

# TESTE DE CITOTOXICIDADE DE RECOBRIMENTO DE HIDROXIAPATITA DEPOSITADA POR *RF-MAGNETRON SPUTTERING*

**Denny Nakagawa<sup>1</sup>, Johnny Vilcarromero Lopez<sup>2</sup>,  
Cristina Pacheco Soares<sup>3</sup>, André Luís Pas choal<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> Mestrando em Bioengenharia pela UNIVAP- Laboratório de Biomateriais e Biodispositivos – IP&D  
e-mail: nakagawa@directnet.com.br

<sup>2</sup> Professor Coorientador – Laboratório de Biomateriais e Biodispositivos – IP&D  
e-mail : jvlopez@univap.br

<sup>3</sup> Professora Coorientadora – Laboratório de Cultura de Células – IP&D  
e-mail : cpsoare@univap.br

<sup>4</sup> Professor Orientador, Laboratório de Testes de Desempenho Biológico – IP&D  
paschoal@univap.br  
Universidade Do Vale Do Paraíba – UNIVAP, Av. Shishima Hifumi, 2911,  
Urbanova, 12244-000– São José dos Campos – SP

**Palavras-chave:** Biomateriais, recobrimentos, biocompatibilidade.

**Área do Conhecimento:** Bioengenharia

**Resumo-** O presente trabalho tem por finalidade dar início aos estudos de biocompatibilidade nos recobrimentos de hidroxiapatita, preparados utilizando a técnica de *rf-magnetron sputtering*, sobre peças metálicas de titânio, com o intuito final de serem utilizados como implantes de interface óssea e demais partes metálicas utilizadas em conjuntos de auxílio na consolidação óssea. O estudo deste projeto envolve a preparação dos recobrimentos utilizando-se a técnica de *rf-magnetron sputtering*. Uma vez preparadas às amostras, será estudado o seu comportamento biológico frente ao teste *in vitro* de citotoxicidade.

## Introdução

Biomateriais são materiais usados em contato com tecidos vivos no intuito de restaurar ou substituir tecidos danificados. No tecido ósseo, por exemplo algumas classes de biomateriais têm como finalidade auxiliar o tecido lesionado na sua reparação, através de mecanismos de indução e/ou condução.[1].

Em aplicações médicas, com exceção de dispositivos que são utilizados externamente ao corpo humano e aqueles planejados para exercer função em contato com a pele, devem-se considerar não somente os requisitos mecânicos e propriedades físicas, mas também a influência sobre o meio biológico, assim como o reverso, a influência do meio biológico sobre o material [2]. Os materiais de implantes podem ser classificados como bioinertes, biotoleráveis e bioativos, dependendo da natureza de sua interação com os tecidos vivos, e dentre os diversos materiais relacionados como biomateriais, os metais empregados na implantologia merecem um destaque especial devido a sua alta resistência mecânica. No entanto, os metais, como titânio e suas ligas, não são capazes de se ligarem ao tecido ósseo através de ligações químicas fortes.[3].

Felizmente, na área da bioengenharia, tem-se a possibilidade de compor características positivas de biomateriais, como é o caso da utilização de metais implantáveis combinados com recobrimentos de filmes finos. Um exemplo de tal recobrimento é a hidroxiapatita, que adiciona à resistência dos metais a condição de bioatividade e osteocondutividade.

Seguindo esta abordagem, surgiu a motivação em dar início aos estudos de biocompatibilidade deste tipo de recobrimento depositado pela técnica *rf-magnetron sputtering*, utilizando-se das premissas ditadas pelo Órgão Internacional de Padronização (ISO10993) [4], que recomenda os testes necessários para se viabilizar o uso de determinados materiais em dispositivos médicos. Como primeiro ensaio, foi escolhido o teste de citotoxicidade [5]; e se realmente a sua não toxicidade for comprovada, pode-se dar continuidade aos outros estudos de biocompatibilidade.

## Materiais e Métodos

Neste estudo foi definido utilizar um recobrimentos de filme fino (entre 5 e 10 µm) de hidroxiapatita, preparados utilizando a técnica de *rf-magnetron sputtering*, devido esta técnica garantir uma melhora na força de adesão entre

substrato e a hidroxiapatita. O recobrimento por essa técnica apresenta alta cristalinidade e alto poder de resistência às soluções de fluidos corpóreos quando comparados às técnicas de recobrimento por deposição pulsada à laser, *ion sputtering*, e outras [6].

Para o estudo da citotoxicidade, foi escolhido por se tratar de uma técnica *in vitro* e, com isso apresentar vantagens em relação aos *in vivo* tais como poder limitar o número de variáveis experimentais, obter dados significativos mais facilmente e, neste caso o período de teste ser mais curto [7].

O teste de citotoxicidade tem como objetivo detectar o potencial de um material ou dispositivo em produzir efeitos letais ou subletais no sistema biológico a nível celular. Este teste deve ser aplicado a todas as categorias de biomateriais. Existem três possibilidades para o teste de citotoxicidade: o teste por eluição, o teste por contato direto e o teste por difusão em agar. [5,8].

A cultura celular escolhida para os testes foi de linhagem celular *Vero*, células de tecido de rim de macaco verde africano (ATCC CCL 81). Esta linhagem foi cultivada em meio essencial mínimo de Eagle (MEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). A dispersão da monocamada celular foi efetuada utilizando-se uma associação de tripsina e versene e a suspensão celular foi semeada em quantidades adequadas em recipientes próprios. A citotoxicidade foi testada pelo método da difusão em agar[8].

A linhagem celular *Vero*, foi incubada durante 48h a 37°C em placas de Petri de 35 mm de diâmetro em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período, com a monocamada de células já formada, o meio de cultura foi desprezado e adicionado ágar fundido. As peças de titânio com recobrimento de filme de hidroxiapatita com 0,25 cm<sup>2</sup> de área superficial foram colocados sobre o ágar antes de sua solidificação completa. As placas de Petri foram incubadas novamente em estufa com 5% CO<sub>2</sub> a 37°C por 24h. após esse período, vermelho neutro (corante vital) foi adicionado ao ágar.

Para controle positivo de citotoxicidade foram utilizados fragmentos de látex e como controle negativo fragmentos de papel de filtro de natureza comprovadamente atóxica, respeitando a dimensão de área superficial. As amostras foram avaliadas em triplicata.

As placas foram analisadas macroscopicamente quanto à presença de halo e microscopicamente quanto a integridade celular ao redor da amostra.

## Resultados e discussões

A avaliação dos resultados do teste de citotoxicidade foi feita pela observação do índice de zona, que é representada pela área não corada pelo corante vital, e anotando-se o índice de lise, que indica a porcentagem de células degeneradas.

Os índices, apresentados na Tabela 1, são traduzidos numericamente e correlacionados, fornecendo o índice de resposta. A Tabela 2 mostra os resultados obtidos. A Figura 1 mostra as placas com as amostras e os controles.

Tabela 01 - Índice de zona e índice de lise utilizados na avaliação da citotoxicidade

Índice de Zona	Descrição	Índice de Lise	Descrição
0	nenhuma zona sob e ao redor da amostra	0	nenhuma lise
1	zona limitada sob a amostra	1	menos que 20% da zona afetada
2	zona menor que 0,5 cm ao redor da amostra	2	menos que 40% da zona afetada
3	zona entre 0,5 e 1,0 cm ao redor da amostra	3	menos que 60% da zona afetada
4	zona maior que 1,0 cm sem envolver toda placa	4	menos que 80% da zona afetada
5	zona que envolve toda placa	5	mais que 80% da zona afetada

Tabela 2 – Resultados do teste de Citotoxicidade. Ha = titânio revestido com hidroxiapatita pelo método *rf-magnetron sputtering*; CP = Controle Positivo; CN = Controle Negativo.

Amostras		Índice de Zona	Índice de Lise	IZ/IL
Ha	Nº.1	0	0	0/0
	Nº2	0	0	0/0
	Nº3	0	0	0/0
CP	Látex	4	4	4/4
CN	Filtro	0	0	0/0

Nos testes de citotoxicidade, não foi constatada nenhuma evidência de citotoxicidade nos recobrimentos. Acredita-se que exista uma correlação bastante razoável entre os teste de curta duração *in vivo* e os testes de citotoxicidade para materiais implantáveis. Porém estes últimos são apenas indicadores primários de biocompatibilidade biológica e não eliminam a

necessidade dos testes in vivo, formulados para interações específicas[2].

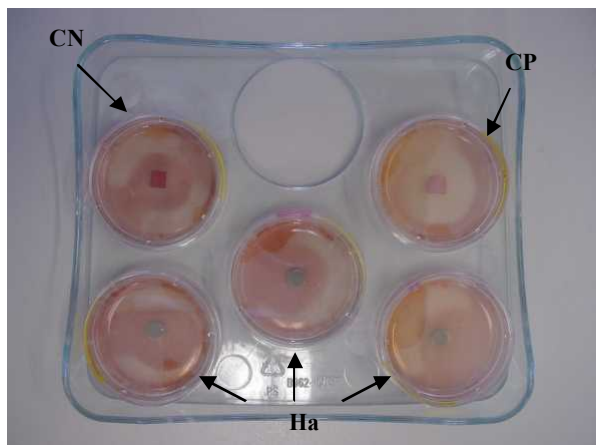


Figura 1 – Resultados do teste de Citotoxicidade. Placas com cultura celular. Ha = titânio revestido com hidroxiapatita pelo método *rf-magnetron sputtering*; CP = Controle Positivo; CN = Controle Negativo.

### Conclusão

Conclui-se que, para o teste de biocompatibilidade escolhido e realizado, a hidroxiapatita na forma de filme fino, depositado pelo método *rf-magnetron sputtering* sobre um substrato de titânio, não apresentou quaisquer problemas de toxicidade as células.

Entretanto, cabe ressaltar a necessidade de estudos subseqüentes para que se possa caracterizar o material e a técnica de recobrimento em questão como um biomaterial.

### Agradecimentos

A Fapesp pelo apoio financeiro ao projeto de Pós-doutorado do Prof. Dr. André L. Paschoal e a montagem dos Laboratórios de Biomaterial e Biodispositivos do Prof. Dr. Johnny V. Lopez e de Cultura Celular da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cristina P. Soares.

### Referências

01. BRONZINO, J.D. The Biomedical Engineering Handbook. 2.ed. Florida: CRC Press, Springer & IEEE Press, 2000.
02. PASCHOAL, A.L. (2003). Estudo da viabilidade de aplicação do polímero piezolétrico fluoreto de polivinilideno (PVDF) entre osso cortical e placa de osteossíntese para estimulação de crescimento ósseo. São Carlos, 2003. 112 p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
03. RIGO, E.C.S. Implantes metálicos recobertos com hidroxiapatita. Ver. Brasileira de Engenharia Biomédica, v. 15, n. 1-2, p. 21-29, jan/ago. 1999.
04. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (1992). ISO 10993-1. Guidance on selection of tests. Biological Evaluation of Medical Devices, Switzerland.
05. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (1992). ISO 10993-5. Tests for in vitro cytotoxicity. Biological Evaluation of Medical Devices, Switzerland.
06. DING, S.J. Properties and immersion behavior of magnetron-sputtered multi-layered hydroxyapatite/titanium composite coatings. Rev. Biomaterials, Taiwan, v. 24, p. 4233-4238, 2003.
07. ROGERO, S et al. Teste in vitro de citotoxicidade: Estudo comparativo entre duas metodologias. Rev. Materials Research, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.
08. AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (1992). ASTM F895/84 (reprov. 1990) - Standard Test Method for Agar Diffusion Cell Culture Screening for Cytotoxicity, In: Medical Devices. Annual book of ASTM Standards. Philadelphia. v. 13.01, , p. 306 – 309.