

## AVALIAÇÃO CITOTÓXICA DE HIDROXIAPATITA OBTIDA POR PRECIPITAÇÃO AQUOSA

Sizue Ota Rogero, Magali de Campos Valente, Ana Helena A. Bressiani e Olga Zazuco Higa  
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN-CNEN/SP  
Travessa R, nº 400 - Cidade Universitária, CEP 05508-900,  
São Paulo - SP, Brasil

### RESUMO

A hidroxiapatita (HAp) sintética, pela composição semelhante ao tecido ósseo, tem sido bastante utilizada como biomaterial na área médica e odontológica. Neste trabalho, a HAp obtida por precipitação aquosa foi calcinada à temperatura de 1000°C por 3 horas. O material, na forma de pó calcinado foi caracterizado pelas técnicas de difração de raios X e espectroscopia de energia dispersiva e submetido a teste de biocompatibilidade. Avaliou-se a citotoxicidade pelo método quantitativo de formação de colônias. Foram colocados extratos do material preparado em meio de cultura RPMI 1640 com 10% de soro fetal bovino em cultura de células de ovário de hamster chinês (CHO). Os resultados mostraram que a HAp sintetizada por este método apresentou um índice de citotoxicidade ( $IC_{50}$ ) > 100, mostrando que a HAp preparada é não citotóxica.

Palavras-chave: Citotoxicidade, hidroxiapatita, biocerâmica.

### ABSTRACT

Synthetic hydroxyapatite (HAp), due to its similar composition of bone tissue has been used as biomaterial in the medical and odontological field. In this study the HAp prepared by aqueous precipitation was calcinated for 3 hours at 1000°C. The powder material characterized by X-ray diffractometry method and energy dispersive spectroscopy was subjected to a *in vitro* test of biocompatibility. The cytotoxicity was evaluated by colony formation testing method, using chinese hamster ovary cells (CHO) cultured with HAp extracts prepared with RPMI 1640 culture medium added 10% fetal calf serum. The HAp prepared by this method showed a cytotoxicity potencial ( $IC_{50}$ ) > 100, meaning that HAp prepared is not cytotoxic.

Keys words: cytotoxicity, hydroxyapatite, bioceramic.

### INTRODUÇÃO

Biomaterial é um material usado em dispositivos médicos e odontológicos com a finalidade de interagir com sistemas biológicos, ou seja, é uma classe de material estranho ao organismo e que pode ser utilizado clinicamente em contato com fluidos e tecidos biológicos<sup>(1)</sup>.

A hidroxiapatita sintética (HAp),  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ , devido sua composição química ser semelhante a do tecido ósseo, tem sido bastante utilizada em implantes dentários e em dispositivos ortopédicos<sup>(2)</sup>.

Um dos testes *in vitro* de avaliação de biocompatibilidade é o da citotoxicidade, que avalia a toxicidade

incubando o dispositivo ou o material a ser analisado com cultura de células de mamíferos diretamente ou através de difusão em extratos apropriados<sup>(3)</sup>. O teste de citotoxicidade é bastante sensível e sua sensibilidade depende da linhagem celular, aplicação técnica dos materiais para o teste e interpretação da resposta celular. O método descrito neste trabalho mede a citotoxicidade pela comparação da habilidade de formação de colônias. O ensaio é simples e de baixo custo, comparado com outro método de avaliação de resposta celular pela mudança morfológica da célula, muito mais complexo<sup>(4)</sup>.

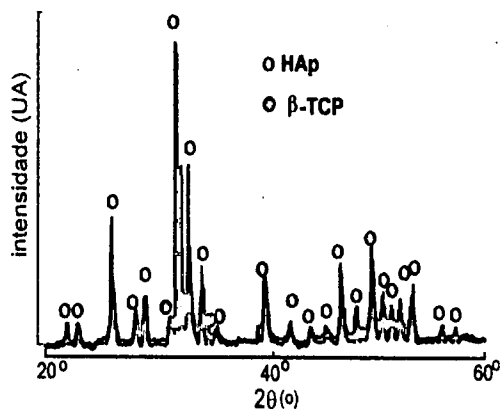


Figura 1: Análise de difração de raios X da amostra calcinada a 1000°C por 3 horas.

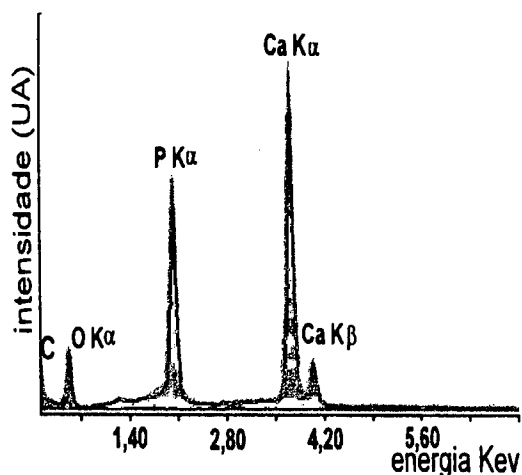


Figura 2: Análise por espectroscopia por energia dispersiva da amostra de HAp calcinada a 1000°C por 3 horas.

Na Tabela I são apresentadas as porcentagens do número de colônias visíveis nas placas de CHO nas diferentes concentrações dos extratos dos materiais analisados. Projetando-se esses valores em gráfico semilogarítmico pode-se calcular quantitativamente o potencial citotóxico, expresso como  $IC_{50}$  (%), que é uma unidade de bioatividade ou seja, a concentração do extrato do material analisado que mata metade da população celular. O controle negativo quando testado não deve produzir resposta citotóxica, como se observa com a alumina

( $IC_{50} > 100$ ); e o controle positivo deve levar a uma resposta citotóxica positiva, como é o caso da solução de fenol 0,02% que apresentou  $IC_{50} = 65$  (Figura 3), isto é, metade das células morreram com concentração de extrato 65%. A HAp apresentou  $IC_{50} > 100$  indicando ausência de citotoxicidade e portanto características biocompatíveis, adicionado ao alto grau de pureza química.

Tabela I - Teste de citotoxicidade da HAp: porcentual do número de colônias visíveis nas placas de CHO, em relação a placa controle.

Concentração do extrato (%)	% número de colônias		
	Controle negativo	Controle positivo	HAp
12.5	103	85	99
25	86	93	92
50	95	65	85
100	100	24	86

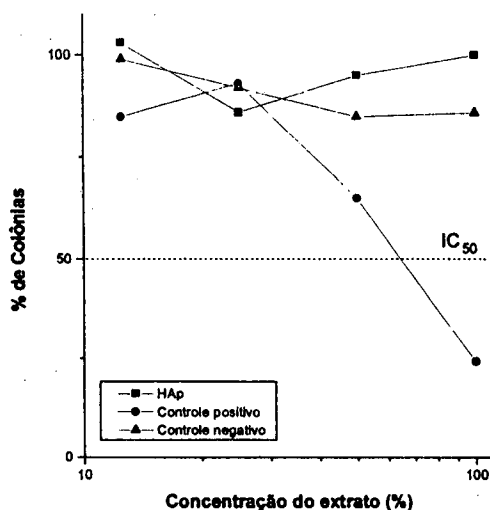


Figura 3: Ensaio de supressão de colônias no teste de citotoxicidade da HAp.

Neste trabalho é avaliada a citotoxicidade da HAp sintética, pelo método de supressão de colônias usando cultura de células de ovário de hamster chinês (CHO) k-1.

## MATERIAL E MÉTODO

A hidroxiapatita (HAp) utilizada neste trabalho foi obtida por precipitação aquosa, baseando-se no método de Moreno, Gregory e Brown<sup>(5)</sup>. O processo consiste em se adicionar simultaneamente as soluções de hidrogenofosfato de amônio e nitrato de cálcio. O pH é controlado com hidróxido de amônio. Após a etapa de lavagem, com água e acetona, o precipitado foi seco em estufa a 80°C por 24 horas e calcinado a 1000°C por 3 horas.

O teste de citotoxicidade foi realizado colocando-se as diluições dos extratos da HAp em contato com uma cultura de CHO em placa de petri (15x60mm), utilizando-se como controle positivo uma solução de fenol 0,02% e como controle negativo o extrato da alumina (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)<sup>(3, 4)</sup>.

**Preparação dos extratos.** Foram colocados 6g de HAp e 6g de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> em frascos de vidro com tampa rosqueada, com capacidade para 100mL, esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos. Foram adicionados 60 mL do meio de cultura RPMI-FCS (RPMI 1640 contendo 10% de soro fetal bovino e 1% de solução de penicilina e estreptomicina) e incubadas por 48 horas em estufa a 37°C. Após esse tempo os sobrenadantes foram filtrados em membrana millipore, poro de 0,22 µm.

Foram feitas diluições seriadas dos extratos de HAp, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e solução de fenol 0,02% (50, 25, 12,5%).

**Preparação das placas de cultura.** As células CHO fornecidas pelo Instituto de Química da USP foram cultivadas em garrafas de plástico em meio RPMI-FCS, em estufa com atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C, até obtenção de uma camada de células com crescimento confluyente. O meio de cultura foi retirado e as células foram lavadas com tampão fosfato salina sem cálcio e magnésio (PBS-CMF). Para o desprendimento das células da garrafa foi adicionado uma solução de tripsina 0,2%. Após a

tripsinização as células foram transferidas para um tubo de centrífuga com tampa e lavadas duas vezes com PBSA-CMF. As células foram ressuspensas em RPMI-CFS ajustando-se para uma suspensão contendo 100 células/mL. Dessa suspensão foram distribuídas 2 mL em cada placa de cultura e incubadas por 5 horas para adesão das células na placa. Após esse período o meio de cultura foi removido e nessas placas foram adicionados 5 mL do extrato puro e de cada diluição seriada. Na placa de controle de CHO foi adicionado 5 mL do meio fresco.

Foram feitas triplicatas de cada concentração dos extratos testados. As placas foram incubadas em estufa úmida com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C por 7 dias. Decorrido esse tempo o meio foi removido e as colônias formadas foram fixadas em formol 10% em salina 0,9% e coradas com corante de Giemsa.

As colônias visíveis em cada placa foram contadas e comparadas com o número de colônias da placa controle de CHO. O potencial citotóxico do material avaliado foi expresso em índice de citotoxicidade (IC<sub>50</sub>), que é a concentração do extrato que suprime 50% de formação de colônias em relação ao controle<sup>(3)</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A HAp calcinada foi analisada por difratometria de raios X. De acordo com a Figura 1 o material obtido apresenta como fase principal a HAp e pequena decomposição em β-TCP. Com a finalidade de se verificar as possíveis contaminações adquiridas durante o processo de obtenção da HAp utilizou-se a espectroscopia por energia dispersiva em microscópio eletrônico de varredura (MEV). A amostra foi analisada na forma de pó calcinado sobre suporte de alumínio com recobrimento de carbono. Através dos resultados apresentados na Figura 2 pode-se observar apenas a presença de cálcio (Ca), fósforo (P) e oxigênio (O) indicando um alto grau de pureza deste material. O carbono (C) que aparece no espectro, decorre do recobrimento para observação em MEV.

## CONCLUSÃO

A avaliação citotóxica da hidroxiapatita obtida por precipitação aquosa e calcinada (1000°C/3h), apresentou um IC<sub>50</sub>(%) > 100, mostrando que esta HAP é não citotóxica.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Ivan Schumacker pelo fornecimento das CHO.

Ao Dr. Marcelo M. Seckler por oferecer as instalações do IPT (Departamento de Química) para obter a hidroxiapatita.

Ao CNPq pela bolsa de estudos.

## REFERÊNCIAS

(1) WILLIAMS, D.F.: Definitions in biomaterilas. In: PROGRESS IN BIOMEDICAL ENGINEERING, March 3-5, 1986, Chester, England. Proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials.

(2) HENCH, L.L.; WILSON, J.: Introduction An introduction to bioceramics, *Advanced series in bioceramis*, vol. 1, ed. by L.L. Hench and J. Wilson, Copyright by World Scientific Publishing Co. Pte.Ltd., 1-24, chapter 1-9, 1993.

(3) International Standard: Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for cytotoxicity: *in vitro* methods. ISO 10 993-5, 1992.

(4) NAKAMURA, A.; IKARASHI, Y.; TSUCHIYA, T.; KANIWA, M. Radiation vulcanized natural rubber latex is not cytotoxic. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON RADIATION VULCANIZATION OF NATURAL RUBBER LATEX. Proceedings. Japan Atomic Research Institute JAERI-M 89-228, Takasaki, Japan: 1989, p. 79-87.

(5) MORENO, E.C.; GREGORY, T.M.; BROWN, W.E.; Preparation and solubility of hydroxyapatite, Journal of Research of the National Bureau of Standards, **72A**, nº6, November-december, 1968.