

BIOCOMPÓSITOS DE NITRETO DE SILÍCIO: CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA IN VITRO

C.C. Guedes-Silva¹, A.C.D. Rodas²; C. Ribeiro²; F.M.S. Carvalho³, L.A. Genova¹,
T.S. Ferreira¹, O.Z. Higa¹

¹Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN/CNEN

²Universidade Federal do ABC - UFABC

³Instituto de Geociências - IGC/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 2242, São Paulo - SP, Brazil, 05508-000

cecilia.guedes@ipen.br

Nitreto de silício vêm sendo cada vez mais considerado para aplicações biomédicas devido às suas elevadas propriedades mecânicas, comprovada osteointegração, capacidade bactericida e características radiolucidas. Esse trabalho visa avaliar a potencialidade de cerâmicas de nitreto de silício dopadas com sílica e cálcio em concentrações tais que a fase intergranular seja bioativa, formada por um biovidro livre de fósforo. Amostras com 20% em peso de aditivos foram sinterizadas a 1815°C por 1 h em atmosfera de N₂ e analisadas quanto à densidade aparente, fases cristalinas, morfologia e tamanho dos grãos, e distribuição das fases. Avaliações biológicas por meio de testes de bioatividade em SBF (Simulated Body Fluid), citotoxicidade e adesão de osteoblastos da linhagem MG63 foram realizadas. Os resultados mostraram que as amostras atingiram em torno de 97 % da densidade teórica, elevada transformação $\alpha \rightarrow \beta$ -Si₃N₄ e bioatividade evidenciada pela formação de hidroxiapatita sobre sua superfície após testes em SBF. As amostras apresentaram

comportamento não citotóxico e biocompatível para a propagação de células ósseas humanas in vitro, demonstrando o elevado potencial do material para utilização como componentes e dispositivos protéticos.

Palavras chave: nitreto de silício, biovidro, citotoxicidade, adesão celular

INTRODUÇÃO

Doenças do osso é uma séria condição de saúde que tem impactado diretamente na vida de diversas pessoas, demandando na maioria dos casos reparação óssea com utilização de próteses ou enxertos⁽¹⁾. Atualmente, um dos grandes problemas associados à implantação de próteses ortopédicas (espaçadores intervertebrais, substituição de disco lombar artificial, componentes acetabulares em próteses totais de quadril) está na sua forma de fixação ao osso pré-existente. Isto porque os materiais que satisfazem as propriedades mecânicas necessárias para tais aplicações são bioinertes, que não são capazes de se ligarem quimicamente com o osso⁽²⁾.

O desenvolvimento de materiais bioativos com elevadas propriedades tem sido uma busca constante desde a década de 80^(3,4) a fim de aumentar o tempo de vida do implante final. Biocompósitos de nitreto de silício contendo uma fase bioativa surge como uma potencial solução, considerando os trabalhos sobre a biocompatibilidade e reatividade *in vivo* comprovando que essas cerâmicas podem ser usadas como materiais para aplicações clínicas no campo da cirurgia dos tecidos duros. O bom desempenho do nitreto de silício em ambiente biológico foi evidenciado pela não citotoxicidade⁽⁵⁾, pela capacidade de promover crescimento ósseo intenso e aposição óssea sobre sua superfície quando instaladas em tíbias de coelhos⁽⁶⁾, bem como pela elevada função antibacteriana e melhor osteointegração que implantes de titânio e PEEK (poli-éter-éter-cetona)⁽⁷⁾.

Produzir cerâmicas densas de nitreto de silício com fase vítrea intergranular bioativa se ampara na necessidade de utilização de aditivos que viabilizam o processo de sinterização convencional devido à formação de uma fase líquida que se vitrifica durante o resfriamento. Dessa forma, o presente trabalho visa avaliar as características

microestruturais e comportamento biológico *in vitro* de cerâmicas de nitreto de silício, contendo SiO₂ e CaO como aditivos de sinterização e formadores de fase bioativa.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

Os materiais de partida utilizados nesse trabalho foram: Si₃N₄ (UBE, SN-E10) com mais de 95 % de α-Si₃N₄ e menos de 2 % de oxigênio; Al₂O₃ (99,9 % de pureza, CT 3000SG da Alcoa); SiO₂ (quartzo, 99,9 % de pureza, Sigma-Aldrich) e CaCO₃ (P.A., Vetec).

Métodos

Duas diferentes composições contendo 80 % em peso de Si₃N₄ e 20 % em peso de aditivos foram preparadas (Tabela 1). As composições foram moídas em moinho de alta energia, secas em rotoevaporador, desaglomeradas e compactadas na forma de pastilhas por prensagem uniaxial (50MPa) e isostática a frio (200MPa).

Tabela 1: Composições estudadas (% em peso)

Composição	Si ₃ N ₄	SiO ₂	CaO	Al ₂ O ₃
SC-20	80	12	8	0
SC-SA	80	12	7,7	0,3

Após a compactação, amostras das composições selecionadas foram colocadas em uma cama de pó de Si₃N₄ dentro de um cadinho de grafite e sinterizadas a 1815°C por 1 hora, utilizando forno de resistência de grafite (Thermal Technology) e atmosfera controlada de nitrogênio.

As amostras sinterizadas foram caracterizadas quanto à densidade e porosidade aparentes pelo método de Arquimedes. As fases cristalinas formadas nos contornos de grão e a transformação $\alpha \rightarrow \beta$ -Si₃N₄ foram avaliadas por difratometria de raios X (difratômetro Siemens D5000). A porosidade bem como a morfologia e tamanho dos grãos foram analisados por microscopia eletrônica de varredura (microscópio TM 3000) em amostras polidas e submetidas a ataque por plasma com mistura dos gases SF₆ e O₂.

O comportamento biológico foi avaliado por meio dos testes de citotoxicidade, bioatividade em SBF (Simulated Body Fluid) e adesão de osteoblastos da linhagem MG63. O teste de citotoxicidade foi realizado pelo método indireto conforme sugerido na ISO 10993-5⁽⁸⁾ a fim de avaliar a possível liberação de produtos tóxicos do material. Primeiramente, as amostras foram esterilizadas por calor úmido (autoclave) e imersas em meio de cultura celular, na proporção final de 6cm²/mL de meio de cultura celular, por 72 horas a 37° C para preparação dos extratos. Os extratos foram colocados em placas de cultura com uma monocamada de células Balb/c (2 x 10⁴ células de fibroblastos de embrião de camundongo da linhagem Balb/c) plaqueada 24 horas antes do teste. Os extratos foram deixados em contato com as células por 24 horas. Após este período, os extratos foram retirados e, novo meio de cultura foi adicionado com um corante vital, o MTS. Este corante reage com as células vivas formando um composto colorido que pode ser medido espectrofotometricamente (leitor de ELISA) no comprimento de onda de 492nm. Neste teste, pastilhas de alumina foram usadas como referência negativa e, como referência positiva, pedaços de luva de látex. A densidade óptica das cavidades foi usada para o cálculo da viabilidade celular. Para uma amostra ser considerada não citotóxica, ela deve manter a viabilidade celular acima de 70%, como recomendado na ISO10993-5.

Para a realização da bioatividade, os corpos de prova foram imersos em SBF durante um período de 30 dias e retirados para análises a cada 10 dias de incubação. A caracterização das superfícies foi realizada por microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia por dispersão de energia.

O teste de adesão de osteoblasto da linhagem MG63 foi realizado nos corpos de prova dispostos em placas de cultura para células aderidas. Uma suspensão de células na concentração de 2 x 10⁴ células foi adicionada e o acompanhamento do crescimento

celular foi realizado com a utilização de uma lamínula de vidro, a qual depois foi usada como referência de crescimento. Os corpos de prova e a lamínula ficaram em cultura por 14 dias, após este período, as células foram fixadas com metanol por cinco minutos e submetidas à desidratação final com gradiente de exposição gradual de solução de etanol. As amostras foram finalmente avaliadas por microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura por elétrons retroespalhados (TM 3000)⁽⁹⁾.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Alta densidade relativa e baixa porosidade aparente foram encontradas para as amostras estudadas (Tabela 2), evidenciando que os óxidos de silício e de cálcio adicionados nas quantidades mostradas na Tabela 1 são eficientes como aditivos de sinterização de nitreto de silício. Também por meio da Tabela 2, é possível observar que a adição de alumina não influenciou no comportamento de densificação do material, considerando a similaridade nos valores de densidade e porosidade aparente das amostras SC-20 e SC-SA.

Tabela 2: Densidade relativa (DT) e porosidade aparente (P) das amostras sinterizadas.

Identificação	DT (%)	P (%)
SC-20	96,08 ± 0,69	0,5517 ± 0,1410
SC-SA	96,59 ± 0,37	0,2980 ± 0,2012

A Figura 1 mostra os difratogramas de raios X das amostras, constatando a total transformação $\alpha \rightarrow \beta$ -Si₃N₄ e a cristalização da fase Si₂ON₂ nos contornos de grão dos materiais atribuída ao elevado teor de sílica presente nas amostras. As microestruturas das superfícies polidas e atacadas das amostras podem ser observadas na Figura 2 e são caracterizadas por grãos alongados de β -Si₃N₄ uniformemente distribuídos na fase secundária intergranular.

Ao comparar a viabilidade celular entre as amostras de nitreto de silício e do controle negativo pelos resultados do teste de citotoxicidade na Figura 3, verifica-se que ambas as composições são não citotóxicas, embora a amostra SC-20 tenha apresentado uma viabilidade celular maior que a do controle positivo. Isto se explica pelo fato de haver formação de nano precipitado que não é possível de ser retirado por filtração e ocorre forte aderência no fundo da placa, promovendo assim, um leve aumento no valor da absorção determinada pelo aparelho.

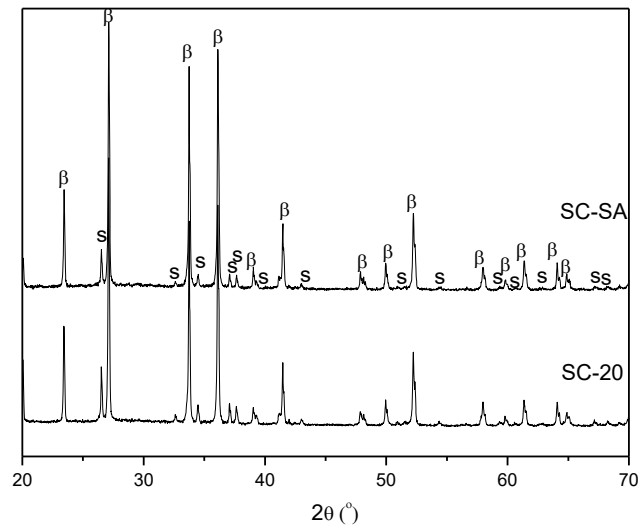


Figura 1: Difratomogramas de raios X das amostras. S é a fase Si₂ON₂ e β é a fase β-Si₃N₄.

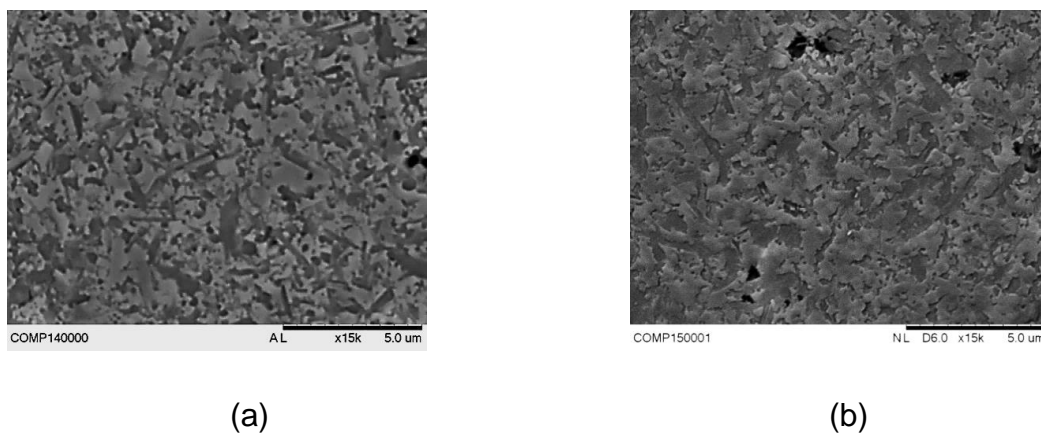


Figura 2: Micrografias eletrônicas de varredura da superfície polida e atacada das composições (a) SC-20 e (b) SC-AS.

As micrografias eletrônicas de varredura por elétrons secundários das amostras submetidas a teste de bioatividade (Figura 4) indicam que a partir do 10º dia em SBF, houve a formação de uma camada superficial contendo estruturas esféricas, apresentando aumento gradual com o tempo de imersão. A presença de cálcio e fósforo identificada por espectroscopia de energia dispersiva indica que tais estruturas são relacionadas a depósitos de fosfato de cálcio (Figura 5), evidenciando a bioatividade dos materiais.

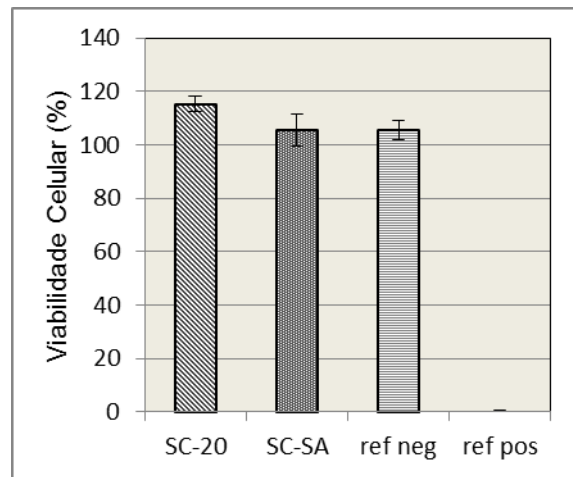


Figura 3: Viabilidade celular (%) de fibroblastos de camundongo Balb/c com as amostras de nitreto de silício.

Ainda comparando as superfícies das amostras imersas por 10 dias em SBF, verifica-se que a amostra SC-SA apresenta maior quantidade de depósitos de fosfato de cálcio que a amostra SC-20, o que sugere que a presença de alumina influenciou o processo de troca iônica com a solução, mas não interferiu na bioatividade do material.

Análises por microscopia óptica das amostras após contato com cultura celular (Figura 6) mostram a presença de uma camada celular sobre as amostras de nitreto de silício, sugerindo que as células osteoblásticas foram capazes de aderir e proliferar na superfície desses materiais em até 14 dias de cultura, quando foi interrompido o experimento.

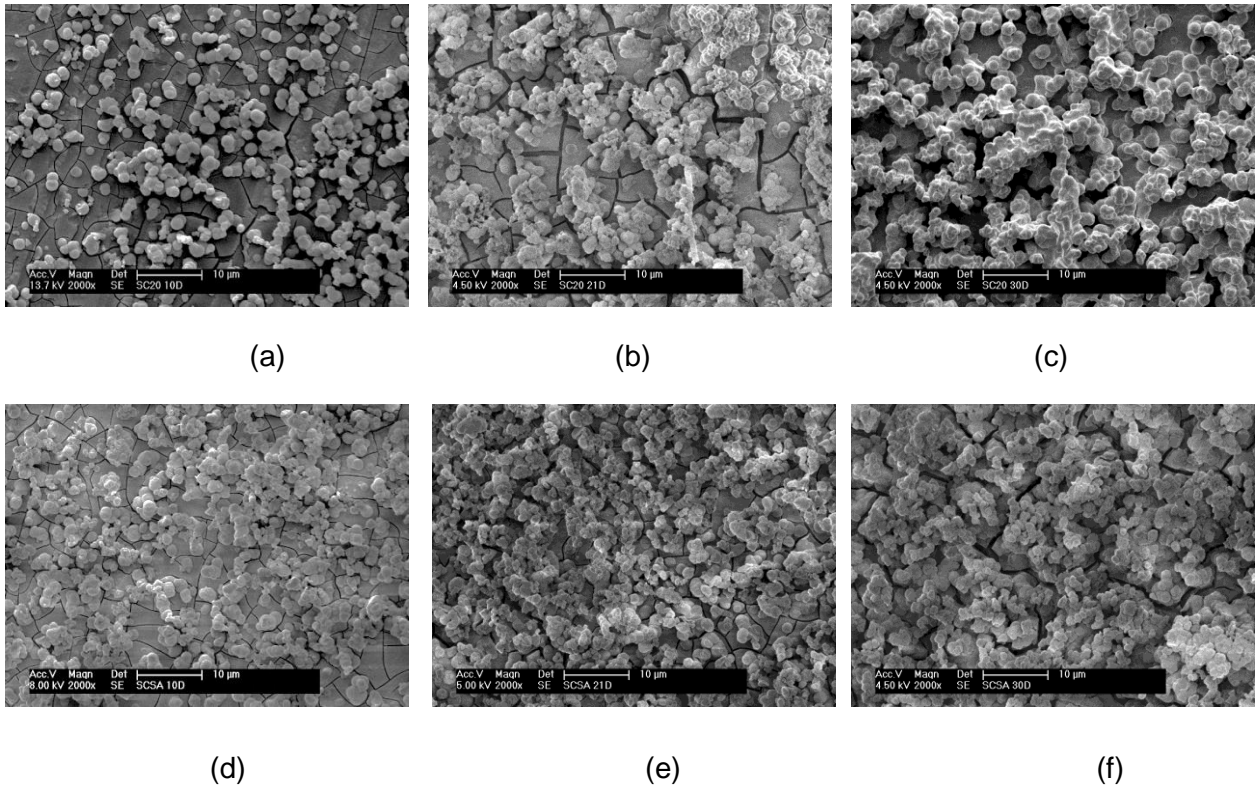


Figura 4: Imagens das amostras submetidas a teste de bioatividade em SBF após 10, 20 e 30 dias de imersão. (a) SC-20/10 dias; (b) SC-20/20 dias; (c) SC-20/30 dias; (d) SC-SA/10 dias; (e) SC-SA/20 dias; (f) SC-SA/30 dias.

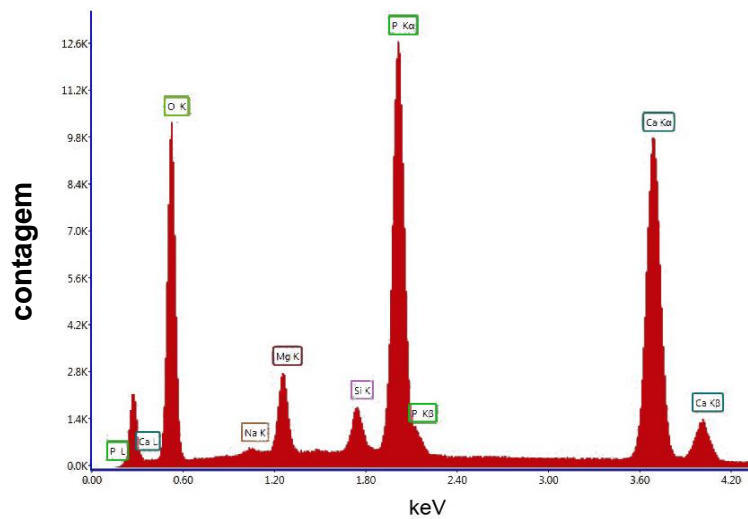


Figura 5: Espectro obtido por EDS, mostrando a composição química dos depósitos esféricos sobre a superfície das amostras e formados após teste de bioatividade por 30 dias.

A partir das micrografias eletrônicas de varredura por elétrons retroespalhados das amostras submetidas à cultura celular por 14 dias (Figura 7), é possível notar diferenças no padrão de crescimento celular nas duas composições estudadas. A amostra SC-20 promoveu um crescimento celular intenso, semelhante a um tapete, enquanto a amostra SC-SA submetida ao teste de cultura por 14 dias, apresentou uma camada celular caracterizada por células osteoblásticas mais isoladas, possibilitando observar inclusive seus prolongamentos citoplasmáticos.

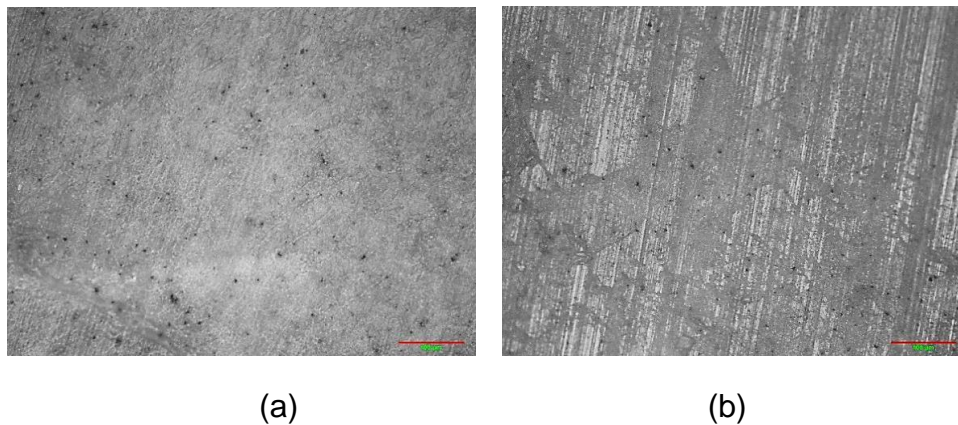


Figura 6: Imagens obtidas por microscopia óptica da camada celular presente na superfície dos implantes após 14 dias de cultura. (a) SC-20 e (b) SC-SA.

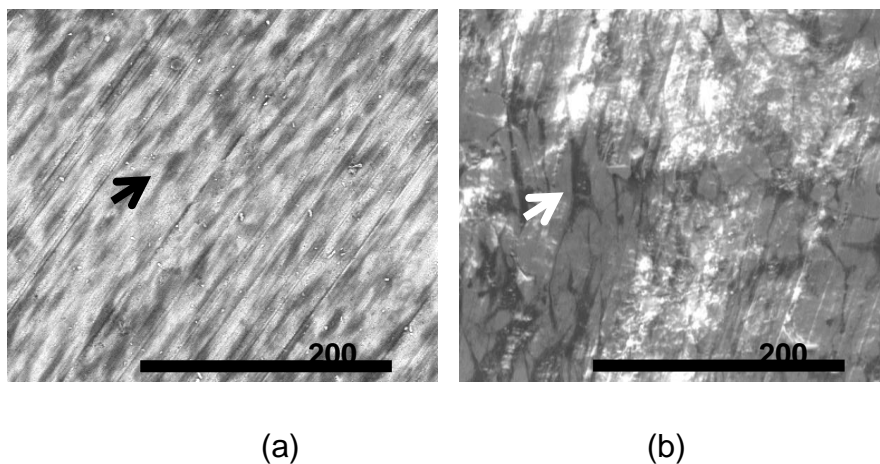


Figura 7: Morfologia celular das superfícies analisadas após 14 dias de cultura celular: (a) SC-20. A seta preta aponta para um ponto escuro característico de núcleo celular. Todos os pontos visíveis também são núcleos celulares; e (b) SC-SA. A seta branca aponta uma célula aderida à pastilha sem contato com as outras células.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos mostraram que a adição de sílica e cálcia, com ou sem a presença de alumina e nas quantidades e condições experimentais aqui utilizadas, favoreceu a formação de compósitos cerâmicos densos caracterizados por grãos alongados de β - Si_3N_4 distribuídos em uma fase secundária intergranular, contendo a fase Si_2ON_2 .

As amostras analisadas mostraram-se não citotóxicas e capazes de formar depósitos de fosfato de cálcio quando submetidas a testes de imersão em SBF, demonstrando a bioatividade das superfícies. Durante os 14 dias de cultura, as células osteoblásticas sofreram adesão e proliferação sobre a superfície das amostras, evidenciando o potencial dos compósitos desenvolvidos para aplicação em componentes e dispositivos para regeneração óssea.

REFERÊNCIAS

1. KOKUBO, T.; KIM, H.M.; KAWASHITA, M. Novel bioactive materials with different mechanical properties. *Biomaterial*
2. KOKUBO, T. Biocative glass ceramics: properties and applications. *Biomaterials*, v. 12, p. 155-163, 1991.
3. NAKAMURA, T.; YAMAMURO, T.; SHOICHIRO, H.; KOKUBO, T.; ITOO, S. A new glass-ceramic for bone replacement: Evaluation of its bonding to bone tissue. *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 19, p. 685-689, 1985.
4. HÖLAND, W.; VOGEL, W.; NAUMANN, K.; GUMMEL, J. Interface reactions between machinable bioactive glass-ceramics and bone. *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 19, p. 303-312, 1985.
5. WEBSTER, T.J., PATEL, A.A., RAHAMAN, M.N., SONNY BAL, B. Anti-infective and osteointegration properties of silicon nitride, poly(ether etherketone), and titanium implants. *Acta Biomaterialia*, v. 8, p. 4447–4454, 2012.

6. GUEDES e SILVA; HIGA, O.Z.; BRESSIANI, J.C. Cytotoxic evaluation of silicon nitride based ceramics. *Materials Science & Engineering C*, v. 24, n. 5, pp. 643-646, 2004.
7. GUEDES e SILVA; KONIG, Jr.; CARBONARI, M.J.; YOSHIMOTO, M.; ALLEGRINI, Jr., S.; BRESSIANI, J.C. Tissue response around silicon nitride implants in rabbits, v. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, v. 84A, p. 337-343, 2008.
8. International Organization For Standardization.(2009), ISO 10993-5; Biological evaluation of medical devices -- Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. Switzerland.
9. AMARAL, M.; COSTA, M.A.; LOPES, M.A.; SILVA, R.F.; SANTOS, J.D.; FERNANDES, M.H. Si₃N₄-bioglass composites stimulate the proliferation of MG63 osteoblast-like cells and support the osteogenic differentiation of human bone marrow cells. *Biomaterials*, v. 23, p. 4897-4906, 2002.

ABSTRACT

SILICON NITRIDE BIOCOMPOSITES: CHARACTERIZATION AND IN VITRO BIOLOGICAL EVALUATION

Silicon nitride has been increasingly considered for biomedical applications owing to their high mechanical properties, osseointegration, bactericidal capacity and radiolucent characteristics. This study aims to evaluate the potential of silicon nitride ceramics containing silica and calcia in appropriate concentrations to have a bioactive intergranular phase, formed by a bioglass without phosphorus. Samples with 20 wt.% additives were sintered at 1815°C for 1 h under N₂ atmosphere and analyzed in regard to density, crystalline phases, morphology and grain size as well as phases' distribution. Biological assessments by means of bioactivity tests in SBF (Simulated Body Fluid), cytotoxicity and osteoblast adhesion of MG63 cell line were performed. The results showed that samples reached around 97% of the theoretical density, high $\alpha \rightarrow \beta$ -Si₃N₄ transformation and bioactivity evidenced by apatite formation on samples surface after testing in SBF. Silicon nitride samples exhibited non-cytotoxic and biocompatible

behavior for propagation of human bone cells *in vitro*, demonstrating the high potential to be used as prosthetic devices and components.

Keywords: silicon nitride, bioglass, cytotoxicity, cell adhesion

AGRADECIMENTOS

Projeto FAPESP 15/02265-7.