.Chem.*, vol. 248, n°.1, pp. 133-136, 2001.
3. S.O. Rogero; A.B. Lugão; T.I. Ikeda; A.S. Cruz. Teste in vitro de citotoxicidade: Estudo comparativo entre duas metodologias. *Mater. Res.*, Vol. 6, n°.3, pp. 317-320, 2003.

Tabelas e Figuras

Tabela 1

Elementos	Aço 444	17-4 PH Conv.	17-4 PH PIM	AISI 316L	AISI 316L PIM	Substrato Studex	Substrato Perfur	Ti
As, $\mu\text{g g}^{-1}$	20,7 \pm 1,8	59,3 \pm 0,5	16,4 \pm 0,4	46,8 \pm 0,4*	17,5 \pm 0,6	57,4 \pm 0,8	8,1 \pm 0,5	17,7 \pm 0,3
Co, $\mu\text{g g}^{-1}$	241,9 \pm 3,5	412,9 \pm 1,2	247 \pm 4	1229 \pm 16	2388 \pm 31	2203 \pm 11	27,4 \pm 0,4	< 1
Cr, %	15,28 \pm 0,02	13,96 \pm 0,02	15,49 \pm 0,02	17,80 \pm 0,03	14,81 \pm 0,02	16,1 \pm 0,2	0,0070 \pm 0,0005	0,0096 \pm 0,0001
Cu, %	0,022 \pm 0,001	2,96 \pm 0,05	4,4 \pm 0,2		0,37 \pm 0,03	0,35 \pm 0,01	36,5 \pm 1,2	<0,04
Fe,%	73,6 \pm 1,7	69,1 \pm 1,8	70,0 \pm 0,2	57,8 \pm 0,2	60,0 \pm 0,2	67,9 \pm 0,2	9,0 \pm 0,2	<0,04
Mn, %	0,166 \pm 0,002	0,620 \pm 0,004	0,196 \pm 0,002	1,44 \pm 0,02	0,179 \pm 0,002	1,81 \pm 0,02	2,34 \pm 0,07	0,0007 \pm 0,0002
Mo, %	1,57 \pm 0,01	0,113 \pm 0,001	*	1,97 \pm 0,12	1,88 \pm 0,01	0,394 \pm 0,002	< 0,2	< 0,0003
Ni, %			4,27 \pm 0,04	12,9 \pm 0,1	11,61 \pm 0,09	7,86 \pm 0,07	6,80 \pm 0,07	0,009 \pm 0,001
Ti %						< 23	< 23	97,4 \pm 6,4
V, $\mu\text{g g}^{-1}$			793 \pm 11	120 \pm 23	763 \pm 14	987 \pm 26	< 77	33 \pm 3
Zn %						< 0,7	36,4 \pm 3,3	< 0,002

* – Os espaços em branco indicam que o elemento não foi detectado.

Tabela 2

Elemento	Aço 444	17-4PH Conv.	17-4PH PIM	AISI 316L	AISI 316L PIM	Brinco Studex	Brinco Perfur	Brinco Ti
Co, ng mL ⁻¹	11	19	6,3	6,6	8,8	86,9	49,5	41,7
Cr, ng mL ⁻¹	47	50	143	174	156	0,01	0,01	0,03
Ni, ng.mL ⁻¹	*		~ 0	~ 0	~ 0	0,66	0,96	
Fe, ng mL ⁻¹	748	698				3,43	0,01	
Zn, µg mL ⁻¹	1,8	0,8				0,03	3,26	0,17

* – Os espaços em branco indicam que o elemento não foi detectado.

Tabela 3

Tipos de Material	Aço 444	Aço 17-4PH	Aço 17-4PH PIM	Aço 316L	Aço 316L PIM	Brinco Studex	Brinco Perfur	Brinco de Ti
% Viab Cel	92	74	65	39	49	31	10	84
Conc. Extrat (100%)								
Cr ng/mL	47	50	143	174	156	0,01	0,01	0,03
Ni ng/mL	*		~ 0	~ 0	~ 0	0,66	0,96	
Co ng/mL	11	19,1	6,3	6,6	8,8	86,9	49,5	41,7

* – Os espaços em branco indicam que o elemento não foi detectado.

Tabela 4

Conc. Extrato (%)	% Viabilidade Celular ± dp							% número Colônias		
	Controle Negativo	Controle Positivo	Aço 444	Aço 17-4 PH	Aço 17-4 PH PIM	Aço 316L	Aço 316L PIM	Brinco Studex	Brinco Perfur	Brinco de Ti
100	88±7	0±0	92±8	74±15	65±14	39±12	49±4	31	10	88
50	94±2	17±2	109±2	92±10	106±2	103±3	97±6	74	41	101
25	99±3	64±18	106±5	98±11	103±2	104±13	100±2	94	72	103
12,5	96±5	78±13	100±11	88±8	97±4	91±13	98±10	90	85	107
6,25	98±9	74±14	92±10	81±9	100±8	109±7	93±6	96	85	101

Tabela 5

Metais	Soluções Padrão dos Metais	Concentração da Solução (extrato 100%)
Co	1001±3 mg.L ⁻¹ – 2% HNO ₃ lote 8-11 CO PLCO ₂ – 2X/2Y/2T	1µg.mL ⁻¹
Cr	1002±3 mg.L ⁻¹ lote 8-15 CR	2 µg.mL ⁻¹
Cu	10011,5±30 mg.L ⁻¹ lote 07-49 Cu X/Y	50 µg.mL ⁻¹
Ni	9980,5±30 mg.L ⁻¹ lote 07-61 Ni	99,8 ng.mL ⁻¹

Tabela 6

Conc. Extrato (%)	Porcentagem de Viabilidade Celular ± dp									
	Controle Negativo	Controle Positivo	Co	Cr	Cu	Ni	Co/Cr	Co/Cr/Cu	Co/Cr/Ni	Co/Cr/Cu/Ni
100	88±7	0±0	97±17	95±16	91±2	105±9	99±6	87±5	105±2	87±18
50	94±2	17±2	85±4	102±2	94±4	113±9	104±9	96±2	107±8	92±5
10	99±3	64±18	95±6	94±10	89±8	95±8	100±18	84±2	120±2	78±1
5	96±5	78±13	92±10	98±8	101±4	96±0	117±7	99±4	117±6	91±6
1	98±9	74±14	88±11	89±4	96±2	92±2	110±4	95±9	103±7	72±9

Figura 1

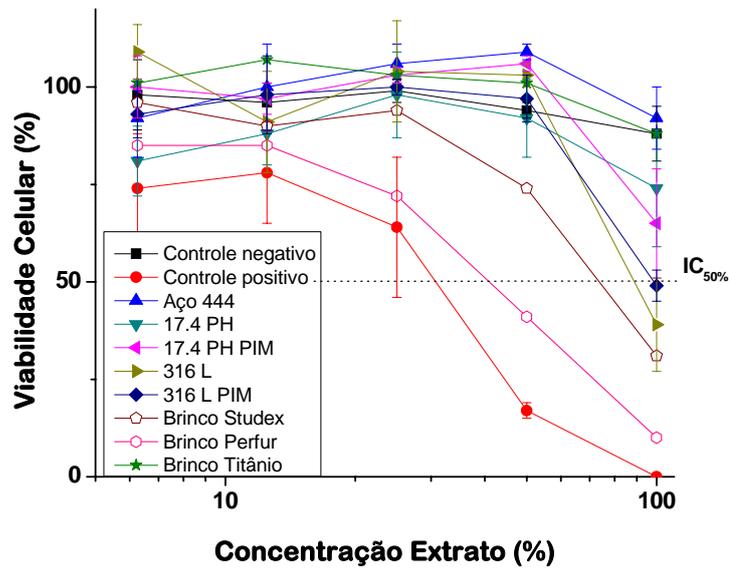
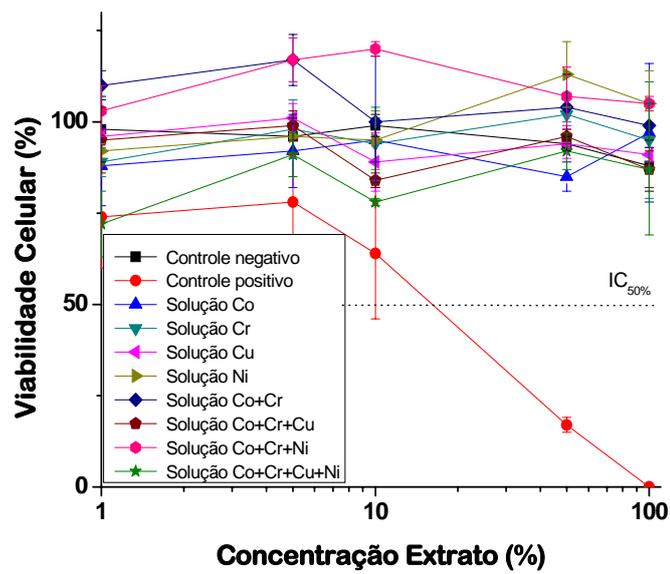


Figura 2



Legendas

Tabela 1. Composição química das ligas metálicas utilizadas como biomateriais pela técnica de análise por ativação com nêutrons.

Tabela 2. Análise dos produtos de corrosão no extrato, por AAN.

Tabela 3. Correlação entre concentração dos elementos Cr, Co e Ni e a percentagem de viabilidade celular no ensaio de citotoxicidade.

Tabela 4. Resultados da percentagem de viabilidade celular de ligas metálicas no ensaio de citotoxicidade pelo método de incorporação do vermelho neutro e da percentagem de formação de colônias celulares no ensaio de citotoxicidade pelo método de inibição de formação de colônias.

Tabela 5. Concentração das soluções dos metais utilizados no ensaio de citotoxicidade.

Tabela 6. Resultados das percentagens de viabilidade celular para diferentes concentrações de metais, no ensaio de citotoxicidade.

Figura 1. Curvas de viabilidade celular de ligas metálicas no ensaio de citotoxicidade pelo método de incorporação do vermelho neutro e curvas de percentagem de formação de colônias celulares no ensaio de citotoxicidade pelo método de inibição de formação de colônias.

Figura 2. Curvas de viabilidade celular das soluções dos metais no ensaio de citotoxicidade pelo método de incorporação do vermelho neutro.