

Avaliação da Citotoxicidade de Biocerâmicas Desenvolvidas para uso em Sistemas de Implantes

J. K. M. F. Daguano¹, C. Santos¹, S. O. Rogero²

¹ Departamento de Engenharia de Materiais DEMAR/USP-EEL
CP: 116. Pólo Urbo-Industrial, Gleba AI6, Lorena, SP. CEP: 12600-000
e-mail: ju_daguano@yahoo.com.br, claudinei@demar.faequil.br

² IPEN (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares)
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242, São Paulo-SP, CEP 05508-000, Brasil
e-mail: sorogero@ipen.br

RESUMO

O objetivo deste trabalho é caracterizar a citotoxicidade 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 (linhagem celular NCTC-clone L929), assim como extratos dos controles positivo (solução de fenol) e negativo (pellets de PVC atóxico). A avaliação da citotoxicidade foi realizada utilizando-se o método de incorporação do corante vital vermelho neutro. Os resultados obtidos demonstraram que os materiais em análise não apresentaram caráter citotóxico, independentemente do tempo de sinterização utilizado e da composição de cada amostra. Dessa forma, estes materiais são fortes candidatos a terem aplicação em sistemas de implantes.

Palavras chave: Biocerâmicas, biocompatibilidade, método de incorporação do corante vital, teste in vitro.

Cytotoxicity Analysis of Bioceramics for use in Systems of Implantations

ABSTRACT

The objective of this work was the cytotoxicity characterization of ceramic materials that can present biocompatibility and thus to be used as component in implantations systems. Samples based on ZrO_2 , $ZrO_2-Al_2O_3$, Si_3N_4 with AlN/Tr_2O_3 were submitted the “in vitro” cytotoxicity tests for preliminary biological evaluation. In the tests, extracts of the materials were used to be tested in contact with a mammalian cell culture (NCTC-clone L929 cell line) as positive (phenol solution) and negative (no toxic PVC pellets) extracts controls. The cytotoxicity evaluation was carried through using the neutral red uptake methodology. The obtained results showed that the analyzed materials independent of sample composition or sintering time did not present cytotoxic character. So, these materials are strong candidates to be applied in implantation systems.

Keywords: Bioceramics, biocompatibility, neutral red uptake methodology, in vitro test.

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, vários estudos vêm sendo realizados visando a obtenção de novos materiais biocompatíveis, 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 [1].

A tendência objetivada nas técnicas de cerâmica dental vem sendo a substituição da infra-estrutura metálica das restaurações por materiais cerâmicos, já que as cerâmicas apresentam uma melhor estética. Nesse contexto, cerâmicas que possuam uma boa tenacidade à fratura, 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 [2-4].

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 [5]. 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 [6]. 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 [7]. Além de suas propriedades mecânicas, a zircônia se torna esteticamente bastante interessante quando polida.

A biocompatibilidade dos materiais 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 pode ser 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 lisosomas de células vivas onde se fixa por ligações eletrostáticas nos sítios aniônicos da matriz lisosomal. Muitas substâncias danificam as membranas celulares e lisosomais 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 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2.1 Processamento

Os pós de ZrO_2 estabilizada com 3% mol de ítria, apresentando 20% de fase monoclinica residual, TZ-3YSB (Tosoh-Japão) e Al_2O_3 (SG-1000 - Almatis, 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. Os compactos foram sinterizados a 1500 e 1600°C. As taxas de aquecimento variaram em função da temperatura alcançada, que foram 10°C/min até 1100°C, 5°C/min até 1400°C e 3°C/min até a temperatura desejada. As taxas de resfriamento foram de 5°C/min até 1400°C e de 10°C/min até temperatura ambiente. 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 [5].

2.2 Avaliação Biológica

Os testes *in vitro* para a análise da citotoxicidade, através do método de incorporação do vermelho neutro, descrito em publicação anterior, onde foi feito uma comparação entre o método de difusão em agar e esta metodologia, com diferentes tipos de materiais: polimérico, metálico e cerâmico [8], foram realizados de acordo com a norma ISO 10993-5 [9].

Amostras dos materiais foram esterilizadas e adicionadas em Meio Mínimo de Eagle (MEM) na proporção de 1 cm^2/mL e incubado por 48h a 37°C. Diluições seriadas foram feitas dos extratos de amostras, de Al_2O_3 (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 (75cm^2), em meio de cultura composto por Meio de Eagle (MEM) com adição de

10% de soro fetal bovino, aminoácidos não essenciais e piruvato de sódio (Meio-uso). Após confluência, a cultura foi tratada com solução ATV (Tripsina 0,2% e Versene 0,02%), para o destaque das células. A densidade celular foi avaliada em hemocítômetro e a suspensão celular foi ajustada para cerca de 5×10^3 a 5×10^4 células por mL.

O preparo da microplaca consistiu na realização de uma suspensão celular de NCTC - clone L929 da ATCC-CCL1, de $2,5 \times 10^5$ células/mL e distribuição de 200 μ L em cada poço (5×10^4 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 200 μ L 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, isto é, meio de cultura composto por Meio de Eagle (MEM) com adição de 10% de soro fetal bovino, aminoácidos não essenciais e piruvato de sódio. Este controle corresponde a 100% de sobrevivência 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 50 μ g 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 200 μ L de solução de extração, sendo esta solução constituída por 1% de ácido acético e 50% de etanol. A placa foi levada para leitor de ELISA com filtro de 540nm e filtro de referência de 620nm, 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 sobrevivência das células em cada diluição. Projetando-se em gráfico a % de sobrevivência 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 RESULTADO E DISCUSSÃO

A avaliação biológica foi realizada através da incorporação do corante Vermelho Neutro, através das membranas citoplasmáticas e lisossomais das células que estavam em contato com as soluções de extrato dos materiais 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, ou seja, deve ser citotóxico. Através da intensidade da cor presente nos micropoços da placa utilizada nesse ensaio, contendo células tratadas com diferentes diluições do extrato de cada material, pode-se 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%} (índice de citotoxicidade relativo à morte de 50% das células). Na Figura 1, mostra-se o resultado obtido para amostras de ZrO₂-Al₂O₃ sinterizadas em diversas composições (90:10, 80:20 e 70:30).

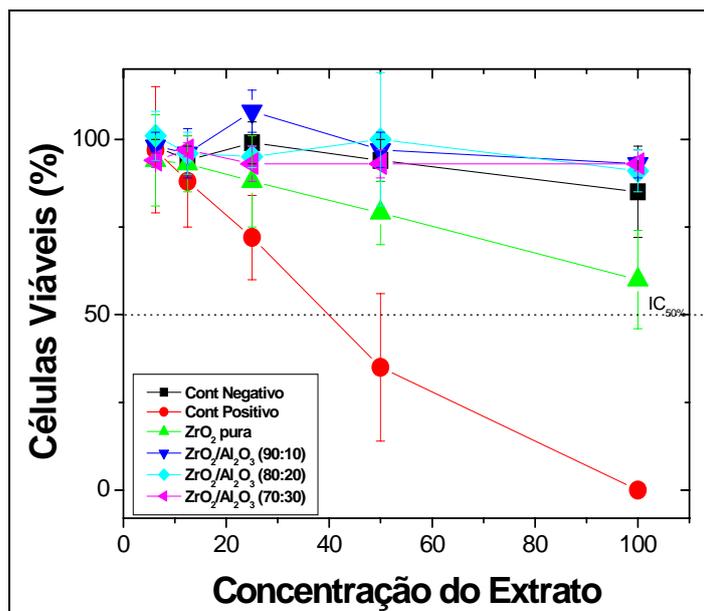


Figura 1: Ensaio de citotoxicidade: Análise das amostras de ZrO₂-Al₂O₃ em diferentes composições (90:10), (80:20), (70:30) e ZrO₂ pura.

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

Na figura 2 são apresentados os resultados obtidos para amostras de ZrO₂-Al₂O₃ na proporção de 80:20 (% em peso), sinterizadas em temperaturas diferentes. 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.

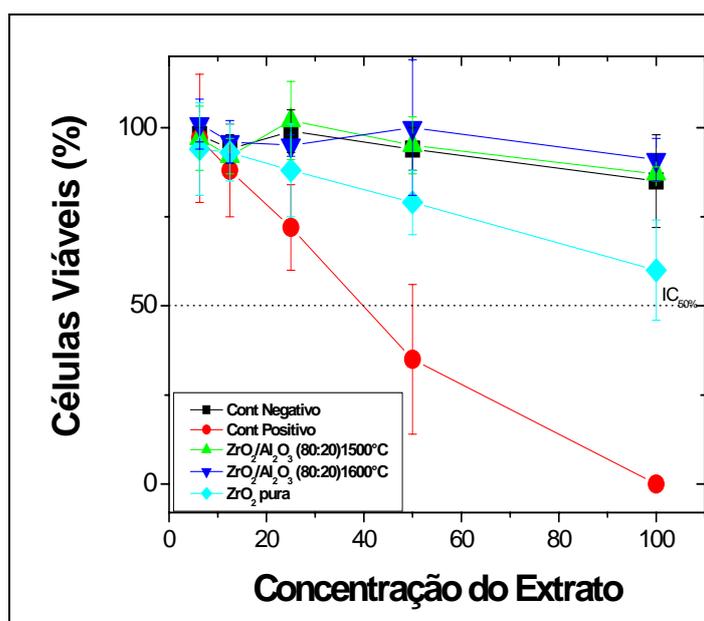


Figura 2: Ensaio de citotoxicidade: análise das amostras de ZrO₂-Al₂O₃ (80:20) sinterizadas a 1500° e 1600°C.

Nas Figuras 1 e 2 pode ser observado que a ZrO_2 pura apresentou curva de viabilidade celular mais baixa, nas regiões de concentração do extrato de 50 a 100%, em relação ao controle negativo e as amostras de $ZrO_2-Al_2O_3$ em diferentes proporções e sinterização em diferentes temperaturas. Este fato nos leva a concluir que durante os processos foi eliminado algum elemento ou substância que causava um nível muito baixo de toxicidade nas células do ensaio, nível este aceitável como não citotóxico no ensaio.

Outro material analisado foi o Si_3N_4 sinterizado com AlN/Tr_2O_3 , 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 [10]. A Figura 3 apresenta os resultados dos testes de citotoxicidade desse material cerâmico. Este material também demonstrou biocompatibilidade não apresentando efeito tóxico no ensaio *in vitro* de citotoxicidade, sendo, portanto, promissor para aplicação como implantes.

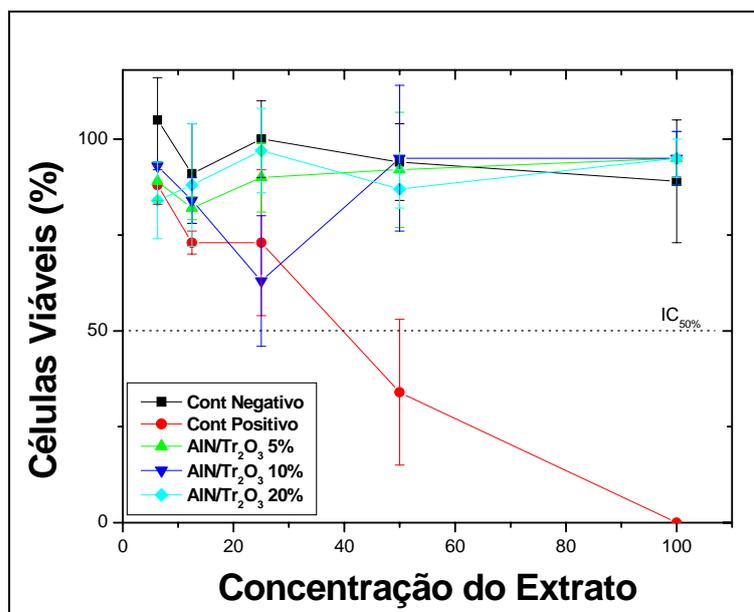


Figura 3: Ensaio de citotoxicidade: análise das amostras de Si_3N_4 sinterizadas com AlN/Tr_2O_3 , em adições de 5, 10 e 20% em volume.

Pode ser observado que todas as amostras testadas apresentaram curvas de viabilidade celular acima da linha do índice de citotoxicidade (Fig. 1, 2 e 3), indicando que estas amostras não mostraram efeitos citotóxicos. As amostras são consideradas tóxicas quando apresentam a curva de viabilidade celular abaixo da linha do $IC_{50\%}$ ou quando cruzam a linha, onde pode ser obtido o índice de citotoxicidade da amostra. Pode ser observado que somente o controle positivo mostrou-se tóxico, sua curva de viabilidade celular cruzou a linha correspondente a 50% de viabilidade, onde pode ser obtido o $IC_{50\%}$ de cerca de 42, indicando que o extrato do controle positivo, na diluição de 42% provocou a morte de metade da população celular no ensaio.

4 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 ($1500^{\circ}C$ ou $1600^{\circ}C$) 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 .

5 AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer Ao IPEN e a FAPESP (processo 04/04386-1 e 05/51485-8) pelo apoio e incentivo financeiro à realização do trabalho.

6 BIBLIOGRAFIA

- [1] ANUSAVICE, K.J., *Phillips, materiais dentários*, pp. 645, 11^a ed., 2005.
- [2] HENCH, L.L., “Bioceramics”, *Journal of the American Ceramic Society*, v. 81, n. 7, pp. 1705-1728, 1998.
- [3] HENCH, L.L., WILSON, J., “An Introduction to Bioceramic”, In: *Advanced Series in Ceramics, 1*, Singapura: World Scientific, Cap 1, pp. 1-23, 1993.
- [4] STEVENS, R., “An introduction to Zirconia: Zirconia and Zirconia Ceramics”, In: *Magnesium Elektron Publications*, ed. 2, Twickenham: Magnesium elektrum, 1986.
- [5] 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 and Hard Materials*, v. 22, pp. 79–85, 2004.
- [6] 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*, v. 23, pp. 937-945, 2002.
- [7] NONO, M.C.A., “Cerâmicas à base de Zircônia Tetragonal Policristalina do Sistema CeO₂-ZrO₂ (Ce-TZP)”, *Tese D.Sc.*, ITA-CTA, São José dos Campos, S.P, Brasil.
- [8] ROGERO, S.O., LUGÃO, A.B., IKEDA, T.I., CRUZ, A.S., “Teste in Vitro de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre duas Metodologias”, *Material Research*, v. 6, n. 3, pp. 317-320, 2003.
- [9] ISO DOCUMENT 10993-5, *Biological evaluation of medical devices, Part 5, Tests for Cytotoxicity: In Vitro Methods*, 1992.
- [10] GUEDES e SILVA, C.C.O., HIGA, Z., BRESSIANI, J.C. “Cytotoxic evaluation of silicon nitride-based Ceramics”, *Materials Science and Engineering C*, v. 24, pp. 643–646, 2004.