

ANÁLISE CITOTOXICOLÓGICA DE BIOCERÂMICAS PARA USO EM SISTEMAS DE IMPLANTES

Juliana K.M.F.Daguano¹, Claudinei dos Santos¹, Sizue O. Rogero²

¹ Faculdade de Engenharia Química de Lorena - Departamento de Engenharia de Materiais (FAENQUIL-DEMAR) - Polo Urbo-industrial, gleba AI-6, s/n, CEP 12600-970, Caixa Postal 116, Lorena - SP, Brasil.

² IPEN (Instituto de Pesquisas Nucleares)

Av. Prof. Lineu Prestes, 2242, São Paulo-SP, CEP 05508-900, Brasil

Resumo. O objetivo deste trabalho é a caracterização citotóxica de materiais cerâmicos que podem apresentar biocompatibilidade e assim serem usados como componentes em sistemas de implantes. Amostras à base de ZrO_2 , $ZrO_2-Al_2O_3$, Si_3N_4 com AlN/Tr_2O_3 foram submetidas a testes “in vitro” de citotoxicidade para avaliação biológica preliminar. No teste utilizaram-se extratos dos materiais a serem testados em contato com uma cultura de células de mamíferos, e a avaliação da citotoxicidade foi realizada utilizando-se o método de incorporação do corante vital vermelho neutro.

Palavras-chave: Biocerâmicas, Biocompatibilidade, Método de incorporação do corante vital, Teste in vitro.

1. INTRODUÇÃO

A busca por novos materiais biocompatíveis tem estado em alta no campo de pesquisas. Isso devido ao importante papel que estes materiais representam perante as modernas tecnologias de implantes, atualmente desenvolvidas. Dentre os diversos ramos de novos materiais, um que vem se sobressaindo é o de cerâmicas avançadas, principalmente as que visam implantes odontológicos [Anusavice, 2005].

A tendência objetivada nas técnicas de cerâmica dental vem sendo a eliminação da infraestrutura metálica das restaurações, já que as cerâmicas apresentam uma melhor estética. Nesse contexto, cerâmicas que apresentem maior tenacidade à fratura, minimizando sua fragilidade, uma boa biocompatibilidade, alta dureza e resistência ao desgaste, são potenciais substitutos aos materiais metálicos convencionalmente utilizados. Dentre os novos materiais utilizados para alcançar essas propriedades, cerâmicas a base de alumina (Al_2O_3) e zircônia (ZrO_2) se destacam, já que apresentam essa combinação de propriedades requeridas [Hench, 1998, Hench e Wilson, 1993 e Stevens, 1986].

O nitreto de silício (Si_3N_4) e suas soluções sólidas (designadas SiAlONs) vem sendo proposto por sua estabilidade química elevada e por sua boa tenacidade à fratura, o que faz desse cerâmico, um excelente material estrutural capaz de suportar impactos relativamente

elevados [Santos, 2006]. A utilização de cerâmicas a base de alumina (Al_2O_3) e zircônia (ZrO_2) de alta densidade relativa vem sendo proposta, em função da alumina ter apresentado uma excelente biocompatibilidade, alta dureza e resistência ao desgaste, embora, tenha exibido moderada resistência à flexão e tenacidade à fratura [De Aza, 2002]. A zircônia pura não pode ser utilizada na fabricação de peças sem a adição de estabilizantes. A zircônia estabilizada com ítria (Y-TZP) se tornou uma alternativa popular a alumina como cerâmica estrutural uma vez que é também inerte em meio fisiológico, apresenta maior resistência à flexão, maior tenacidade à fratura e menor módulo de elasticidade [Nono, 1990]. Além de suas propriedades mecânicas, a zircônia se torna esteticamente bastante interessante quando polida.

A biocompatibilidade dos biomateriais pode ser avaliada por testes *in vitro* e *in vivo*. Os testes *in vitro* podem não representar a situação real de um implante. Contudo, eles podem promover alguns tipos de resultados preliminares relacionados à interação entre o material e o corpo biológico, de forma rápida e eficiente, minimizando a necessidade de testes em animais. O teste de citotoxicidade “*in vitro*” é classificado na ISO 10993-1 como um teste de avaliação inicial que utiliza técnicas de cultura de células.

No teste de citotoxicidade utilizam-se extratos dos materiais a serem testados em contato com uma cultura de células de mamíferos, em microplacas para cultura celular, de 96 poços, e a avaliação da citotoxicidade foi realizada utilizando-se o método de incorporação do corante vital vermelho neutro. O ensaio de incorporação do vermelho neutro é um teste *in vitro* eficaz, de baixo custo, reproduzível e quantitativo para selecionar substâncias potencialmente tóxicas. Está baseado no fato de que o vermelho neutro é um corante solúvel em água e que passa através da membrana plasmática e se concentra nos lisossomos de células vivas onde se fixam por ligações eletrostáticas hidrofóbicas com sítios aniônicos na matriz lisossomal. Muitas substâncias danificam as membranas celulares e lisossomais resultando no decréscimo de captura e ligação do vermelho neutro. Portanto é possível distinguir entre células vivas e mortas pela medida da intensidade de cor final.

A proposta desse estudo é desenvolver compósitos à base de $\text{ZrO}_2\text{-Al}_2\text{O}_3$ e Si_3N_4 , e realizar uma caracterização biológica primária (testes *in vitro* de citotoxicidade), utilizando cultura de células; visando a futura confecção de componentes para implantodontia.

2. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Processamento. Os pós de ZrO_2 estabilizada com 3% mol de ítria, apresentando 80% de fase monoclinica residual, TZ-3YSB (Tosoh-Japão) e Al_2O_3 (SG-1000 - Almatix, grupo Alcoa) foram usados como matérias-primas. Foram preparadas misturas contendo 0, 10, 20 e 30% em peso de Al_2O_3 misturado a ZrO_2 .

As misturas de pós foram preparadas via úmido, em moinho de atrito por 4h usando álcool isopropílico como meio e utilizando bolas de ZrO_2 sinterizada com diâmetro médio de 2mm. Após a moagem, as misturas de pós foram secadas em estufa a 90°C por 24h, e em seguida, desaglomeradas e prensadas uniaxialmente a frio sob pressão de 80 MPa.

Amostras com aproximadamente 15 mm foram compactadas e sinterizadas a 1500 e 1600°C . As taxas de aquecimento variaram em função da temperatura alcançada, que foram $10^\circ\text{C}/\text{min}$ até 1100°C , $5^\circ\text{C}/\text{min}$ até 1400°C e $3^\circ\text{C}/\text{min}$ até a temperatura desejada. A taxa de resfriamento foi de $5^\circ\text{C}/\text{min}$ até 1400°C e de $3^\circ\text{C}/\text{min}$ até 1100°C , com o resfriamento feito de forma automática pelo forno. O patamar de sinterização foi de 120 minutos.

Os procedimentos experimentais do material à base de SiAlON ($\text{Si}_3\text{N}_4\text{-AlN-TR}_2\text{O}_3$) são descritos em detalhes em trabalhos anteriores [Santos, 2004].

Avaliação Biológica. Os testes *in vitro* para a análise da citotoxicidade, através do método de incorporação do Vermelho Neutro, foram realizados de acordo com a [ISO 10993-5].

Amostras dos materiais foram esterilizadas e adicionadas em Meio Mínimo de Eagle (MEM) na proporção de 1 cm²/ml e incubado por 48h a 37°C. Diluições seriadas foram feitas dos extratos de amostras, de Al₂O₃ (controle negativo) e de solução de fenol 2% (controle positivo).

Para o preparo da suspensão celular, primeiramente houve o cultivo das células NCTC-clone L929 de tecido conectivo de camundongo, originária da American Type Culture Collection [ATCC-(CCL1)], em garrafa de cultura celular, em meio de cultura Meio-uso. Após crescimento confluyente a cultura foi tratada com solução ATV (Tripsina 0,2% e Versene 0,02%), para o destaque das células. O número de células foi contado em hemocitômetro e a suspensão celular foi acertada para cerca de 5x10³ a 5x10⁴ células por mL.

O preparo da microplaca consistiu na realização de uma suspensão celular de NCTC – clone L929 da ATCC-CCL1, de 2,5x10⁵ células/mL e distribuição de 200µL em cada poço (5x10⁴ céls/poço). A placa foi incubada em estufa úmida a 37°C e atmosfera com 5% CO₂ por cerca de 24h, para atingir a confluência desejada.

O ensaio propriamente dito foi realizado através da adição de 200µL de cada diluição do extrato em contato com as células aderidas em cada poço, em triplicata. Controles positivo e negativo receberam o mesmo procedimento da amostra, com concentrações de extrato de: 1= 100%; 2= 50%; 3= 25%; 4= 12,5% e 5= 6,25%. Os poços com controle de células receberam Meio-uso e este controle corresponde a 100% de sobrevida celular.

A placa foi então mantida em estufa úmida a 37°C e atmosfera com 5% CO₂ por 24h. Decorrido este período os meios foram trocados por Meio-uso fresco contendo 50µg do corante vermelho neutro/mL e a placa foi incubada por 3h para a incorporação do corante. Após esta etapa a placa foi lavada duas vezes com PBS e uma vez com a solução de lavagem e em seguida cada poço recebeu 200µL da solução de extração. A placa foi levada para espectrofotômetro leitor de ELISA e após ser agitada por 10 min foi realizada leitura de densidade óptica em 540nm.

Por último, foi calculada a média das leituras de densidade óptica de cada diluição e feita a comparação com a média do controle de células (100%), obtendo-se a % de sobrevida das células em cada diluição. Projetando-se em gráfico a % de sobrevida em função da diluição do extrato obteve-se uma curva, na qual pode ser encontrado o índice de citotoxicidade (IC_{50%}) do material. IC_{50%} significa a concentração do extrato que lesa ou mata 50% da população celular no ensaio de citotoxicidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A avaliação biológica é realizada através da incorporação do corante Vermelho Neutro, através das membranas citoplasmáticas e lisossomais das células que estavam em contato com o material em estudo, no caso o composto ZrO₂ - Al₂O₃ e cerâmicas à base de Si₃N₄.

A leitura de densidade óptica do material realizada no leitor de Elisa, é comparada com a média do controle celular, considerada 100% de viabilidade celular no ensaio. O controle positivo e o negativo são utilizados para verificar a eficácia do ensaio de citotoxicidade. O controle negativo utilizado deve ser um material que não cause dano nas células em cultura, i.e. deve ser atóxico enquanto que o controle positivo deve ser um material que cause dano celular, deve causar citotoxicidade. Através da placa utilizada nesse ensaio, podemos verificar que onde há maior morte celular (controle positivo em concentração de extrato 100%) a

coloração torna-se transparente, pois não há captura do corante; caso contrário, micropoços onde há células vivas, a coloração é rosada.

Projetando-se a média da porcentagem de sobrevivência das células em função da concentração de extrato(%), obtêm-se uma curva que fornece o índice de citotoxicidade (IC_{50}). Na Figura 1, mostra-se o resultado obtido para amostras de zircônia-alumina sinterizadas em diversas composições de $ZrO_2-Al_2O_3$ (90:10, 80:20 e 70:30).

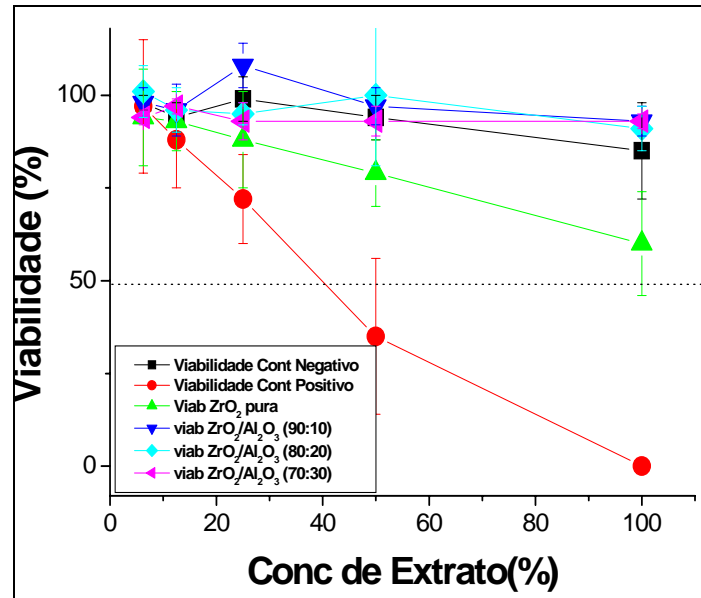


Figura 1 – Ensaio de citotoxicidade: Análise das amostras de $ZrO_2-Al_2O_3$ em diferentes composições (90:10), (80:20), (70:30) e ZrO_2 pura.

Essa análise mostrou resultados promissores, pois as amostras apresentaram comportamento semelhantes ao controle negativo, ou seja, não apresentaram toxicidade. Desta forma, é possível afirmar que os compósitos cerâmicos desenvolvidos nesse trabalho não causam morte ou prejuízo à população celular, sendo, portanto caracterizado como não citotóxico. Além disso, através deste teste, garante-se que não houve contaminação em quantidade significativa durante o processamento, não comprometendo o experimento.

Na figura 2, mostra-se o resultado obtido para amostras de zircônia-alumina sinterizadas em temperaturas diferentes.

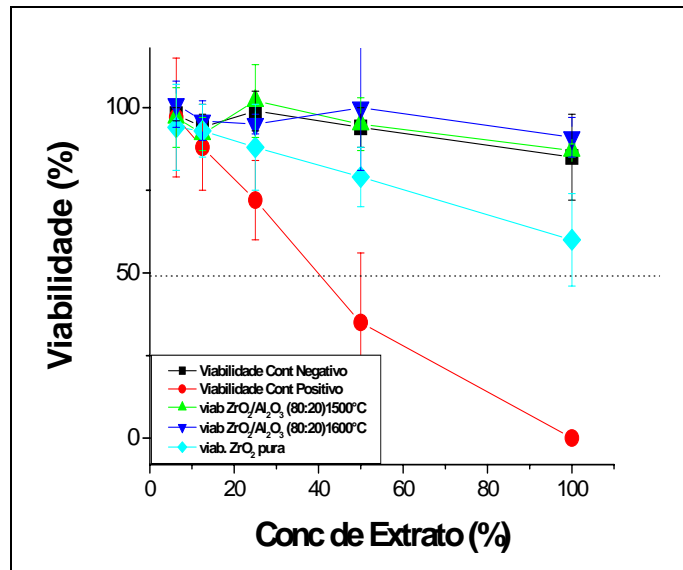


Figura 2 – Ensaio de citotoxicidade: análise das amostras de ZrO₂-Al₂O₃ (80:20) sinterizadas a 1500° e 1600°C.

Essa análise mostrou um ótimo resultado, demonstrando que não há diferença na citotoxicidade entre os materiais sinterizados em diferentes temperaturas e nenhum material mostrou citotoxicidade, exceto o controle positivo.

Outro material analisado foi o Si₃N₄ sinterizado com AlN/Tr₂O₃, em três diferentes composições. Esses materiais estão sendo estudados visando sua aplicação como componentes de implantes devido a sua boa resistência à fratura, ao desgaste, além de inércia química em meios aquosos [Guedes, 2004]. Este material também demonstrou biocompatibilidade não apresentando efeito tóxico no ensaio *in vitro* de citotoxicidade, sendo, portanto, promissor para aplicação como implantes. Observe figura 3:

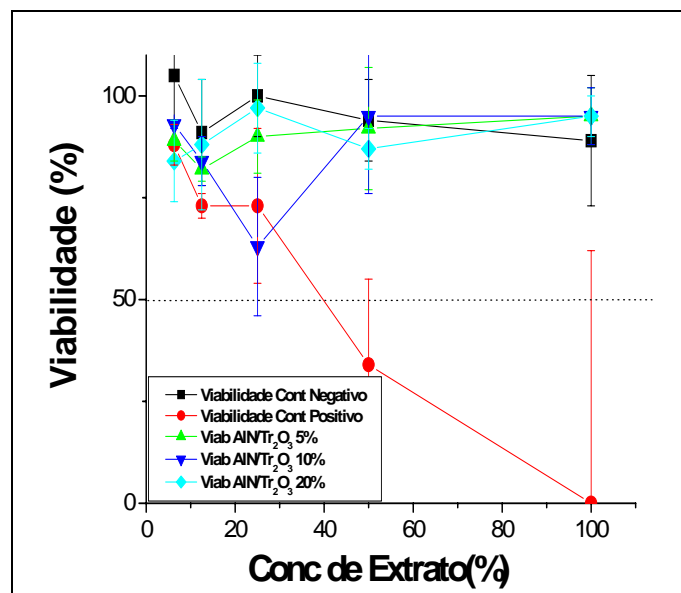


Figura 3 – Ensaio de citotoxicidade: análise das amostras de Si₃N₄ sinterizado com AlN/Tr₂O₃, em adições de 5, 10 e 20%.

CONCLUSÕES

Os testes de citotoxicidade apresentaram ótimos resultados, mostrando que os materiais em estudo apresentam grande tendência a serem materiais biocompatíveis. Este fato é muito importante uma vez que são procurados materiais para posterior aplicação em próteses dentárias ou implantes.

Na avaliação biológica, constatou-se também que o tempo de sinterização (1500°C ou 1600°C) e a composição do material $ZrO_2-Al_2O_3$ (90:10, 80:20 e 70:30) não apresentaram interferências significativas nos resultados, sendo assim, o material apresentou ótimas características biológicas em qualquer uma dessas condições. Essas mesmas conclusões podem ser observadas no Si_3N_4 sinterizado com AlN/Tr_2O_3 .

AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer ao IPEN e à FAPESP, pelo apoio e incentivo à realização do trabalho processo 05/51485-8.

REFERÊNCIAS

- Anusavice, K. J., *Phillips, materiais dentários*, 645 p., 11ª ed., 2005
- De Aza, A.H., Chevalier, J., Fantozzi, G. et al. **Crack growth resistance of alumina, zirconia and zirconia toughened alumina ceramics for joint prostheses**. *Biomaterials*, 23, , p. 937-945, 2002.
- Hench, L.L., *Bioceramics*, J Am Ceram Soc. 1998; 81(7): 1705-1728.
- Hench, L.L.; Wilson, J. *An Introduction to Bioceramic*. Singapura: World Scientific, 1993. Cap 1, p.1-23. (Advanced Series in Ceramics, 1).
- International Organization For Standardization. ISO 10993-1. *Biological evaluation of medical devices. Part 1: Guidance on selection of tests*. 1993. 29
- International Organization For Standardization. ISO 10993-6. *Biological evaluation of medical devices. Part 6: Tests for local effects after implantation*. 1993.
- Guedes e Silva, C.C. O., Higa, Z., Bressiani, J.C. **Cytotoxic evaluation of silicon nitride-based ceramics**. *Materials Science and Engineering C* 24 (2004) 643–646.
- Nono, M.C.A., **Cerâmicas à base de zircônia tetragonal policristalina do sistema CeO_2-ZrO_2 (Ce-TZP)**, S.J.Campos-SP, ITA-CTA, 1990, Tese de doutorado.
- Rogero, S.O.; Lugão, A.B.; Ikeda, T.I.; Cruz, A.S. **Teste in vitro de citotoxicidade: Estudo comparativo entre duas metodologias**. *Mater. Res.* 6(3) (2003) 317-320.
- Santos, C., Souza, J.V.C., Kelly, C.A., Silva, O.M.M. **Development of a-SiAlON-SiC ceramic composites by liquid phase sintering**. *International Journal of Refractory Metals & Hard Materials*, (2006).
- Santos, C., Strecker K., Baldacim, S.A., Silva, O.M.M. Silva, C.R.M. **Properties of hot-pressed, partially stabilized CRE-a-SiAlONs as a function of the additive content**. *International Journal of Refractory Metals & Hard Materials* 22 (2004) 79–85.

CITOTOXICITY ANALYSIS OF BIOCERAMICS FOR USE IN SYSTEMS OF IMPLANTATIONS

Juliana K.M.F.Daguano¹, Claudinei dos Santos¹, Sizue O. Rogero²

¹ Faculdade de Engenharia Química de Lorena - Departamento de Engenharia de Materiais (FAENQUIL-DEMAR) - Polo Urbo-industrial, gleba AI-6, s/n, CEP 12600-970, Caixa Postal 116, Lorena - SP, Brasil.

² IPEN (Instituto de Pesquisas Nucleares)

Av. Prof. Lineu Prestes, 2242, São Paulo-SP, CEP 05508-900, Brasil

Abstract.. *The objective of this work is the cytotoxicity characterization of ceramic materials that can present biocompatibility and thus to be used as component in systems of implantations. Samples to the base of ZrO_2 , $ZrO_2-Al_2O_3$, Si_3N_4 with AlN/Tr_2O_3 had been submitted the “in vitro” tests of cytotoxicity for preliminary biological evaluation. In the test extracts of the materials had been used to be tested in contact with a culture of cells of mammals, and the evaluation of the cytotoxicity was carried through using the neutral red uptake methodology*

Keywords: *Bioceramics, Biocompatibility, neutral red uptake methodology, In vitro test.*