

## **Efeito do tratamento de superfície de materiais bioativos na citotoxicidade in vitro visando aplicação em Biofabricação**

Bolsista Karina Feliciano Santos (CTI) karina.santos@cti.gov.br

### **Resumo**

*O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito acondicionado de superfície de vidros bioativos e uma vitrocerâmica altamente bioativa e de seus produtos de dissolução em meio de cultivo DMEM. Previamente ao plaqueamento de células fibroblastos de camundongo, os pós de Biosilicato, F18 e 45S5 foram condicionados por 10 dias em meio de cultura não suplementado. Após 10 dias foram observados pH, preparados os extratos e observado a viabilidade celular. Testes complementares para observar o efeito sobre a superfície dos biomateriais como FTIR, MEV e ICP*

*Palavras-chave: Materiais bioativos; Tratamento de superfície; Citotoxicidade in vitro.*

### **1. Introdução**

Os *scaffolds* cerâmicos tem sido estudado para regeneração do tecido ósseo, principalmente por serem biocompatíveis e, dificilmente, evocarem uma resposta inflamatória, como a ocorrência de tecidos fibrosos ao redor do implante (HENCH; WILSON, 1984). O desenvolvimento de biomateriais compatíveis para aplicação em tecido ósseo ganhou força com o surgimento do *Bioglass* 45S5, material desenvolvido pelo Prof. Hench, que se constitui como um dos materiais mais estudados para regeneração do tecido ósseo e dentário (CROVACE et al., 2016). Neste contexto, faz-se necessário avaliar cada vez mais a relação desses biomateriais e seu potencial aplicação para Biofabricação (BAJAJ et al., 2014).

A Biofabricação pode ser entendida como o desenvolvimento automatizado de produtos a partir da deposição controlada de células, biomateriais e biomoléculas para formação de tecidos ou órgãos. Uma das abordagens da Biofabricação é a construção de *scaffolds*, que são estruturas que funcionam como suporte tridimensional, que servem como guia na formação de novos tecidos (ABBASI et al., 2020). Assim, para obtenção de novos tecidos, faz-se necessário buscar novos materiais que obtenham propriedades adequadas para técnicas de manufatura aditiva.

A partir do 45S5 iniciam-se diversos estudos buscando compreender a importância de vidros bioativos para regeneração óssea. (CROVACE et al., 2016). Sabe-se que esses materiais apresentam boa biocompatibilidade, capacidade de formar ligações químicas entre o tecido mineral e o biomaterial, além de provocar diferenciação celular em ambiente fisiológico, secretando proteínas constituintes da matriz óssea. Entretanto, questões relacionadas ao mecanismo de interação celular ainda precisam ser melhor exploradas.

Com o intuito de explorar novos biomateriais bioativos, que apresentem propriedades melhoradas, não só em questão de bioatividade, mas também em propriedades mecânicas, pesquisadores desenvolveram o Biosilicato® e o F18. O Biosilicato® pode ser designado como uma vitrocerâmica com elevado índice de bioatividade, considerado um dos maiores quando comparado com vitrocerâmicas comerciais. Um exemplo disso é que, quando em um teste de bioatividade *in vitro*, esse material possui a capacidade em formar em sua superfície

uma camada de hidroxiapatita carbonatada (HCA) em período menor do que de 24h, enquanto que outros materiais comerciais podem levar até 15 dias (DESIMONE et al., 2013; PINTO et al., 2018. Por sua vez, o F18 é um novo vidro bioativo, totalmente amorfo, com bioatividade ainda mais elevada, apresentando a formação de HCA em 8-12 horas, quando exposto ao fluido corpóreo simulado (2015). Além do mais, apresenta propriedade antibacteriana (SOUZA, 2015).

A escolha do método adequado de análise da biocompatibilidade tem sido um grande ponto de discussão, sendo fundamental para a obtenção de resultados confiáveis. Além disso, o preparo das amostras para esses ensaios reflete na qualidade dos resultados obtidos. Sendo assim, como os biomateriais cerâmicos com elevada bioatividade, quando em meios salinos, podem propiciar uma alta dissolução de compostos iônicos nesses meios, refletindo na sua viabilidade celular, por exemplo, como nos testes de citotoxicidade *in vitro*, é de suma importância compreender as alterações na superfície desses materiais. Portanto, este estudo propõe desenvolver protocolo de tratamento superficial dos biomateriais bioativos 45S5, Biosilicato (BioS) e F18 para melhoria da biocompatibilidade, com avaliação por meio de ensaio de citotoxicidade, afim de serem utilizados no desenvolvimento de novos materiais para Biofabricação.

## 2. Metodologia

Os materiais bioativos foram concedidos pelo do grupo de pesquisa de Laboratório de Materiais Vítreos da Universidade Federal de São Carlos (LaMaV – DEMa/ UFSCar) em conjunto com a Startup Vetra Pesquisa e Desenvolvimento de Produtos Cerâmicos de Alta Tecnologia, localizada em São Carlos/ SP, sob a colaboração com a pesquisadora Dra. Marina Trevelin Souza. Esses materiais tem como composição base  $\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O- -CaO-P}_2\text{O}_5$ . O vidro F18 é coberto pela patente BR10 INPI 20130209619, e tem adição de  $\text{K}_2\text{O}$  e  $\text{MgO}$  em sua composição. A Tabela 1 mostra a composição dos materiais utilizados neste trabalho.

Tabela 1- Composição química dos materiais utilizados neste estudo.

Composição das amostras em mol (%)						
Materiais	$\text{SiO}_2$	$\text{Na}_2\text{O}$	$\text{CaO}$	$\text{P}_2\text{O}_5$	$\text{K}_2\text{O}$	$\text{MgO}$
<b>BioS</b>	48,5	23,75	23,75	4	-	-
<b>45S5</b>	45	24,4	24,4	6	-	-
<b>F18</b>	*	*	*	*	*	*

\* composição coberta pela patente

### 2.1 Acondicionamento das amostras

Com intuito de observar o efeito do tratamento de superfície de materiais bioativos na viabilidade celular, pelo acondicionamento desses em meio de cultivo DMEM, as amostras foram submetidas a lixiviações diárias com DMEM não suplementado pelo período 10 dias. Nesta etapa, utilizou-se a relação de 0,2 g de material para cada 4 ml.

Basicamente, os materiais foram submetidos a agitação em incubadora do tipo shaker (Excella E24, New Brunswick) por 80 rpm à temperatura de 37°C. Em seguida, o sobrenadante foi

recolhido e teve seu pH medido para observar alcalinidade do meio. Após o condicionamento, as amostras foram enxaguadas com 10 ml de PBS para retirada de qualquer resquício do meio de cultivo anterior, e os pós foram destinados ao preparo dos extratos. A Figura 1 ilustra o processo de acondicionamento, antes da submissão dos pós ao ensaio de citotoxicidade.

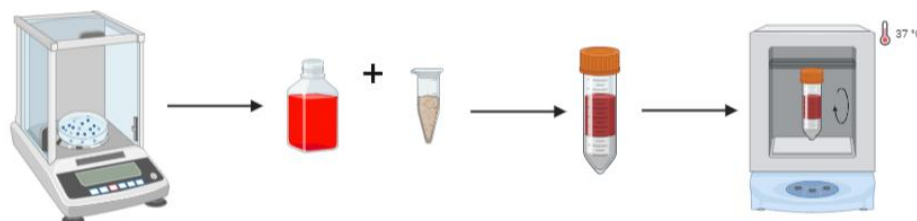


Figura 1 - Processo de acondicionamento dos biomateriais.

## 2.2. Caracterização química por espectroscopia (FTIR-ATR)

Com intuito de investigar as modificações químicas oriundas do processo de acondicionamento dos materiais em meio de cultivo DMEM, os materiais foram analisados por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier. As leituras das amostras foram realizadas antes e a após processo de acondicionamento de 10 dias. O equipamento utilizado é o espectrofotômetro com modo reflexão total atenuada (FTIR-ATR), da marca (PerkinElmer, Spectrum 100). As leituras ocorreram na faixa de intervalo de  $4000 - 500 \text{ cm}^{-1}$ , resolução de  $4 \text{ cm}^{-1}$ , com 32 varreduras.

## 2.3. Caracterização por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As amostras foram dispersadas em isoprano e adicionada sobre a fita condutora de carbono. A caracterização foi realizada com o equipamento MIRA XMU da marca Tescan.

## 2.4. Análise do meio condicionante por Espectroscopia de Emissão Atômica por Plasma Acoplado (ICP)

Para observar a resposta da exposição dos materiais bioativos ao meio de DMEM, foram preparados extratos com acondicionamento no período de 48h para determinar a quantidade de sais presentes em solução.

## 2.5. Ensaio de Citotoxicidade

### 2.5.1 Preparação dos extratos

A análise de citotoxicidade *in vitro* dos pós dos materiais bioativos foram realizadas de acordo com a norma (ISO) 10993-5 e a preparação das amostras ocorreu de acordo com a norma ISO 10993-12. Para preparação dos extratos para o ensaio de citotoxicidade utilizou-se a concentração de 0,2g/ml. As amostras foram condicionadas por um período de 24h em meio de cultivo DMEM suplementado, na temperatura de  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  sob agitação na incubadora tipo shaker. Após este período, as amostras foram filtradas com ajuda de um filtro estéril do tipo membrana PES de  $22 \text{ }\mu\text{m}$ , afim de separar as partículas e também garantir a esterilidade do material.

Com intuito de observar o efeito da concentração do material, foi realizado um segundo teste de citotoxicidade. Neste caso, a relação da quantidade de material por volume de solução foi adaptada de acordo com o trabalho de Oliveira et al. (2022). Os extratos foram preparados com o acondicionamento prévio de 3 e 7 dias e os extratos com 24h e a concentração final utilizada no teste foi de 1mg/ml de material (OLIVEIRA et al., 2022). O preparo e as caracterizações seguiram os protocolos descritos nas seções 2.1 a 2.4.

### 2.5.2 Células utilizadas

Neste estudo foram utilizados fibroblastos de camundongo (NIH -3T3), obtidos pela doação do Instituto de Pesquisa Energética Nuclear (IPEN). As células foram mantidas em cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, com 1% de penicilina e estreptomomicina, e com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade.

As células NIH-3T3 foram semeadas na concentração 2,0 x 10<sup>5</sup> células/poço em microplacas de 96 poços. Após o tempo de 24h, o meio de cada poço foi trocado pelo extrato das amostras, sendo deixado por mais 24 h na incubadora. Após o segundo tempo de incubação, os extratos foram substituídos por novo meio de cultura com MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina). As placas foram incubadas novamente por mais 2h, com posterior retirada do MTT e lavagem com PBS, para adição de 100 µL de DMSO, para dissolução dos cristais de formazan formados no interior das células viáveis. As medidas foram obtidas com ajuda do espectrofotômetro tipo ELISA (Variscan Lux, Thermo Scientific) ajustado no comprimento de onda 570 nm. A viabilidade celular foi calculada pela seguinte Equação (1):

$$VC (\%) = \frac{ODs}{ODc} \times 100\% \quad (1)$$

Onde: VC – viabilidade celular; (ODs) densidade óptica dos extratos; (ODc) densidade óptica dos extratos do controle

## 3. Resultados

Para compreender o efeito das espécies presentes em solução durante o período de acondicionamento do material, o meio DMEM teve o valor do pH avaliado, como mostra a Figura 2, pois ambientes muito alcalinos ou mesmo ácidos propiciam um ambiente inóspito para as células (CERRUTI; GREENSPAN; POWERS, 2005).

Vale destacar que para este estudo, as amostras utilizadas apresentaram tamanho de partícula em torno de 5 µm. Pela Figura 2 observa-se que o meio em contato com as amostras apresentou teor alcalino, em torno de 10. Inicialmente, o meio de cultura DMEM possui pH de 7,8. Com intuito de manter o pH próximo ao fisiológico (7,2 - 7,4), foram realizadas trocas do meio de cultivo por 10 dias. Conforme as trocas de meio eram realizadas, houve a redução de pH, ficando mais evidente após o sétimo dia de acondicionamento, com pH cerca de 7,5. Mesmo com as sucessivas lixiviações que o material sofreu ao longo desse período é necessário investigar outros tratamentos intermediários para reduzir a sua reatividade.

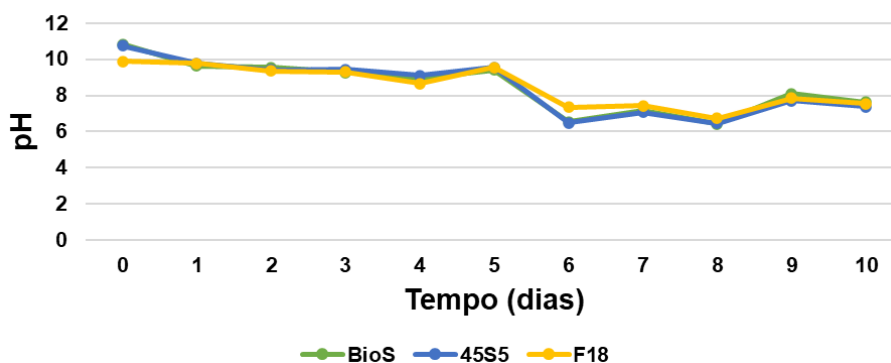
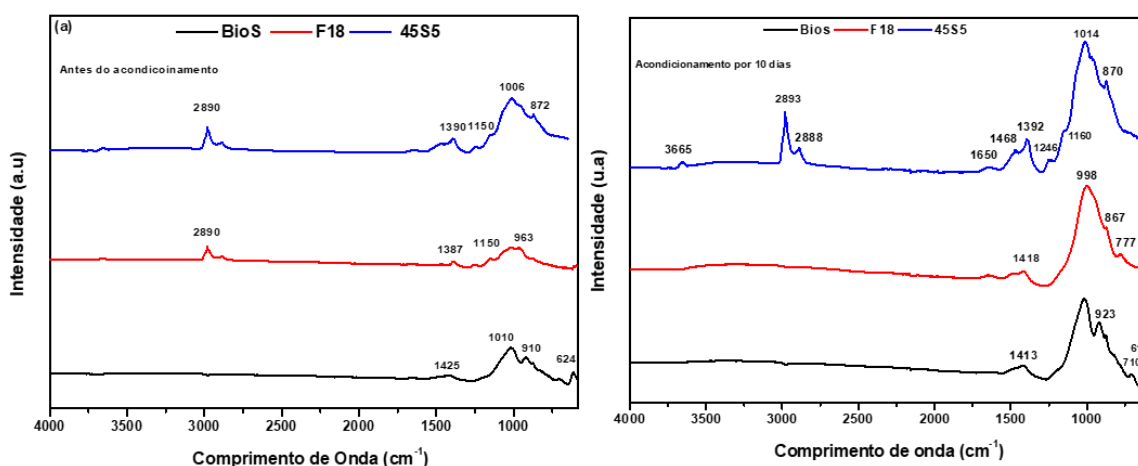


Figura 2- pH dos extratos com 10 dias de acondicionamento

Além do deslocamento das espécies iônicas entre o material e o meio, a alta solubilidade de íons como o sódio e o cálcio presentes na composição desses materiais bioativos contribuem para o aumento da alcalinidade do ambiente (CERRUTI; GREENSPAN; POWERS, 2005). Outro fator possível está relacionado com a área superficial dessas partículas, já que partículas muito pequenas apresentam maior área superficial, e isso eleva a maior reatividade, quando comparado a partículas com tamanho micrométrico (RISMANCHIAN et al., 2013)

A Figura 3 mostra os espectros de FTIR antes e depois do acondicionamento do material em meio de cultura, como um tratamento de superfície para melhoria da biocompatibilidade.



3- FTIR dos biomateriais bioativos (a) amostras não condicionadas em meio de cultivo, (b) amostras condicionadas em meio de cultivo não suplementado

A Figura 3(a) exibe os espectros de FTIR dos materiais antes do acondicionamento, onde o BioS exibe bandas de absorção características em 624, 1010, 1425  $\text{cm}^{-1}$  essas bandas correspondem ao modo de vibração *P-O*, pertinentes ao grupo fosfato, enquanto o pico 910  $\text{cm}^{-1}$  está associado ao modo de vibração das ligações *Si-O* (DAGUANO et al., 2022; RENNO et al., 2013). O espectro do F18 apresenta uma sobreposição na região 955  $\text{cm}^{-1}$ , referente ao estiramento assimétrico do grupo fosfato *P-O* com grupo *Si-O* (SOUZA, 2015). O espectro do 45S5 exibe picos característicos em 872  $\text{cm}^{-1}$  corresponde ao estiramento assimétrico do grupo *Si-O*. Na região 1150  $\text{cm}^{-1}$  associa-se ao modo de vibração do grupo fosfato *P-O* (ARAUJO, 2019).

Na Figura 3(b) observa-se que em todas as amostras ocorreram deslocamento de suas bandas de absorção. Nota-se o surgimento de um pico em torno de  $867\text{-}878\text{ cm}^{-1}$  que é atribuído ao grupo fosfato e na região de  $1400\text{-}1580\text{ cm}^{-1}$  ao grupo carbonato, esses picos merecem atenção, pois geralmente está associado a formação de hidroxiapatita (CERRUTI; GREENSPAN; POWERS, 2005; PRASAD et al., 2016). Assim, sugere-se que o acondicionamento foi efetivo no sentido de promover grupos de interesse na superfície do material.

Na micrografia da Figura 4 são mostradas as imagens de todas as amostras antes e após acondicionamento

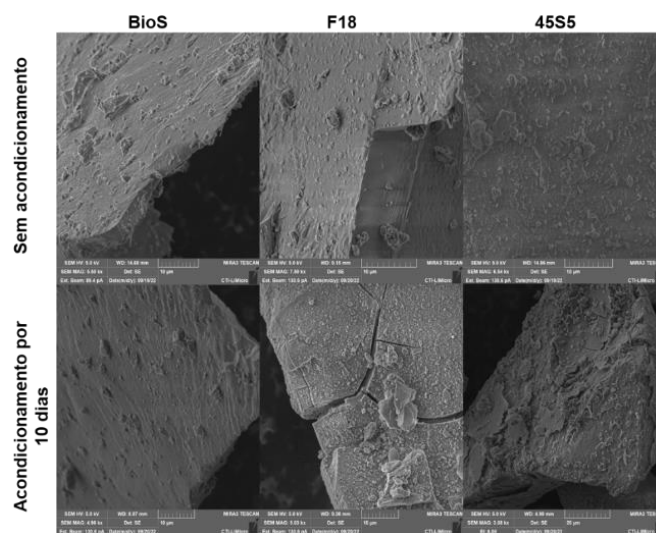


Figura 4- Micrografias do antes e após do condicionamento das amostras em meio de cultivo DMEM.

A amostra de BioS não se observa aparentemente mudanças em sua superfície. Diferentemente das amostras de 45S5 nota-se surgimento de uma textura mais irregular após o condicionamento, e para F18 é visível a formação de fissuras que se assemelha a trincas no material. Souza (2015), obteve resultados semelhantes em suas fibras de vidro F18 (SOUZA, 2015). Para todos os casos, isso se deve possivelmente a reações químicas na superfície do material devido a troca iônica com o meio de cultivo.

A literatura mostra que, conforme o material é exposto a meio aquoso, ocorre a troca entre os íons de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  presente na superfície do material (LÓPEZ-CUEVAS; LÓPEZ-BADILLO; MÉNDEZ-NONELL, 2021). Como consequência, ocorre aumento do grupo silanol que resulta na formação de uma camada de sílica porosa, que possuem a capacidade de absorver íons da solução, tais como de cálcio e fósforo. Como consequência, levando a formação de apatita sobre a superfície do material (RENNO et al., 2013), (LÓPEZ-CUEVAS; LÓPEZ-BADILLO; MÉNDEZ-NONELL, 2021).

Na Tabela 2 é possível observar a quantidade de íons presentes no meio após acondicionamento de cada material.

Tabela 2- Caracterização química por ICP extratos acondicionados.

Amostras	Si (mg. L <sup>-1</sup> )	Ca (mg. L <sup>-1</sup> )	Na (mg. L <sup>-1</sup> )	P (mg. L <sup>-1</sup> )
<b>BioS</b>	< LD	34,51	4.160	14,10
<b>F18</b>	< LD	51,52	3.759	16,62
<b>45S5</b>	<LQ	< LQ	4.357	8,481
<b>Meio DMEM</b>	6,03	73,3	2.725	45,3
<b>LD</b>	0,01	0,01	0,01	0,0001
<b>LQ</b>	0,50	0,50	0,50	0,005

\* Limite de detecção e quantificação dos métodos de análise utilizados expressão mg. L<sup>-1</sup>

Como apresentado na Tabela 2, a análise de ICP foi realizada na solução DMEM após a imersão dos materiais bioativos por 48h. Em todas as amostras rapara-se que houve grande liberação dos íons de Na<sup>+</sup> e posteriormente Ca<sup>2+</sup>. Isso é esperado, uma vez que esse tipo de biomaterial quando em meio salino ocorre a dissolução do material devido as trocas catiônicas com a solução(OUDADESSE et al., 2011; RENNO et al., 2013) . Para o caso do sódio, possivelmente ocorre maior dissolução devido a sua maior proporção nas composições de todas amostras quando comparado aos demais componentes.

Além disso, deve ser considerado que no meio de cultura existe há presença de elementos essenciais para manutenção celular, dessa forma elevando o índice de sódio no sistema. No trabalho de Lópes e colaboradores (2011), eles observaram também maior aumento dos íons de cálcio e fosfato em período de 6 dias, na proporção de 200 e 40 mg. L<sup>-1</sup> respectivamente (LÓPEZ-CUEVAS; LÓPEZ-BADILLO; MÉNDEZ-NONELL, 2021). O aumento de espécie iônicas em solução é esperada para materiais bioativos. Neste estudo, a biocompatibilidade foi investigada pelo ensaio *in vitro* de citotoxicidade por MTT. A Figura 5 mostra o ensaio de citotoxicidade *in vitro* sem e com acondicionamento de sua superfície. Observa-se que o controle (meio com células) refletem a qualidade do teste, uma vez que os valores de viabilidade entre os materiais bioativos podem ser comparados com valores obtidos no experimento.

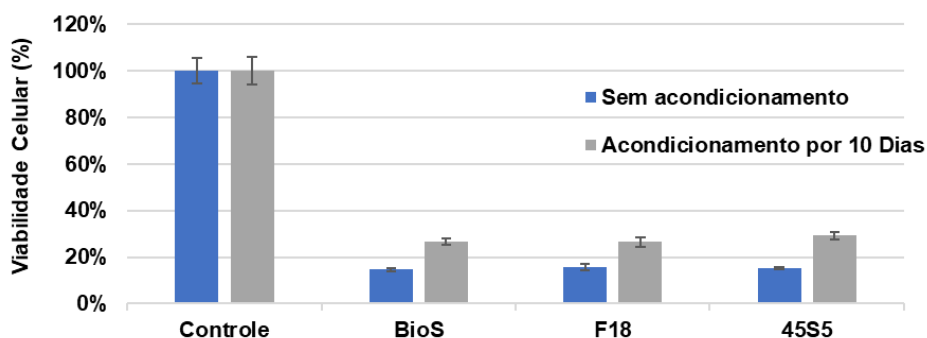


Figura 5 – Ensaio de citotoxicidade dos materiais bioativos sem acondicionamento

De acordo com a norma 10993-5 os resultados obtidos mostraram-se citotóxico, com viabilidade celular em torno de 10% para todas as amostras sem acondicionamento. Assim, com objetivo de identificar um protocolo que propicie o uso desses materiais, tal como aplicações de tratamento intermediários de lixiviações, os pós foram submetidos à sucessivos enxagues com meio de cultivo não suplementado por um período de 10 dias. Ainda na Figura 2 é possível observar que os pós bioativos mesmo depois do condicionamento de 10 dias houve um aumento

de da viabilidade celular próximo de 30% provavelmente isso se deve devido menor concentração de espécies reativas no sistema. No entanto, os resultados do experimento indicam mesmo com tratamento a viabilidade celular encontra-se abaixo do recomendado acerca de 70%.

Ainda na busca por um protocolo que permita obter um protocolo para os vidros bioativos. Nesta parte da investigação, utilizamos a concentração do 0,1mg/ ml de material para preparação dos extratos do BioS, F18 e 45S5 (OLIVEIRA et al., 2022). Como controle, utilizamos materiais referências como látex, alumina para observar o efeito dos extratos obtidos após o condicionamento por 3 e 7 dias.

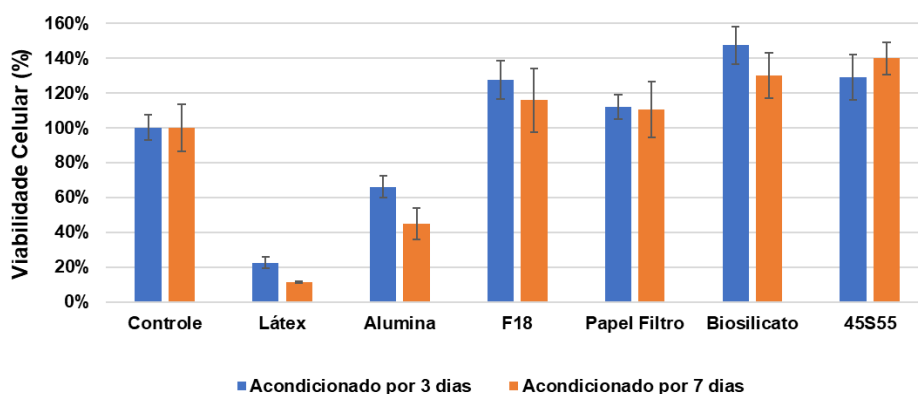


Figura 6- Ensaio de citotoxicidade metodologia adaptada, utilizando concentração de 0,1mg/ml.

Nota-se na Figura 6 que devido a menor concentração do material houve um aumento da viabilidade celular de todos os vidros bioativos acima de 70% de viabilidade. Possivelmente devido à baixa concentração de íons disponíveis não houve deslocamento de equilíbrio, dessa forma as células conseguiram se adaptar mais facilmente já que o meio fisiológico é torno de 7,4 (RISMANCHIAN et al., 2013). Embora este estudo está processo de finalização, percebe-se que as concentrações utilizadas estão diferentes do que indicada pela Norma ISO 10993-12.

#### 4. Conclusão

Neste trabalho foi possível observar que o tratamento superficial com condicionamento de 10 dias permitiu a melhora da viabilidade celular, que passou de 10% para as amostras sem tratamento para aproximadamente 30% após condicionamento em todos os casos. Bons resultados de viabilidade celular estão acima de 70%, indicando a necessidade de melhoria no tratamento de superfície das amostras analisadas. Sendo assim, como perspectivas futuras a otimização de protocolo

#### Referências

- ABBASI, N. et al. *Porous scaffolds for bone regeneration. Journal of Science: Advanced Materials and Devices*, v. 5, n. 1, p. 1–9, mar. 2020.
- ARAUJO, Mariana S. et al. *Structural and thermal behavior of 45S5 Bioglass®-based compositions containing alumina and strontium. Journal of the American Ceramic Society*, v. 103, n. 6, p. 3620-3630, 2020.
- BAJAJ, P. et al. *3D Biofabrication Strategies for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. Annual Review of Biomedical Engineering*, v. 16, n. 1, p. 247–276, 11 jul. 2014.



- CERRUTI, M.; GREENSPAN, D.; POWERS, K.** *Effect of pH and ionic strength on the reactivity of Bioglass® 45S5*. *Biomaterials*, v. 26, n. 14, p. 1665–1674, maio 2005.
- CROVACE, M. C. et al.** *Biosilicate® - A multipurpose, highly bioactive glass-ceramic. in vitro, in vivo and clinical trials*. *Journal of Non-Crystalline Solids*, v. 432, n. October 2017, p. 90–110, 2016.
- DAGUANO, J. K. M. B. et al.** *Shear-thinning sacrificial ink for fabrication of Biosilicate® osteoconductive scaffolds by material extrusion 3D printing*. *Materials Chemistry and Physics*, v. 287, 1 ago. 2022.
- DESIMONE, D. et al.** *Biosilicate® –gelatine bone scaffolds by the foam replica technique: development and characterization*. *Science and Technology of Advanced Materials*, v. 14, n. 4, p. 045008, 12 mar. 2013.
- HENCH, L.; WILSON, J.** *Surface-active biomaterials*. *Science*, v. 226, n. 4675, p. 630–636, 9 nov. 1984.
- LÓPEZ-CUEVAS, J.; LÓPEZ-BADILLO, C. M.; MÉNDEZ-NONELL, J.** *In vitro bioactivity of a glass-ceramic biomaterial with near-eutectic composition of the pseudo-binary system diopside-tricalcium phosphate*. *Boletín de la Sociedad Espanola de Ceramica y Vidrio*, v. 60, n. 2, p. 83–92, 1 mar. 2021.
- OLIVEIRA, R. L. M. S. et al.** *3D printing of bioactive glass S53P4/sodium alginate sintering-free scaffolds*. *Bioprinting*, v. 27, 1 ago. 2022.
- OUDADESSE, H. et al.** *Study of the Bioactivity of Various Mineral Compositions of Bioactive Glasses*. *Bioceramics Development and Applications*, v. 1, p. 1–3, 2011.
- PINTO, K. N. Z. et al.** *Scaffolds of bioactive glass-ceramic (Biosilicate®) and bone healing: A biological evaluation in an experimental model of tibial bone defect in rats*. *Bio-Medical Materials and Engineering*, v. 29, n. 5, p. 665–683, 2018.
- PITALUGA, L. H. et al.** *Electrospun F18 bioactive glass/PCL-Poly (ε-caprolactone)-Membrane for guided tissue regeneration*. *Materials*, v. 11, n. 3, 8 mar. 2018.
- PRASAD, S. et al.** *In vitro bioactivity and physical-mechanical properties of HA based 45S5 bio-composites*. *Key Engineering Materials*. Anais...Trans Tech Publications Ltd, 2016.
- RENNO, A. C. M. et al.** *Characterization and in vivo biological performance of biosilicate*. *BioMed Research International*, 2013.
- RISMANCHIAN, Mansour et al.** *In-vitro comparison of cytotoxicity of two bioactive glasses in micropowder and nanopowder forms*. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, v. 12, n. 3, p. 437, 2013.
- SOUZA, Marina Trevelin.** *Desenvolvimento e caracterização de tecidos vítreos flexíveis altamente bioativos*. 2015. Tese de doutorado do Programa de Ciência e Engenharia dos Materiais– Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) – São Carlos.