

# ANÁLISE DO POTENCIAL TERAPÊUTICO E BIOLÓGICO DA HA E DO COMPÓSITO HA/TiO<sub>2</sub>

Jurandir da Silva Junior, Leonardo Ribeiro Rodrigues e Christiane Bertachini Lombello

Engenharia Biomédica - Centro de Engenharia, Modelagem e Ciências Sociais Aplicadas -  
Universidade Federal do ABC, Santo André, Brasil  
e-mail: jurandir.junior@aluno.ufabc.edu.br

**Resumo:** A hidroxiapatita (HA) é uma biocerâmica biocompatível, bioindutora e bioativa, constituída por fosfato de cálcio, que possui a seguinte fórmula molecular: Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>. A composição química da hidroxiapatita sintética é semelhante à da fase mineral do tecido ósseo. Em virtude de suas características, ela é conhecida por ser um excelente biomaterial, com aplicações relevantes na engenharia tecidual óssea, especialmente no reparo de tecidos ósseos lesionados por patologias ou acidentes. A titânia (TiO<sub>2</sub>), por sua vez, é uma biocerâmica bioinerte, com um grande potencial de estudo na área de engenharia tecidual, sendo utilizada na fabricação de compósitos envolvendo esses dois materiais. O presente estudo visa analisar, inicialmente, o potencial biológico e terapêutico da hidroxiapatita (HA) e do compósito hidroxiapatita/titânia (HA/TiO<sub>2</sub>), através de ensaios padronizados de citotoxicidade indireta, de forma a investigar a interação inicial deste biomaterial com células Vero, contribuindo desta forma para o desenvolvimento do campo da medicina regenerativa.

**Palavras-chave:** Biomateriais, Citotoxicidade, Hidroxiapatita, Titânia.

**Abstract:** Hydroxyapatite (HA) is a biocompatible, bioinductive and bioactive bioceramic, constituted by calcium phosphate, which has the following molecular formula: Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>. The chemical composition of synthetic hydroxyapatite is similar to the mineral phase of bone tissue. Due to its characteristics, it is known as an excellent biomaterial, with relevant applications in the bone tissue engineering, especially in the repair of bone tissues injured by diseases or accidents. The titania (TiO<sub>2</sub>), in turn, is a bioinert bioceramic, with great potential in the field of tissue engineering, being used in the fabrication of composites involving these two materials. The present study aims to examine, initially, the biological and therapeutic potential of hydroxyapatite (HA) and the composite hydroxyapatite/titania (HA/TiO<sub>2</sub>), from the use of standardized assays of indirect cytotoxicity, in order to investigate the initial interaction of this biomaterial with Vero cells, contributing to the development of the field of regenerative medicine.

**Keywords:** Biomaterials, Cytotoxicity, Hydroxyapatite, Titania.

## Introdução

As biocerâmicas de fosfato de cálcio, pertencentes à classe de biomateriais cerâmicos, têm sido bastante utilizadas no reparo do tecido ósseo humano. A hidroxiapatita, uma das principais representantes dessas biocerâmicas, tem sido comercializada e caracterizada por diversos estudos científicos, sendo indicada como um material de grande potencial em aplicações biomédicas [1].

A titânia é uma biocerâmica bioinerte, sendo aplicada na indústria de tintas como pigmento, além de ser utilizada em protetores solares, produtos alimentares, fotocatalise, indústrias eletroeletrônicas, dentre outras. Embora esse material apresente grande quantidade de aplicações, ainda é pouco explorado na área de engenharia tecidual, podendo apresentar grande relevância nesse campo [2].

Para que esses potenciais sejam determinados, é fundamental que esses biomateriais sejam avaliados quanto à sua biocompatibilidade, através de ensaios padronizados de citotoxicidade, de forma que suas propriedades terapêuticas e biológicas possam ser analisadas, permitindo que sejam aplicados na área de medicina regenerativa [3].

Nesse contexto, biomateriais nanoestruturados e, mais precisamente, biocerâmicas nanoestruturadas, tais como a hidroxiapatita, têm sido pesquisados e desenvolvidos com a finalidade de se obter propriedades relevantes, principalmente estruturais e de superfície, que possam proporcionar a melhor resposta possível entre estes biomateriais e os sistemas biológicos com os quais irão interagir, aumentando a resposta biológica e consequentemente, a eficiência do processo de recuperação, quando comparados com os biomateriais convencionais [4], [5].

O objetivo deste trabalho é avaliar o potencial terapêutico da HA e do compósito HA/TiO<sub>2</sub>, e seu potencial na regeneração tecidual, por meio da interação destes com células em sistemas *in vitro*.

## Materiais e métodos

**Obtenção dos biomateriais** - Foram utilizados os seguintes materiais: **a)** Hidroxiapatita comercial VETEC. **b)** Para a síntese do TiO<sub>2</sub>, foram utilizados como reagentes o tetracloreto de titânio (TiCl<sub>4</sub> IV) (MERCK), a D-glicose anidra (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) (Synth), e o álcool etílico absoluto (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH) (Synth). O pó formado foi

calcinado a 500°C com taxa de aquecimento de ~ 8°C por minuto (FA-IV, EDG).

Para a formação das pastilhas, as amostras foram compactadas utilizando prensa (modelo 30t, SCHULZ) e a carga utilizada foi de 1 tonelada. O molde utilizado foi cilíndrico. Foram feitas pastilhas de HA e de HA com 50% em massa de TiO<sub>2</sub> (HA/TiO<sub>2</sub>). As amostras sofreram tratamento térmico de 1000°C por 2 horas.

Para a identificação das fases cristalinas, foi utilizado o DRX (DMAX 2200, Rigaku Co).

Para a caracterização das nanopartículas, foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura (MEV) (JSM-6330F, JEOL).

Para os ensaios de cultura celular, as pastilhas de HA e (HA/TiO<sub>2</sub>) foram esterilizadas em autoclave.

**Cultura celular** - Foram cultivadas células Vero, uma linhagem de células obtidas de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) comumente empregadas na avaliação de biomateriais. As células foram mantidas em meio de cultura HAMF10, com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 100 µg/ml de penicilina/estreptomicina. O pH do meio de cultura foi mantido entre 7,2 e 7,4. As culturas celulares foram incubadas a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub>. Foram realizadas trocas de meio de cultura a cada três dias, e a subconfluência e a morfologia das células foram verificadas com o auxílio de microscopia de fase ao microscópio invertido. As culturas foram mantidas por 15 dias. A dispersão da monocamada celular foi efetuada com a associação de tripsina 0,25%, produzindo a suspensão celular a ser utilizada nas etapas posteriores [3], [6].

**Ensaio de citotoxicidade indireta** - Foi obtido o meio de eluição com a incubação das amostras esterilizadas HA e HA/TiO<sub>2</sub> [7] em 4 ml de meio de cultura HAMF10, com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 100 µg/ml de penicilina/estreptomicina, durante 24 horas. Foi inoculada suspensão celular, com concentração de 10<sup>5</sup> células/ml, em placas de cultura de 24 poços (TPP). As culturas celulares foram incubadas por 48h, a 37°C em uma atmosfera a 5% de CO<sub>2</sub>, até atingir a condição de subconfluência, aproximadamente 80% da monocamada.

A partir da subconfluência, o meio de cultura foi descartado e substituído pelo meio de eluição. As culturas foram mantidas por 24 horas nestas condições experimentais. Como controle negativo, não citotóxico, utilizou-se a própria placa de cultura e meio de cultura padrão (citado anteriormente), e como controle positivo, citotóxico, foi utilizada uma solução de 0,25% de fenol [3], [6].

**Análise da morfologia celular** - As placas de cultura de 24 poços foram observadas no microscópio invertido (Axiovert A1, Zeiss). O software utilizado para a visualização e obtenção das imagens foi o AxisVision.

**Análise quantitativa de viabilidade celular** - Para a avaliação deste parâmetro, foi utilizado o teste do MTT (brometo de 3 - [4,5 - dimetil - tiazol - 2 - il] - 2,5 - difeniltetrazólio) (Sigma - Aldrich) [8]. Para o teste foram preparadas soluções de eluição das amostras HA e HA/TiO<sub>2</sub>. As amostras foram incubadas em 4 ml de meio

de cultura Ham F-10, com 10% de soro fetal bovino e 100 µg/ml de penicilina/estreptomicina, durante 24 hs.

As células Vero foram inoculadas em placas de cultura de poliestireno de 96 poços (TPP) a uma densidade de 10<sup>4</sup> células/ml.

Após 24 hs, o meio de cultura foi removido e substituído pelo meio de eluição. Como controle negativo, não citotóxico, foi utilizada apenas a placa de cultura e o meio de cultura conforme descrito. Como controle positivo, citotóxico, foi utilizada novamente solução de fenol 0,25 %. As células foram incubadas por 24 hs nas condições experimentais. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Após 24 hs, o meio de eluição foi removido e os poços foram lavados duas vezes com 100 µl de PBS estéril a temperatura de 37 °C. Em seguida, foram adicionados a todos os poços 10 µl da solução de MTT 5 mg/ml + 90 µl PBS estéril. A placa foi incubada em estufa de CO<sub>2</sub> pelo período de 4 horas. Após este período, a solução de MTT foi retirada da placa e foi adicionado a todos os poços 50 µl de DMSO (Dimetilsulfóxido) (Synth).

A leitura da placa foi realizada em Leitor de Elisa (SpectraMax M5) a 570 nm. Para obtenção da viabilidade celular, foi calculada a média de absorbância de todos os testes. O valor obtido para o controle negativo foi considerado como 100 % de células viáveis.

## Resultados

A Figura 1 mostra os picos principais da difração de raios X da hidroxiapatita (A) e da titânia (B) utilizadas na fabricação das pastilhas.

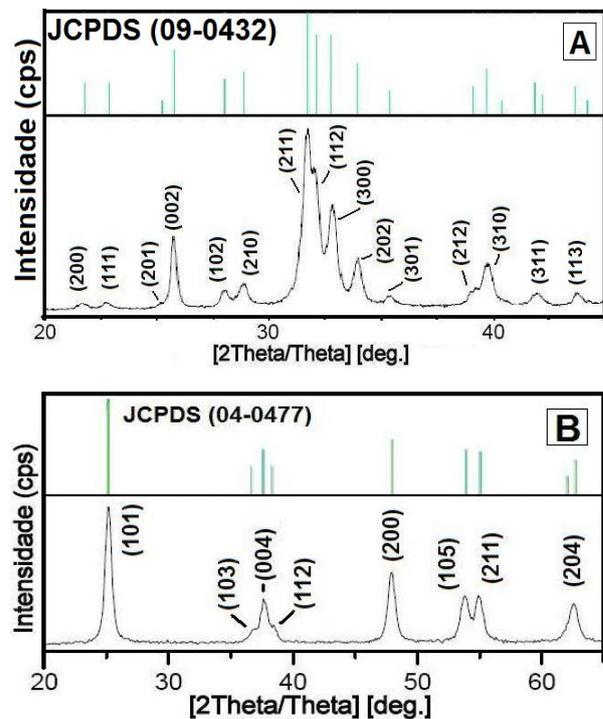


Figura 1: DRX. (A) Hidroxiapatita; (B) Titânia.

A Figura 1A compara os picos principais obtidos pela difração de raios X com o padrão da hidroxiapatita presente na biblioteca JCPDS 09-0432 e a Figura 1B compara o padrão JCPDS 04-0477 com os picos obtidos pela titânia com fase cristalina anatase calcinada à 500°C. Desta forma podemos comprovar que estamos trabalhando com as biocerâmicas hidroxiapatita e titânia.

Na Figura 2 podemos visualizar as nanopartículas de HA (A), e as nanopartículas de TiO<sub>2</sub> (B).

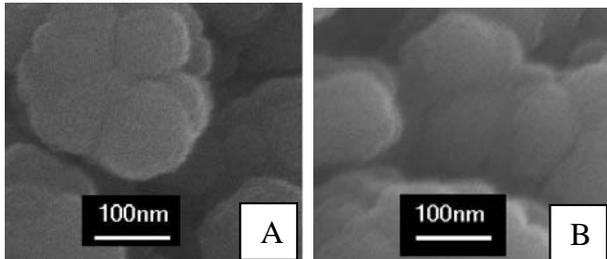


Figura 2: Microscopia Eletrônica de Varredura. (A) Hidroxiapatita; (B) Titânia.

As amostras cilíndricas de HA (A) e HA/TiO<sub>2</sub> (B) obtidas e utilizadas para o ensaio de citotoxicidade indireta podem ser visualizadas na Figura 3.

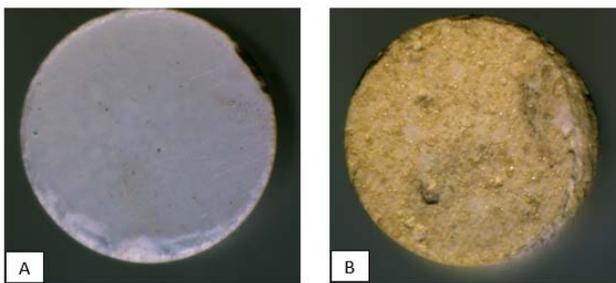


Figura 3: Amostras com aumento de 15x. (A) Hidroxiapatita; (B) Titânia.

Na Figura 4, podem-se visualizar as imagens obtidas durante a análise morfológica do ensaio de citotoxicidade indireta, para os grupos de controle positivo (A) e negativo (B) e para as amostras de HA (C) e HA/TiO<sub>2</sub> (D).

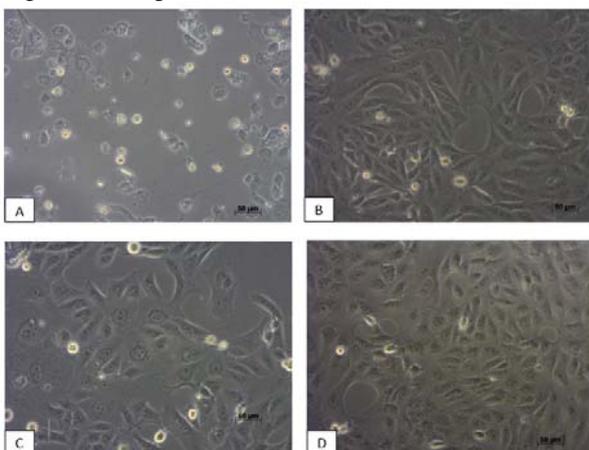


Figura 4: Análise morfológica das células Vero. (A) Controle positivo; (B) Controle negativo; (C) HA; (D) HA/TiO<sub>2</sub>.

O padrão de crescimento das células Vero nos ensaios de citotoxicidade se assemelha ao padrão de crescimento das células no controle negativo para citotoxicidade, sem a presença de alterações morfológicas evidentes, indicativas de degeneração celular, ou debris celulares abundantes.

Na Tabela 1 pode-se visualizar os valores médios de absorvância e desvio padrão obtidos durante o ensaio de MTT, para a análise de viabilidade celular.

Tabela 1: Absorvância média e desvio padrão obtidos dos grupos experimentais no ensaio de viabilidade celular.

Grupos	Abs média 570 nm	Desvio Padrão
Controle positivo	0,222	±0,063
Controle negativo	0,527	±0,041
HA	0,527	±0,059
HA/TiO <sub>2</sub>	0,507	±0,055

A Figura 5 mostra o gráfico com os valores de viabilidade celular obtidos para as células Vero utilizadas.

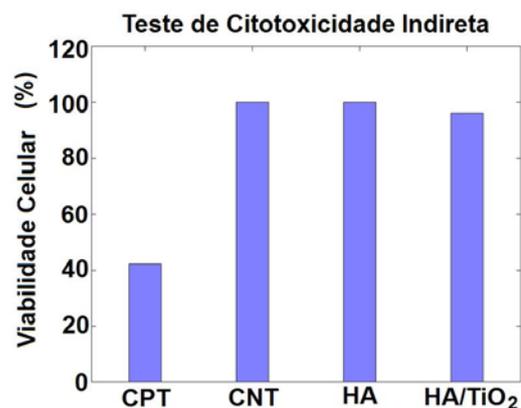


Figura 5: Viabilidade celular de fibroblastos Vero através do ensaio de MTT. CPT: Controle Positivo de Toxicidade. CNT: Controle Negativo de Toxicidade.

## Discussão

A análise morfológica não indicou alterações significativas na morfologia das células Vero quando cultivadas na presença do meio de eluição das amostras de HA, em comparação com o controle negativo, indicando que as amostras não apresentaram efeitos citotóxicos sobre os tipos celulares. As monocamadas celulares observadas apresentaram um alto nível de homogeneidade, indicando que as células se encontravam aderidas ao substrato. No controle positivo, por outro lado, percebeu-se elevada presença de células não aderidas ao substrato, além de grande quantidade de corpos possivelmente apoptóticos ou restos (debris) celulares, indicando efeitos citotóxicos severos.

Os valores médios de absorvância demonstraram uma redução significativa na densidade de células viáveis, de aproximadamente 42%, apenas no controle positivo, em

relação ao controle negativo, o que era esperado. Por outro lado, as amostras de HA e HA/TiO<sub>2</sub>, quando em contato com os tipos celulares, a partir do meio de eluição, não apresentaram toxicidade na análise da viabilidade celular, no ensaio de MTT (Figura 2), em relação ao controle negativo, apresentando valores de 100% e 96,14% de viabilidade, respectivamente.

Os dados obtidos demonstraram que os biomateriais analisados durante esse estudo não apresentaram efeitos citotóxicos sobre as células Vero utilizadas, uma vez que a análise morfológica não indicou alterações significativas das células e a viabilidade obtida a partir dos ensaios quantitativos apresentaram valores maiores que 85%, indicando que esses biomateriais podem apresentar uma boa biocompatibilidade. Entretanto, cabe ressaltar que os ensaios de citotoxicidade são utilizados como ensaios iniciais para a determinação do potencial terapêutico de biomateriais, levando à necessidade de que outros ensaios padronizados sejam efetuados com a finalidade de se determinar os efeitos terapêuticos desses biomateriais.

### Conclusão

As pastilhas HA/TiO<sub>2</sub> apresentaram resultados satisfatórios em comparação com as pastilhas HA a partir dos ensaios qualitativos e quantitativos propostos nesse estudo, evidenciando o seu possível potencial terapêutico e biológico, o qual poderá ser utilizado para o desenvolvimento da medicina regenerativa.

### Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de fomento para Iniciação Científica.

### Referências

- [1] Oréfice RL, Pereira MM, Mansur HS. Biomateriais: fundamentos e aplicações. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006.
- [2] Rodrigues LR, Dias CGBT, Ceragioli HJ, Rodas ACD, Monteiro FJM, Zavaglia CAC. FTIR Analysis and Cytotoxicity Test of Titanium Dioxide Nanoparticles. *Key Engineering Materials*. 2012; 493-494: 768-774.
- [3] Rogero, SO. et al. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. *Materials Research*. 2003; 6 (3):317-320.
- [4] Contescu C et al. *Dekker encyclopedia of nanoscience and nanotechnology*, vol. 1: volume I: Aberration – Catalysis. 2. ed. Boca Raton, USA: CRC Press, 2009.
- [5] Nalwa HS. *Encyclopedia of nanoscience and nanotechnology*, vol. 7. 2004.
- [6] International Standard. ISO10993-5 I (E): Biological evaluation of medical devices. Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods, 1992.
- [7] Rodrigues LR. Scaffolds baseados em nanopartículas de fosfatos de cálcio para engenharia tecidual óssea. [Tese]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2012.
- [8] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* 1983; (65):55-65.