

## **AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE CERÂMICAS DE FOSFATO TRICÁLCICO DOPADAS COM MAGNÉSIO E ZINCO**

K.C. Kai<sup>1,a</sup>, T.F. Cunha<sup>2</sup>, O.Z. Higa<sup>2,b</sup>, J. Marchi<sup>2,c</sup>

<sup>1</sup>Centro de Ciências Naturais e Humanas (CCNH), Universidade Federal do ABC, Santo André (SP), Brasil

<sup>2</sup>Centro de Biotecnologia, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), São Paulo (SP), Brasil  
E-mail: kai.kc@hotmail.com<sup>a</sup>, ozahiga@ipen.br<sup>b</sup>, juliana.marchi@ufabc.edu.br<sup>c</sup>

*Resumo. Doenças ou acidentes podem levar à necessidade de reparação e/ou substituição de tecido ósseo, o que impulsiona o campo dos biomateriais com a finalidade de desenvolver alternativas em enxertos ósseos. O fosfato tricálcico (TCP) pode ser utilizado com sucesso para esta finalidade por ser biocompatível e osteocondutor. TCP é uma cerâmica bioabsorvível gradualmente substituída por um novo osso no organismo. Magnésio (Mg) e zinco (Zn) podem substituir os íons de cálcio (Ca) na estrutura cristalina do TCP. Espera-se que a adição de magnésio melhore as propriedades mecânicas e aumente a estabilidade térmica do TCP, e a adição de zinco resulte em efeitos estimulatórios na formação óssea. Neste trabalho, TCP puro, Mg-TCP, Zn-TCP e MgZn-TCP, com fórmula geral  $(Ca_{1-x}Mg_xZn_x)_3(PO_4)_2$  e  $0 \leq x \leq 0,045$ , foram preparados por síntese via úmida a partir dos precursores  $Ca(OH)_2$  e  $H_3PO_4$ . Após 24h de envelhecimento, o precipitado foi filtrado, lavado e liofilizado. Os pós foram calcinados a 800°C por 1h. Para os testes de citotoxicidade, os pós foram esterilizados com radiação gama (25 kGy). Para obtenção dos extratos, os pós foram colocados em meio de cultura RPMI 1640 e incubados durante 48h, sob agitação a 37 ° C, em atmosfera de 5% de  $CO_2$ , resultando em uma concentração final de 0,2 g/ml. Os extratos foram filtrados e submetidos a cinco diluições em série. A citotoxicidade dos pós sintetizados foi avaliada por ensaio colorimétrico MTS, em uma cultura de linhagem celular de ovário de hamster chinês (CHO-K1). O comportamento de citotoxicidade de todos os pós de TCP foi semelhante e considerado não-citotóxico, indicando que não houve liberação de produtos do processamento de materiais que causam toxicidade para as células. Os resultados sugerem a possibilidade de TCP dopado com magnésio e/ou de zinco ser utilizado como um biomaterial para a regeneração e/ou substituição de tecido ósseo.*

**Palavras-chave:** Fosfato tricálcico, Substituição iônica, Citotoxicidade, Testes in vitro.

### **1. INTRODUÇÃO**

Os ossos e os dentes apresentam função estrutural, de proteção, de locomoção e de mastigação (VALLET-REGI & GONZÁLEZ-CALBET, 2004; BARRÉRE *et al.*, 2008). Os ossos também atuam na proteção de tecidos especializados, como a medula óssea, responsável pela formação do sangue (BARRÉRE *et al.*, 2008). Além disso, atua como local de armazenamento de cálcio e fosfato, estes podendo ser mobilizados a partir da matriz óssea e captados pelo sangue, assim o sistema endócrino atuando para a regulação dos níveis de cálcio e fosfato circulantes (BARRÉRE *et al.*, 2008; ROSS & PAWLINA, 2008).

O esqueleto está sujeito a fraturas resultantes de doenças degenerativas ou ferimentos, o que pode levar a necessidade de reparação ou substituição (WEYAND & SCHROEDER, 2005; BEST *et al.*, 2008; VALLET-REGÍ, 2010). Tecidos de doadores apresentam boa biocompatibilidade, mas por outro lado apresentam os inconvenientes de serem escassos e possuem o risco de transmitir doenças (JARCHO, 1981). Outras desvantagens seriam as questões éticas e religiosas envolvidas quando se trata de transplantes (SANTOS JR. & WADA, 2007).

O fosfato tricálcico (TCP), cuja fórmula geral é  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , pode ser empregado como material para substituição óssea devido a sua biocompatibilidade (VALLET-REGI *et al.*, 2004) e osteointegração, propriedades estas conferidas pela sua composição química similar à do osso (DESCAMPS *et al.*, 2007). O principal desenvolvimento destas cerâmicas é atualmente como uma alternativa aos implantes autógenos e alógenos (LeGEROS, 1991; HENCH & WILSON, 1998), inclusive por não transmitirem patologias infecto-contagiosas, já que no processo de síntese dos fosfatos de cálcio há um controle rígido e sistemático, assim apresentando alto grau de pureza (LEAL, 2006). As cerâmicas de fosfato tricálcico, degradam-se gradualmente no organismo ao longo de um período de tempo e são substituídos por novo tecido ósseo hospedeiro pela ação dos osteoblastos (HENCH, 1996).

A modificação química do  $\beta$ -TCP através de substituições iônicas tem sido bastante estudada, considerando que os principais componentes dos ossos e dos dentes são compostos de uma fase mineral de fosfato de cálcio contendo uma variedade de outros elementos, como os íons hidrogênio-fosfatados, carbonatos, magnésio, sódio e outros elementos presentes em menor quantidade (GROOT, 1993; MAYER *et al.*, 1997; KIM *et al.*, 2003; KANNAN *et al.*, 2010). Além disso, a taxa de regeneração óssea depende de várias propriedades do material implantado, tais como: porosidade, composição e solubilidade (VALLET-REGÍ & GONZÁLEZ-CALBET, 2004).

O magnésio tem sido um dos principais íons estudados como substituinte do cálcio na rede cristalina do fosfato tricálcico para aumentar a resistência mecânica e a estabilidade da fase  $\beta$ -TCP. A dopagem de TCP com magnésio diminui significativamente a solubilidade do material quando comparado ao TCP puro (XUE *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2009). Marchi *et al.* (2007) demonstraram que a adição de magnésio na estrutura cristalina do TCP aumentou a temperatura de transição  $\beta \rightarrow \alpha$  TCP para  $1330^\circ\text{C}$  e acelerou o processo de densificação durante a sinterização do  $\beta$ -TCP. A quantidade de  $\text{Mg}^{2+}$  que pode ser incorporada nos tecidos calcificados com fase apatítica decresce com a calcificação, levando a alterações qualitativas na matriz óssea que determina a sua fragilidade (RAYNAUD *et al.*, 2002). Devido a essas características, quando os íons  $\text{Mg}^{2+}$  são incorporados nas cerâmicas de fosfato de cálcio, é esperado que o comportamento *in vivo* deste material sintetizado seja mais similar ao osso mineralizado, quando comparado com materiais puros, isto é, sem a dopagem com íons magnésio (FEATHESTONE *et al.*, 1983). Testes *in vivo* de hidroxiapatita/TCP dopado com magnésio demonstraram que a biocompatibilidade foi preservada com ausência de citotoxicidade e biodegradação semelhante ao material puro (RYU *et al.*, 2004).

Outro íon estudado como substituinte do cálcio na rede cristalina do TCP é o zinco. O zinco é encontrado em todo o organismo, principalmente em órgãos como os ossos, os dentes e o pâncreas (TAS *et al.*, 1997; FRAGA, 2005). É um importante integrante de diversas metaloenzimas, participando como co-fator de mais de 200 enzimas necessárias para o metabolismo de carboidratos, proteínas e ácidos nucleicos, e síntese protéica (SUITA *et al.*, 1978; TAS *et al.*, 1997). Retardo de crescimento e da maturidade sexual tem sido associados com a deficiência de zinco (JEEJEEBHOY,

2009). O zinco é conhecido por seu efeito estimulatório direto na mineralização do osso *in vitro*, podendo estimular a formação em cultura de células e atuando como um ativador do metabolismo ósseo (YAMAGUCHI et al., 1987). Cerâmica de fosfato tricálcico dopada com zinco (ZnTCP:  $\text{Ca}_{3-x}\text{Zn}_x(\text{PO}_4)_2$ ) mostrou-se biocompatível e um carreador adequado de zinco. A liberação de pequenas quantidades de zinco durante a reabsorção do material cerâmico, por exemplo, estimula a ação dos osteoblastos durante a regeneração óssea, uma vez que osso novo é formado, promovendo a recuperação rápida do hospedeiro (ITO et al., 2002; VALLET-REGÍ & GONZÁLEZ-CALBET, 2004).

O objetivo deste trabalho foi a avaliação da citotoxicidade de cerâmicas a base de fosfato de cálcio dopadas com zinco e/ou magnésio visando o desenvolvimento de um biomaterial mais promissor como substituto ósseo.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

A síntese para a obtenção dos pós foi realizada utilizando-se o método de neutralização de acordo com protocolos já desenvolvidos pelo grupo de pesquisa (MARCHI et al., 2007). Em resumo, hidróxido de cálcio, hidróxido de magnésio e óxido de zinco foram preparados em solução e adicionou-se uma solução aquosa de ácido ortofosfórico a 8 mL/min, sob agitação mecânica para que ocorresse a precipitação. Controlou-se a estequiometria das soluções e o teor das dopagens com magnésio e zinco. As suspensões obtidas foram envelhecidas (24 h), filtradas e liofilizadas, obtendo-se os pós secos de hidroxiapatita deficiente em cálcio (CDHA) dopados.

Para que ocorresse a mudança da fase CDHA para  $\beta$ -TCP, os pós sintetizados foram calcinados em forno Lindenberg/Blue a 800°C/1h. Foram obtidos pós de tricálcio fosfato nas seguintes composições: TCP puro, Zn-TCP (1,125 ou 2,25 mol% Zn), Mg-TCP (2,25 ou 4,5 mol% Mg) e MgZn-TCP (2,25 mol% Mg + 1,125 ou 2,25 mol% Zn).

Os pós calcinados foram analisados por difração de raios-X (DRX, Multiflex, Rigaku), na faixa angular de  $2\theta$  entre 10° e 40°, passo de varredura de 2°/min. Os espectros de difração resultantes foram analisados utilizando-se o programa *Search-Mach* e comparados com o banco de dados PDF-ICDD para identificação das fases presentes. A influência da adição de magnésio e zinco na morfologia dos pós de TCP foi avaliada por Microscopia Eletrônica de Varredura de Alta Resolução (MEV-FEG, JSM 6701S, JEOL).

O teste de citotoxicidade utilizado baseia-se na norma ISO 10993, parte 5. A citotoxicidade por contato indireto foi avaliada por medição baseada no método colorimétrico que utiliza um composto tetrazólio (MTS – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio) para determinação da viabilidade celular (CORY et al., 1991). Primeiramente, 0,8g de pó (calcinados a 800°C/1 hora) de cada composição de TCP esterilizados previamente por radiação gama (25 kGy) foram colocados em meio de cultura RPMI 1640 (*Rowwell Park Memorial Institut*), sem soro, obtendo-se uma concentração final de 0,2 g/mL. Os materiais em meio de cultura foram incubados a 37°C sob atmosfera umidificada contendo 5% CO<sub>2</sub>, por 48 h, sob agitação, para obtenção dos extratos para o teste. Após este período, os extratos foram filtrados com membrana de acetato de celulose. O extrato obtido - 100% de concentração - foi filtrado e submetido a 5 diluições seriadas (50%, 25%, 12,5%, 6,25%).

O teste de extrato *in vitro* foi realizado utilizando-se a linhagem celular CHO-k1 (células de ovário de hamster chinês). A linhagem foi mantida em meio RPMI 1640 estéril suplementado com solução antibiótica-antimicótica (100 unidades/ml de

penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina e 0,025 µg/ml de anfotericina), 2 mM de glutamina e 10% soro fetal bovino, incubadas a 37°C, em atmosfera umidificada contendo 5% CO<sub>2</sub> até atingirem a subconfluência (aproximadamente 90% de utilização da área de cultura). Para a subcultura e para os experimentos, as células foram descoladas do frasco de cultura utilizando-se 0,05% de tripsina e 0,02% de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) em solução tampão salina de fosfato (PBS), pH 7,40.

Em uma placa de cultura de 96 poços foram adicionados 50µL do extrato e suas diluições por poço, em quadruplicata, em cima das células aderidas a placa (6x10<sup>4</sup> células/ml). O controle negativo (com efeito não citotóxico) foi o polietileno de alta densidade (PEAD) e o controle positivo (com efeito citotóxico) foi uma solução de fenol 0,3% (v/v). A placa foi incubada por 72 horas, a 37°C, sob atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

A viabilidade celular foi medida pela adição de 20 µl de solução de MTS/PMS (Metilsulfato de Fenazina) (20:1) e a placa foi incubada por mais 2 horas, a 37°C, sob atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Depois de incubadas, as amostras foram lidas em leitor de ELISA, em comprimento de onda de 490nm.

Os cálculos de viabilidade celular foram realizados a partir das leituras de densidade óptica (DO) das amostras e dos controles, cujos dados foram representados graficamente em função da concentração do extrato. O cálculo de viabilidade celular (VC) foi realizado a partir da Eq. (1):

$$VC = \left[ \frac{DOD}{DOC} \right] \times 100 \quad (1)$$

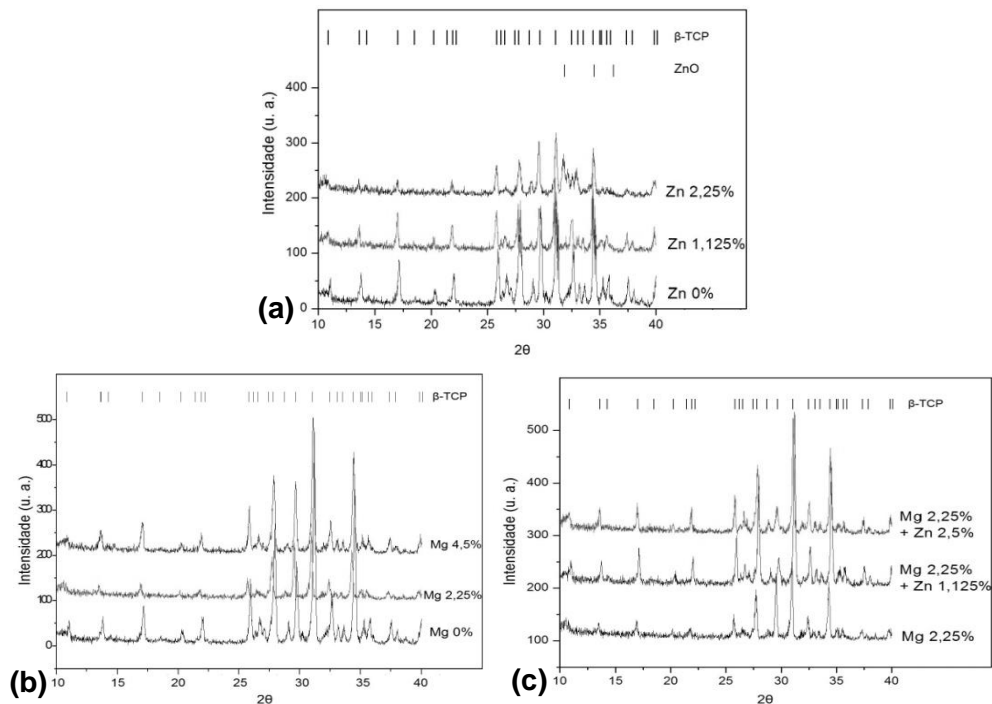
Onde: VC = viabilidade celular; DOD = média da densidade óptica da diluição; DOC = média da densidade óptica dos controles;

Foram traçadas as curvas de viabilidade celular e obtida a concentração inibitória CI<sub>50%</sub> (*inhibitory concentration*), este significando a concentração do extrato que lesa ou provoca a morte de 50% da população celular.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Caracterização físico-química das amostras de TCP

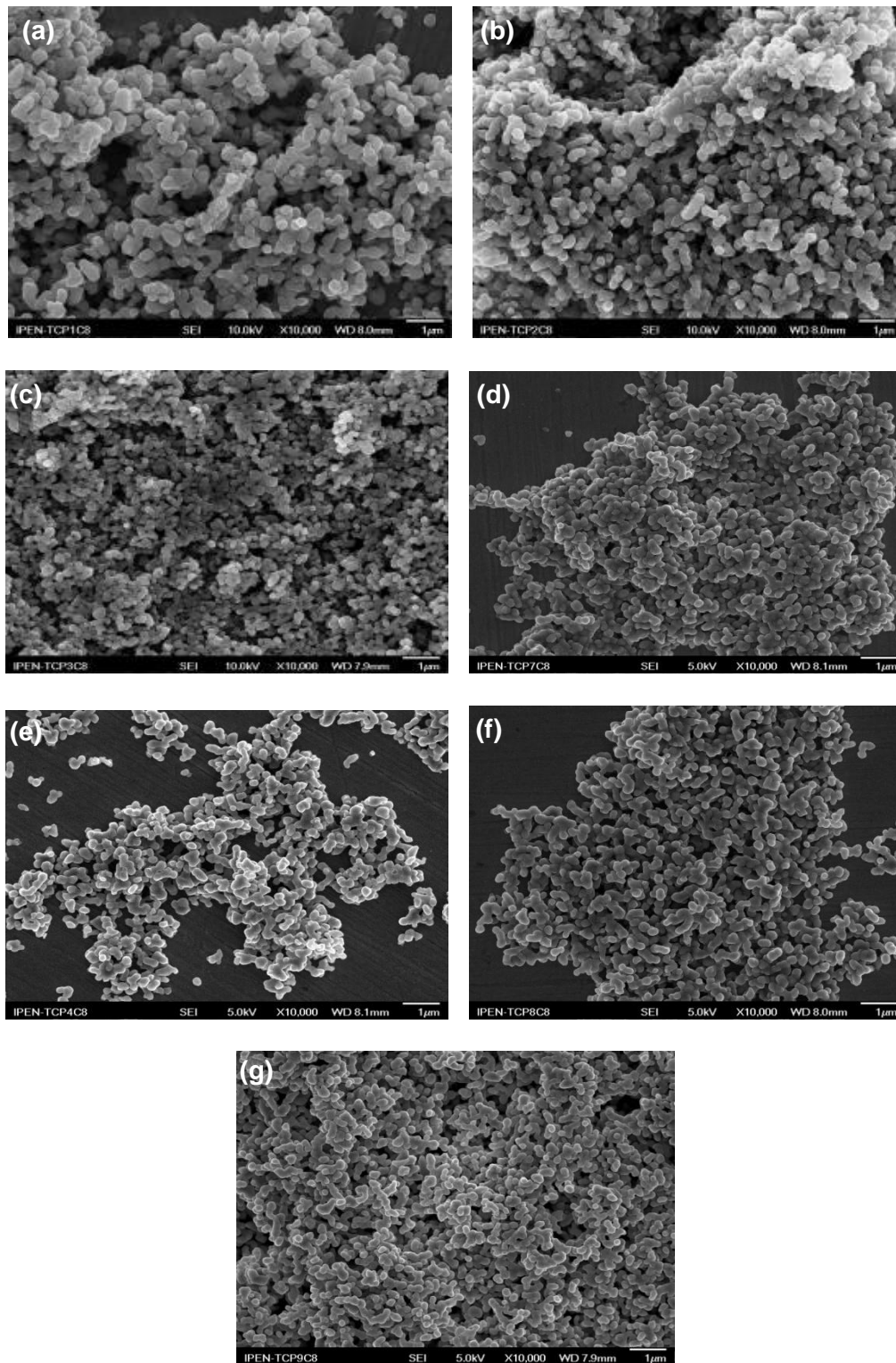
Na Fig. 1 são apresentados os difratogramas obtidos dos pós de TCP após calcinação a 800°C/1 hora. Pode-se observar que em todos os materiais calcinados foi identificada a fase β-TCP nas amostras. A temperatura de 800°C foi suficiente para a completa transformação de fase CDHA→β-TCP. No caso da amostra com 2,25 mol% de Zn calcinada, também foi identificada a fase cristalina corresponde ao ZnO (óxido de zinco) (Fig. 1a), o que sugere que nem todo o zinco foi incorporado a rede cristalina do TCP.



**Figura 1:** Difratogramas dos pós de fosfato tricálcico pura e com dopantes após a calcinação a 800°C/1 h: a) amostras com adição de zinco; b) amostras com adição de magnésio; c) amostras com adição de magnésio e zinco.

A morfologia dos pós de TCP calcinados a 800°C/1h foi avaliada por MEV-FEG para evidenciar a influência da incorporação do zinco e do magnésio na morfologia dos pós (Fig. 2).

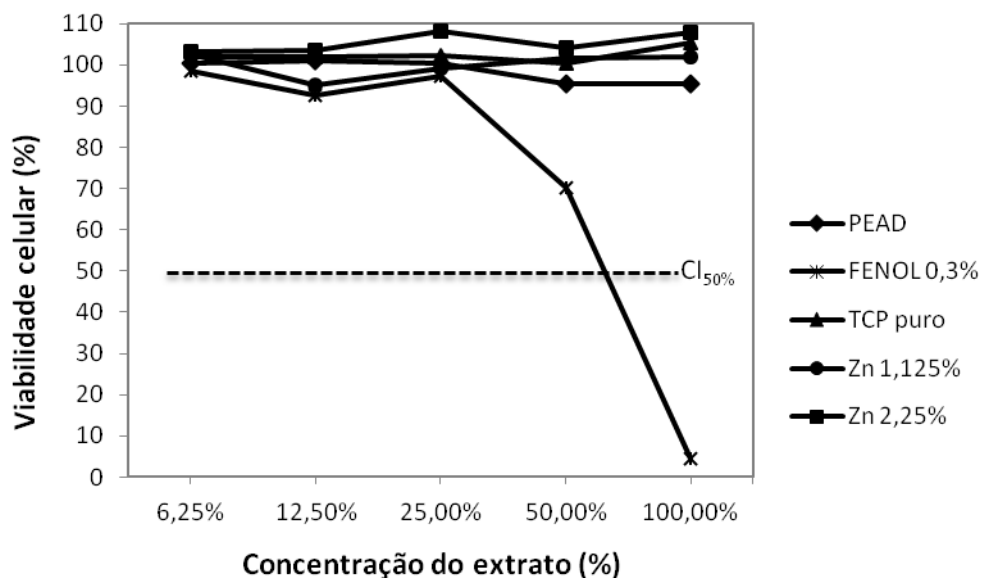
As micrografias mostram que todas as amostras apresentam-se na forma de aglomerados, estes consistindo de partículas nanométricas, com significativa redução no tamanho dos aglomerados – e das partículas - nas amostras com adição de 2,25 mol% de Zn. O mesmo comportamento pode ser observado nas amostras com adição de Mg e co-dopadas com magnésio e zinco, sugerindo que a adição dos dopantes reduz o tamanho dos aglomerados, quando comparados com TCP puro. Os dados sugerem que a adição de dopantes diminui a probabilidade das partículas se aglomerarem, o que pode facilitar a compactação dos pós e aumentar a sinterabilidade pela facilidade do empacotamento das partículas.



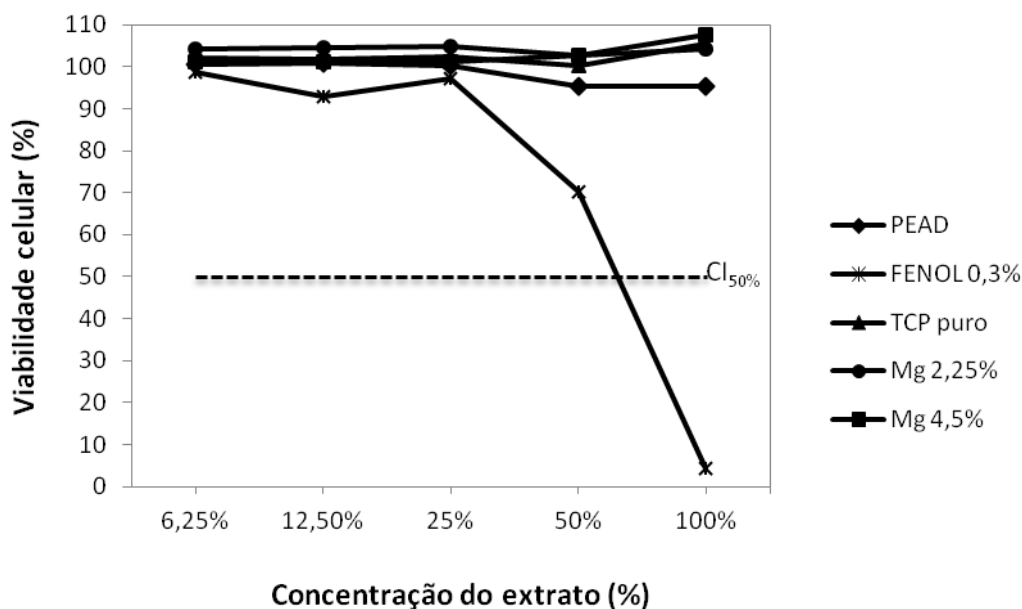
**Figura 2:** Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV-FEG) de pós de fosfato tricálcico calcinados a 800°C/1h: a) TCP puro, b) Zn 1,125%, c) Zn 2,25%, d) Mg 2,25% + Zn 1,125%, e) Mg 2,25% + Zn 2,5%, f) Mg 2,25% e g) Mg 4,5%.

### 3.2 Avaliação da citotoxicidade *in vitro* das amostras de TCP

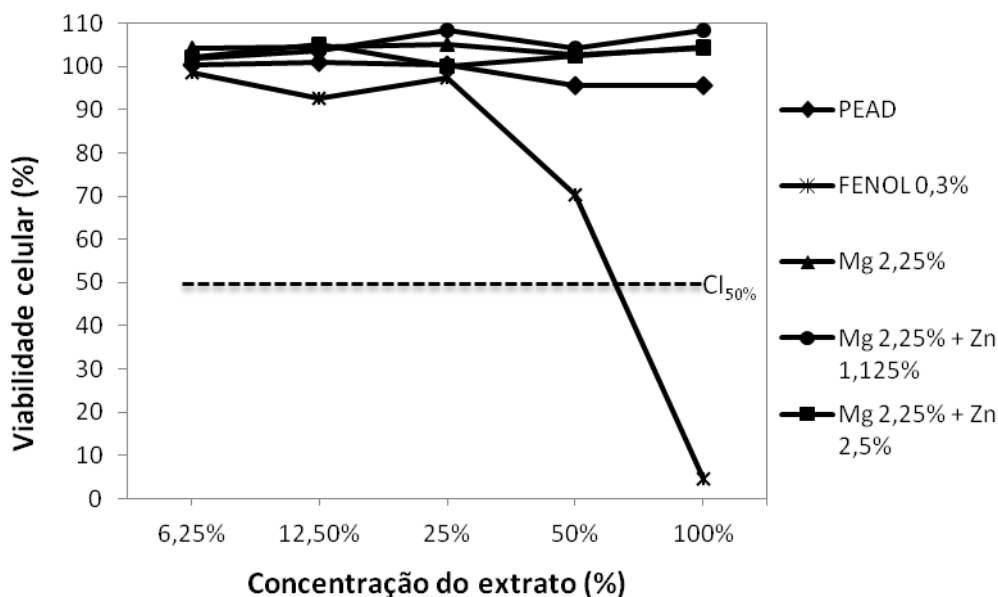
A partir dos dados obtidos de viabilidade celular por contato indireto das amostras de fosfato tricálcico e dos controles para diferentes concentrações de extrato, foi construído o gráfico para obtenção dos índices de citotoxicidade (Fig. 3, 4 e 5).



**Figura 3:** Curvas de viabilidade celular das amostras de TCP dopadas com Zn obtidas no ensaio de citotoxicidade pelo método de MTS.



**Figura 4:** Curvas de viabilidade celular das amostras de TCP dopadas com Mg obtidas no ensaio de citotoxicidade pelo método de MTS.



**Figura 5:** Curvas de viabilidade celular das amostras de TCP co-dopadas com Mg e Zn obtidas no ensaio de citotoxicidade pelo método de MTS.

Para um material não ser considerado citotóxico, a curva de viabilidade celular das amostras testadas deve ficar acima da linha correspondente a 50% ( $CI_{50\%}$ ) para todas as concentrações, no gráfico obtido no ensaio. No caso da curva de viabilidade celular cruzar a linha de 50%, a concentração inibitória  $CI_{50\%}$  do material testado é obtido do eixo da concentração do extrato, no ponto do cruzamento. O controle negativo (PEAD) não pode produzir resposta citotóxica. Por outro lado, o controle positivo (solução de fenol 0,3%) deve apresentar resposta citotóxica, neste caso apresentando maior citotoxicidade com o aumento da concentração de extrato.

Todos os materiais sintetizados apresentaram curva de viabilidade celular acima da linha correspondente a 50% de viabilidade celular para todas as concentrações de extrato. Todas as sete composições demonstraram que não existe diferença na viabilidade quando comparados com o controle negativo (com efeito não citotóxico), indicando que não houve liberação de produtos dos materiais que causam um efeito citotóxico nas células. A porcentagem e os dopantes utilizados neste trabalho (Mg ou Zn) na síntese de  $\beta$ -TCP não resultaram em pós com diferenças na citotoxicidade. A co-dopagem com Mg e Zn não influenciou de forma negativa nos resultados de citotoxicidade do material sintetizado, mostrando que ambos os dopantes podem ser utilizados em conjunto ou separadamente sem efeitos citotóxicos. A partir dos resultados de citotoxicidade por contato indireto, pode-se concluir que todos os materiais podem ser considerados não citotóxicos. A adição de magnésio e/ou zinco na estrutura cristalina do TCP não apresentou diferença na viabilidade celular por contato indireto.

#### 4. CONCLUSÕES

No geral, a presença de Zn e de Mg na rede cristalina do fosfato tricálcico diminuiu o tamanho das partículas dos aglomerados.

Todas as amostras de TCP sintetizadas para este trabalho foram consideradas não citotóxicas, indicando que estes podem ser utilizados como biomateriais, ou seja,

podem ser utilizados sem efeitos citotóxicos como material para substituição e reparação de tecido ósseo.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a UFABC, CNPq e FAPESP pelo suporte financeiro; ao CCTM/IPEN, especialmente aos laboratórios de Insumos, Biomateriais, Microscopia e Difração de raios-X pela infraestrutura e colaboração. Os autores também agradecem a colaboração do aluno de iniciação científica Carlos A.V. Machado (UFABC).

## REFERÊNCIAS

- BARRÈRE, F.; MAHMOOD, T.A.; DE GROOT, K., BLITTERWIJK, C.A. van Advanced biomaterials for skeletal tissue regeneration: instructive and smart functions. **Materials Science and Engineering R**, v. 59, p. 38-71, 2008.
- BEST, S.M.; PORTER, A.E.; THIAN, E.S.; HUANG, J. Bioceramics: past, present and for the future. **J. Europe Ceram. Soc.**, v. 28, p. 1319-1327, 2008.
- DESCAMPS, M.; HORNEZ, J.C.; LERICHE, A. Effects of powder stoichiometry on the sintering of  $\beta$ -tricalcium phosphate. **J. European Ceram. Soc.**, v. 27, p. 2401-2406, 2007.
- FEATHERSTONE, J. D. B.; MAYER, I.; DRIESSENS, F. C. M.; VERBEECK, R. M. H.; HEIJLIGERS, H. J. M. Some physical properties of Na- and CO<sub>3</sub>-containing apatites synthesized at high temperatures, **Inorganica Chimica Acta**, v. 80, p. 19-23, 1983.
- FRAGA, C. G. Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 26, p. 235-244, 2005.
- GROOT, K. Clinical applications of calcium phosphate biomaterials: a review. **Ceramics International**, v. 19, p. 363-366, 1993.
- HENCH, L. L. Ceramics, glasses, and glass-ceramics, *in Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*, Buddy D. Ratner *et al.*(Ed.), Academic Press, 1996.
- HENCH, L. L.; WILSON, J., An introduction to bioceramics, *Advanced Series in Ceramics*, v. 1, **World Scientific**, USA, 1998.
- ITO, A.; KAWAMURA, H.; OTSUKA, M.; IKEUCHI, M.; OHGUSHI, H.; ISHIKAWA, K.; ONUMA, K.; KANZAKI, N.; SOGO, Y.; ICHINOSE, N. Zinc-releasing calcium phosphate for stimulating bone formation. **Mat. Sc. And Eng. C**, v. 22, p. 21-25, 2002.
- JARCHO, M., Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics, **Clin. Orthop. Rel. Res.**, v. 157, p. 259-278, 1981.
- JEEJEEBHOY, K. Zinc: an essential trace element for parenteral nutrition. *Gastroenterology*, v. 137, n. 5, p. S7-S12, 2009.
- KANNAN, S.; GOETZ-NEUNHOEFFER, F.; NEUBAUER, J.; PINA, S.; TORRES, P. M. C.; FERREIRA, J. M. F., Synthesis and structural characterization of strontium- and magnesium-co-substituted  $\beta$ -tricalcium phosphate. **Acta Biomaterialia**, v. 6, p. 571-576, 2010.
- KIM, S. R.; LEE, J. H.; KIM, Y. T.; RIU, D. H.; JUNG, S. J.; LEE, Y. J.; CHUNG, S. C.; KIM, Y. H. Synthesis of Si, Mg substituted hydroxyapatite and their sintering behaviors, **Biomaterials**, v. 24, p. 1389-1398, 2003.
- LEGEROS, R. Z., Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine, *in Monographs in Oral Science*, v. 15, Howard M. Myers (Ed.), Karger, 1991.
- LI, X.; ITO, A.; SOGO, Y.; WANG, X.; LeGEROS, R. Solubility of Mg-containing  $\beta$ -tricalcium phosphate at 25°C. **Acta Biomaterialia**, v. 5, p. 508-517, 2009.
- MARCHI, J.; DANTAS, A.C.S.; GREIL, P.; BRESSIANI, J.C.; BRESSIANI, A.H.A. MÜLLER, F.A. Influence of Mg-substitution on the physicochemical properties of calcium phosphate powders. **Mater. Res. Bulletin**, v. 42, p. 1040-1050, 2007.
- MAYER, I.; SCHLAM, R.; FEATHERSTONE, F. D. B. Magnesium-containing carbonate apatites, **J. Inorg. Biochem.**, v. 66, p. 1-6, 1997.
- RAYNAUD, S.; CHAMPION, E.; BERNACHE-ASSOLLANT, D., THOMAS P. Calcium-phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio I. Synthesis, characterization and thermal stability of powders, **Biomat.**, v. 23, p.1065-1072, 2002.
- RYU, H-S.; HONG, K. S.; LEE, J-K.; KIM, D. J.; LEE, J. H.; CHANG, B-S.; LEE, D-H; LEED, C-K.; CHUNGE, S-S. Magnesia-doped HA/ $\beta$ -TCP ceramics and evaluation of their biocompatibility. **Biomaterials**, v. 25, p. 393-401, 2004.

SANTOS JR., A.R.; WADA, M.L.F. Polímeros biorreabsorvíveis como substrato para cultura de células e engenharia tecidual. **Polímeros**, v. 17, n. 4, p. 308-317, 2007.

SUITA, S.; IKEDA, K.; NAGASAKI, A.; HAYASHIDA, Y. Zinc deficiency during total parenteral nutrition in childhood. *Journal of Pediatric Surgery*, v. 13, n. 1, p. 5-9, 1978.

TAS, A. C.; KORKUSUZ, F.; TIMUCIN, M.; AKKAS, N. An investigation on the chemical synthesis and high-temperature sintering behaviour of calcium hydroxyapatite (HA) and tricalcium phosphate (TCP) bioceramics, **J. Mater. Sci., Mater. Med.**, v. 8, p. 91-96, 1997.

VALLET-REGÍ, M. Evolution of bioceramics within the field of biomaterials. **Comptes Rendus Chimie**, v. 13, p. 174-185, 2010.

VALLET-REGÍ, M.; GONZÁLEZ-CALBET, J.M. Calcium phosphate as substitution of bone tissues. **Progress in Solid State Chemistry**, v. 32, p. 1-31, 2004.

VALLET-REGÍ, M.; PEÑA, J.; IZQUIERDO-BARBA, I. Synthesis of  $\beta$ -tricalcium phosphate in layered or powdered forms for biomedical applications. **Solid State Ionics**, v. 172, p. 445-449, 2004.

WEYAND, B.; SCHROEDER, H. P. von, Bone challenges for the hand surgeon: from basic bone biology to future clinical applications, **Clin Plastic Surg**, v. 32, p. 537-547, 2005.

XUE, W.; DAHLQUIST, K.; BANERJEE, A.; BANDYOPADHYAY, A.; BOSE, S. Synthesis and characterization of tricalcium phosphate with Zn and Mg based dopants. **J. Mater. Sci.: Mater. Med.**, v. 19, p. 2669-2677, 2008.

YAMAGUCHI, M.; OISHI, H.; SUKETA, Y. Stimulatory effect of zinc on bone formation in tissue culture. **Biochemical Pharmacology**, v. 36, n. 22, p. 4007-4012, 1987.

ROSS, M.H.; PAWLINA, W. **Histologia - Texto e Atlas: em correlação com a biologia celular e molecular**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

## EVALUATION OF CYTOTOXICITY OF TRICALCIUM PHOSPHATE CERAMICS DOPED WITH MAGNESIUM AND ZINC

K.C. Kai<sup>1,a</sup>, T.F. Cunha<sup>2</sup>, O.Z. Higa<sup>2,b</sup>, J. Marchi<sup>2,c</sup>

<sup>1</sup>Centro de Ciências Naturais e Humanas (CCNH), Universidade Federal do ABC, Santo André (SP), Brasil

<sup>2</sup>Centro de Biotecnologia, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), São Paulo (SP), Brasil  
E-mail: kai.kc@hotmail.com<sup>a</sup>, ozahiga@ipen.br<sup>b</sup>, juliana.marchi@ufabc.edu.br<sup>c</sup>

*Abstract. The need of repair and/ or replacement of bone tissue arising from accidents or diseases drives the biomaterials field in order to develop alternative bone grafts materials. Tricalcium phosphate (TCP) can be successfully used for bone repair or replacement due their biocompatible and osteoconductive characteristics. TCP is a bioabsorbable ceramic material which is gradually replaced by new bone. Magnesium (Mg) and zinc (Zn) ions can replace calcium (Ca) in the crystal structure of the TCP, and it is expected that the addition of magnesium improve the mechanical properties and increase the thermal stability of TCP, and the addition of zinc results in a stimulatory effect on bone formation in vitro and in vivo. In this paper, pure TCP, Mg-TCP, Zn-TCP and MgZn-TCP, with general formula  $(Ca_{1-x}Mg_xZn_x)_3(PO_4)_2$  and  $0 \leq x \leq 0.045$ , were prepared by wet synthesis from  $Ca(OH)_2$  and  $H_3PO_4$  precursors. After 24 hours aging, the precipitate was filtered, washed and freeze dried. The powders were calcined at 800°C for 1h. The powders were previously sterilized by gamma radiation (25 kGy) and placed in culture medium RPMI 1640 to obtain a final concentration of 0.2 g/ml. The powders were incubated for 48 hours under shaking at 37°C, in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The extracts were filtered and subjected to five serial dilutions. The cytotoxicity of synthesized powders was evaluated by MTS assay in a culture of Chinese hamster ovary cell line (CHO-K1). TCP powders were considered non-cytotoxic. The citotoxicity behavior of all powders was similar, indicating that there was no release of products from materials processing which cause toxicity to the cells. The results suggest the possibility of TCP doped with magnesium and/or zinc can be used as a biomaterial for the bone tissue regeneration and replacement.*

**Keywords:** Tricalcium phosphate, Ionic substitution, cytotoxicity, in vitro test.