

## AVALIAÇÃO CITOTÓXICA DE HIDROXIAPATITA POROSA PRODUZIDA ATRAVÉS DE GELCASTING DE ESPUMAS

Sizue O. Rogero<sup>1</sup>, Pilar Sepulveda<sup>2</sup>, Olga Z. Higa<sup>1</sup>, Victor C. Pandolfelli<sup>2</sup>, José C. Bressiani<sup>1</sup>.<sup>1</sup> Instituto de Pesquisas Nucleares - IPEN - CNEN/SP

Travessa R, 400 - Cidade Universitária - CEP 05508-900, São Paulo, SP

<sup>2</sup> Departamento de Engenharia de Materiais - DEMA - Universidade Federal de São Carlos, Via Washington Luís, km 235, CEP 13565-905, São Carlos, SP

E-mail: sorogero@baitaca.ipen.br

## RESUMO

*Hidroxiapatita porosa produzida por meio de uma nova técnica de processamento, visando aplicações na área de implantes ósseos. A produção do material poroso se deu pela formação de espumas produzidas a partir de suspensões aquosas, seguida de solidificação por polimerização in situ de monômeros orgânicos inicialmente incluídos nas composições. O material sinterizado foi avaliado quanto a sua citotoxicidade utilizando-se o método quantitativo de formação de colônias. Extratos do material foram colocados em contato com cultura de células de ovário de hamster chinês (CHO). O nível de letalidade das células após contato indireto com o biomaterial foi utilizado como índice de citotoxicidade. Os resultados mostraram que o processo de fabricação e os reagentes utilizados não afetaram os baixos níveis de toxicidade do pó de hidroxiapatita que era originalmente de pureza biomédica. Um índice  $IC_{50} > 100$  foi obtido, ou seja, o material poroso produzido é não citotóxico.*

*Palavras-chaves:* HA porosa, gelcasting, espumas, citotoxicidade

## INTRODUÇÃO

Cerâmicas porosas à base de hidroxiapatita possuem grande potencial de aplicação na área de implantes ósseos. Isto se deve à alta compatibilidade do material e, no caso do material poroso, a presença de um reticulado permeável que permite a incorporação de tecido ósseo [1].

Tentativas de reproduzir a estrutura porosa do tecido ósseo encontram-se ainda limitadas pelo fato de que a resistência mecânica dos materiais fabricados artificialmente é muito baixa. Desta maneira, a otimização das propriedades do material torna-se uma prioridade. Dentre os métodos atualmente utilizados para a produção de cerâmicas porosas, o gelcasting de espumas tem se mostrado o mais efetivo em elevar a resistência mecânica [2]. Para estudos realizados com alumina, mostrou-se que este método leva à resistência à flexão de 26 MPa para materiais com 30% da densidade teórica, enquanto que métodos alternativos produzem resistência mecânica geralmente menor que 2-3 MPa [2].

A produção do material poroso pelo gelcasting de espumas envolve a preparação de uma suspensão aquosa com o pó cerâmico, dispersantes poliméricos e monômeros orgânicos. A incorporação de aditivos e agitação mecânica promove a formação de uma espuma. Posteriormente, a espuma fluida é solidificada pela gelificação do sistema. Este processo ocorre pela introdução de iniciadores que promovem a polimerização in situ dos monômeros orgânicos.

Dentre os inúmeros fatores necessários para que um material possa ser utilizado como implantes encontram-se a biocompatibilidade, que é definida como a resposta do meio fisiológico ao corpo implantado, a resistência mecânica que deve ser adequada e semelhante à do osso natural e, fatores que permitam preencher a função pré-estabelecida à qual o implante foi destinado.

A primeira etapa de avaliação do material biomédico é o teste de citotoxicidade, onde células de mamíferos são colocadas em contato com o material, de uma maneira direta ou indireta.

O método utilizado neste trabalho para avaliação da citotoxicidade baseia-se na observação do nível de letalidade das células CHO em presença dos extratos apropriados produzidos a partir da hidroxiapatita porosa.

## MATERIAIS E MÉTODOS

A preparação da hidroxiapatita porosa se deu conforme as etapas mostradas no fluxograma da Figura 1. Detalhes do processo são descritos na referência [3].

HA CAPITAL-R da Plasma Biotal de pureza biomédica foi utilizada como matéria prima. Suspensões contendo um máximo de 58 %-peso de hidroxiapatita foram preparadas. Espumas de volumes variados foram produzidas utilizando-se agente espumante em concentrações desejadas. Após a polimerização e formação do gel causada por agentes iniciadores, as amostras foram secas e procedeu-se a queima a 300°C para a eliminação da matéria orgânica. Sinterização à 1250°C e 1350°C por 2 horas foi efetuada para a densificação da matriz cerâmica.

A caracterização física dos corpos sinterizados envolveu medidas de densidade, difração de raios-X e observação microestrutural por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

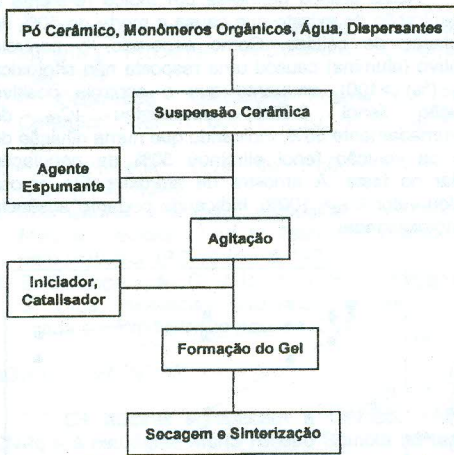


Figura 1. Esquema das etapas para a produção de cerâmicas porosas pelo método gelcasting de espumas.

Para os testes de citotoxicidade a amostra de HA porosa sinterizada foi moída. Alumina foi utilizada como controle negativo (não citotóxico), enquanto solução fenol 0.02% foi utilizada como controle positivo (citotóxico) [4,5].

Amostras de 6 gramas da HA porosa e outra de 6 gramas de alumina foram esterilizadas em autoclave à 121°C por 20 minutos. À cada uma das amostras 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). Estas foram incubadas por 48 h em estufa a 37°C. Após este período os sobrenadantes foram filtrados e os extratos e a solução de fenol 0.02% foram diluídos com RPMI-FCS resultando em concentrações de 50, 25, 12.5 e 6.25%.

Enquanto isso, células CHO (ATCC – CHO k1) foram cultivadas em garrafa de plástico, em meio de cultura RPMI-FCS a 37°C, em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>, até a obtenção de monocamada de células com crescimento confluinte. Foi feita a tripsinização para o desprendimento das células da garrafa. A suspensão de células foi acertada para 100 células/ml e 2 ml desta suspensão foi distribuída em cada placa de petri, que foram encubadas por 5 h a 37°C. Após a adesão das células nas placas, o meio de cultura foi removido e foram adicionados 5 ml de cada diluição dos extratos em triplicata. Decorrido sete dias de incubação das placas a 37°C, em atmosfera úmida e 5% CO<sub>2</sub>, o meio de cultura foi removido e as colônias formadas foram fixadas com solução de formol 10% em salina 0.9% e coradas com corante Giemsa.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Algumas dificuldades foram encontradas para a dispersão do pó de hidroxiapatita devido ao reduzido tamanho e formato acicular das partículas, como mostra a Figura 2.. Por isso manteve-se a concentração de sólidos na suspensão em níveis relativamente baixos de 58 %-peso.

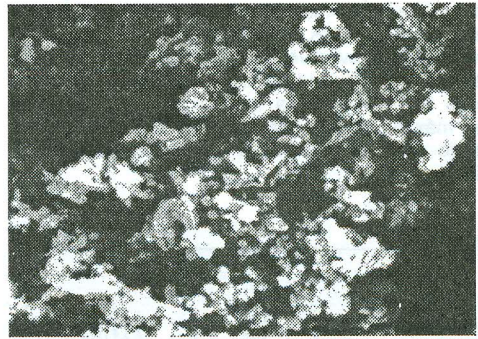


Figura 2. Pó de HA, como fornecido.

A Figura 3 mostra a micrografia de uma amostra de HA porosa sinterizada. A porosidade se encontra distribuída na forma de poros esféricos e interconexões decorrentes da ruptura parcial das bolhas na espuma fluida fornecem a propriedade de permeabilidade. Esta característica é necessária no caso de implantes, uma vez que as interconexões proporcionam canais para o crescimento de tecido ósseo em seu interior e, posterior passagem de nutrientes para a manutenção e renovação dos tecidos.

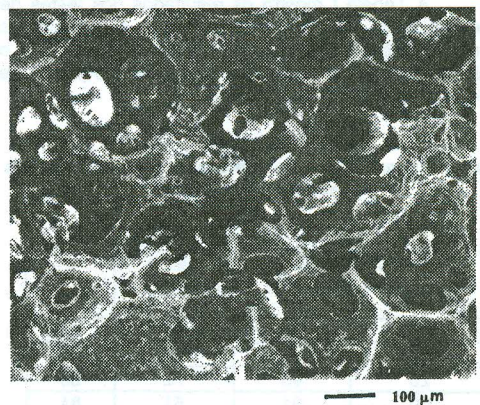


Figura 3. Observação microestrutural da HA porosa obtida pelo gelcasting de espumas.

Amostras de densidade variando de 0.50 g/cm<sup>3</sup> até 0.69 g/cm<sup>3</sup> foram obtidas neste trabalho, que correspondem à níveis de porosidade de 74% a 86%.

Como a fase cristalina de HA é relativamente instável à altas temperaturas, fez-se a verificação das fases presentes no produto sinterizado. Os difratogramas de raios-X da Figura 4 mostram que a única fase presente é composta de HS tanto no pó como no corpo sinterizado. Não foram observados traços de tri-fosfato de cálcio, fase que normalmente se origina da decomposição da HA. A alta estabilidade do pó de hidroxiapatita é favorável, já que o tri-fosfato de cálcio apresenta uma solubilidade distinta em meio fisiológico e mais baixa resistência mecânica. Assim, pode-se obter máxima densificação com o ciclo de queima utilizado sem comprometer as propriedades do implante.

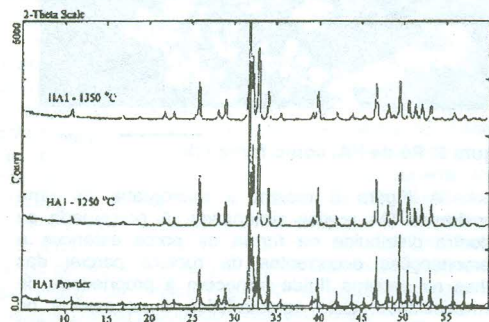


Figura 4. Difratogramas de raios-X do pó de hidroxiapatita e de amostras do produto sinterizado à 1250°C e 1250°C por 2 horas.

A Tabela I mostra os resultados dos testes de citotoxicidade da HA porosa para as diferentes concentrações do extrato utilizadas. A tabela lista o valor percentual do número de colônias nas placas de CHO em relação à placa controle.

Tabela I. Percentual do número de colônias visíveis nas placas de CHO

Concentração do extrato (%)	% do Número de Colônias		
	Controle negativo	Controle positivo	HA
6.25	90	94	94
12.5	91	80	89
25	95	72	86
50	91	51	81
100	83	3	73

O potencial citotóxico pode ser estimado quantitativamente a partir de uma projeção dos dados em gráfico como verificado na Figura 5.

Neste gráfico define-se um índice referente à concentração de extrato que causa a morte de 50% da população de células. Como esperado, o controle negativo (alumina) causou uma resposta não citotóxica (IC<sub>50</sub> (%) >100), enquanto que o controle positivo (solução fenol 0.02%) apresentou IC<sub>50</sub> de aproximadamente 50%, indicando que numa diluição de 50% de solução fenol eliminou 50% da população celular no teste. A amostra de hidroxiapatita porosa revelou valor IC<sub>50</sub> > 100%, indicando portanto ausência de citotoxicidade.

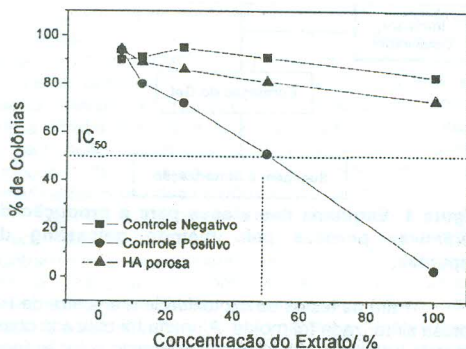


Figura 5. Ensaio de supressão de colônias no teste de citotoxicidade da HA.

Estes resultados provam que, após o processo para fabricação de uma estrutura porosa, o pó de HA de elevada pureza química originalmente utilizado não teve seus níveis de toxicidade comprometidos. Isto se deve principalmente aos cuidados tomados durante o processamento escolhendo-se reagentes de alta pureza, como é o caso dos dispersantes, monômeros, agentes espumantes que são efetivamente eliminados durante a queima e evitando-se contaminação.

CONCLUSÕES

A produção de corpos porosos de hidroxiapatita com densidades variadas é possível por meio do método de formação de espumas seguido de gelificação. Os corpos sinterizados apresentaram um índice IC<sub>50</sub> > 100% indicando que o material processado é não citotóxico. Estes resultados permitem uma seguinte etapa de avaliação do biomaterial seja efetuada, a qual envolve testes de biocompatibilidade aplicados *in vivo*.

## REFERÊNCIAS

1. A. Ravaglioli and A. Krajewski, "Bioceramics - Materials, Properties, Applications", Chapman & Hall, 1992.
2. P. Sepulveda, "Gelcasting Foams for Porous Ceramics", Ceram. Bull. vol. 76, n. 10, pp. 61-65, 1997.
3. P. Sepulveda, Tese de PhD, University of Nottingham, 1996.
4. International Standard: Biological Evaluation of Medical Devices - Part 5: Tests for Citotoxicity: in vitro methods. ISO 10 993-5, 1993.
5. S. O. Rogero, M. C. Valente, A. H. A. Bressiani, O. S. Higa, Avaliação Citotóxica de Hidroxiapatita obtida por Precipitação Aquosa, CBECIMAT.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES, FAPESP, CNPq e à estudante Marta Ribeiro Spinola no teste de citotoxicidade.

## CYTOTOXICITY OF POROUS HYDROXYAPATITE PREPARED BY GELCATING OF FOAMS

## ABSTRACT

*A novel technique has been applied to manufacture porous hydroxyapatite for implant applications. The process involved generation of foam from an aqueous suspension of the powder followed by in situ polymerisation of organic monomers which had been previously added to the compositions. The sintered material was evaluated for cytotoxicity through a quantitative method of cell colonies formation. Extracts prepared from the ceramic material in culture medium were added to culture dishes containing Chinese Hamster Ovary cells (CHO). The determination of cell death after this indirect contact with the biomaterial was used to assess the cytotoxicity. Results revealed that the low toxicity of biomedical grade HA powder was neither affected during processing nor by the employed reagents. An index  $IC_{50}$  (%) >100 was attained indicating that the porous material is non cytotoxic.*

*Key-words: Porous HA, gelcasting, foams, citotoxicity.*