

# AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE CARBONO VÍTREO MONOLÍTICO (CVM) PARA FINS BIOMÉDICOS <sup>1</sup>

Rockfeller Maciel Peçanha <sup>2</sup>

Juliana Kelmy Macário de Faria Daguano <sup>3</sup>

Claudinei dos Santos <sup>4</sup>

Sizue Ota Rogero <sup>5</sup>

## Resumo

O presente trabalho tem como objetivo desenvolver e realizar a avaliação biológica preliminar de componentes de Carbono Vítreo Monolítico (CVM) obtidos por carbonização à vácuo, para fins na área médica, tais como na produção de válvulas cardíacas. Propriedades que tornam este material apropriado para este uso incluem boa resistência, durabilidade e, mais importante, “trombo-resistência”, ou habilidade de suportar coagulação sanguínea. Foram preparadas amostras de Carbono Vítreo utilizando substrato de resina termorrígida do tipo furfurílica. O processo utilizado na fabricação das amostras é basicamente o processo de carbonização à vácuo, por um período de 48h. A densidade relativa do material foi calculada e também foram realizadas difrações de raios-X para análise das fases presentes. Além disso, propriedades mecânicas importantes como dureza e tenacidade à fratura foram avaliadas. Realizou-se também testes de avaliação biológica preliminares, sendo que para a realização destes, utilizou-se o Método de Incorporação do Corante Vital Vermelho Neutro. Estes testes de citotoxicidade são baseados em cultura celular de mamíferos. Amostras de CVM com baixo grau de porosidade e dureza Vickers da ordem de 3 GPa foram obtidas. A avaliação biológica demonstrou que os materiais obtidos são biocompatíveis, devido ao crescimento celular apresentado durante o teste de citotoxicidade, independente do substrato utilizado. Portanto, esse polímero pode ser caracterizado como um biomaterial, adequado para aplicações biomédicas.

**Palavras-chave:** Biomateriais, Carbono vítreo monolítico (CVM); Caracterizações; Citotoxicidade

## CITOTOXICITY EVALUATION OF THE MONOLITHIC GLASS CARBON FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS

### Abstract

The goal of this work was the development and biological characterization of the compounds based on Monolithic Glass Carbon obtained by vacuum-carbonization, for medical applications. Glass carbon samples were prepared by carbonization, at vacuum for 48h. The relative density of the materials was evaluated by Archimedes' principle. Furthermore XRD was used by phase analysis. Hardness and fracture toughness were characterized. Samples with low porosity and Vickers near to 3 GPa were obtained. Samples were submitted the “in vitro” cytotoxicity tests for preliminary biological evaluation. In the tests, extracts of the materials were used to be tested in contact with a mammalian cell culture (NCTC-clone L929 cell line) as positive (phenol solution) and negative (no toxic PVC pellets) extracts controls. The cytotoxicity evaluation was carried through using the neutral red uptake methodology. The obtained results showed that materials did not present cytotoxic character. So, these materials are strong candidates to be applied in implantation systems.

**Key-words:** Biomaterials; Glass carbon; Characterizations; Citotoxicity.

<sup>1</sup> Contribuição técnica ao 62º Congresso Anual da ABM – Internacional, 23 a 27 de julho de 2007, Vitória – ES, Brasil.

<sup>2</sup> Pesquisador da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

<sup>3</sup> Aluna de pós-graduação da Escola de Engenharia de Lorena – DEMAR-EEL-USP

<sup>4</sup> Professor/Pesquisador da Escola de Engenharia de Lorena – DEMAR-EEL-USP

<sup>5</sup> Pesquisadora do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN

## 1 INTRODUÇÃO

O estudo e a obtenção de materiais carbonosos são de significativa importância porque atualmente são considerados como produtos de tecnologia de ponta, utilizados nas áreas da química, da medicina, da engenharia e da aeronáutica. O Carbono Vítreo aparece como uma boa opção dentre estes materiais, pois apresenta elevada resistência à flexão, baixo coeficiente de expansão térmica, alta resistência ao ataque químico, baixa resistividade elétrica e boa biocompatibilidade.

O Carbono Vítreo é um material isotrópico, não grafitizável, formado pela pirólise de um polímero termofixo, ou seja, com ligações cruzadas. Este material pertence à classe dos materiais frágeis e as suas propriedades mecânicas são influenciadas por sua porosidade.<sup>[1]</sup> O carbono vítreo não possui arranjo dos átomos de carbono de ordenação a longa distância em suas dimensões, além de possuir aspecto brilhante após polimento e também pelo fato de que sua fratura é semelhante à do vidro, i.e., do tipo conchoidal.

O material em estudo apresenta um excelente potencial de aplicação na área biomédica, como por exemplo, material base para a manufatura de válvulas cardíacas. O tecido animal vivo é capaz de aderir à sua superfície sem problemas de inflamação ou rejeição.<sup>[2,3]</sup> Ainda não existe uma teoria aceita que explique a compatibilidade do sangue com as superfícies do carbono. No entanto, tais produtos têm mostrado que não alteram as proteínas ou a atividade enzimática do sangue, sendo esta a principal razão de sua boa interação com as células sanguíneas. Problemas de biodegradação dentro do corpo não são observados, devido à inércia química do carbono.<sup>[2,3]</sup>

A biocompatibilidade dos materiais pode ser avaliada por testes *in vitro* e *in vivo*. Os testes *in vitro* podem não representar a situação real de um implante. Contudo, eles podem promover alguns tipos de resultados preliminares relacionados à interação entre o material e o corpo biológico, de forma rápida e eficiente, minimizando a necessidade de testes em animais. O teste de citotoxicidade “*in vitro*” é classificado na ISO 10993-1, como um teste de avaliação inicial que utiliza técnicas de cultura de células.

No teste de citotoxicidade utilizam-se extratos dos materiais a serem testados em contato com uma cultura de células de mamíferos, em microplacas para cultura celular, de 96 poços, e a avaliação da citotoxicidade pode ser realizada utilizando-se o método de incorporação do corante vital vermelho neutro. O ensaio de incorporação do vermelho neutro é um teste *in vitro* eficaz, de baixo custo, reprodutível e quantitativo para selecionar substâncias potencialmente tóxicas. Está baseado no fato de que o vermelho neutro é um corante solúvel em água e que passa através da membrana plasmática e se concentra nos lisosomas de células vivas onde se fixa por ligações eletrostáticas nos sítios aniônicos da matriz lisosomal. Muitas substâncias danificam as membranas celulares e lisosomais resultando no decréscimo de captura e ligação do vermelho neutro. Portanto é possível distinguir entre células vivas e mortas pela medida da intensidade de cor final.

A proposta desse estudo é o desenvolvimento e avaliação biológica preliminar de componentes de carbono vítreo monolítico (CVM) obtidos por carbonização à vácuo, para fins na área médica.

## 2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

### 2.1 Processamento

O processo utilizado na fabricação de carbono vítreo monolítico (CVM) foi constituído basicamente do processo de carbonização à vácuo, desenvolvido e patenteado pelo Departamento de Física Aplicada do Instituto de Física da Unicamp,<sup>[4]</sup> onde foi utilizado um substrato de resina termorrígida do tipo furfurílica. O tempo de carbonização foi de 48 horas (à vácuo), na espessura de 3 milímetros.

#### 2.1.1 Obtenção

O processo de fabricação de carbono vítreo monolítico (CVM) mais utilizado é constituído basicamente do processo de carbonização em atmosfera inerte (argônio ou nitrogênio) de um substrato de resina termorrígida do tipo furfurílica. A utilização desses gases inertes tem custo e tempo de processamento elevado. Assim, foi desenvolvido um processo de produção do CVM com carbonização à vácuo, apresentando vantagens como menor perda no processo de carbonização devido a distorções nas peças e menor tempo de carbonização.

Como principal vantagem desse processo, o tempo de carbonização é diminuído de 96 horas (utilizando atmosfera inerte) para 48 horas (à vácuo), na espessura de 3 milímetros. O custo de produção do processo é menor devido a eliminação da atmosfera inerte, dos suportes de sustentação para a produção de peças complexas, menor relação entre homem/hora trabalhada na produção das peças e diminuição do consumo de energia elétrica.

#### 2.1.2 Preparação das amostras

As amostras previamente obtidas, pelos métodos já apresentados anteriormente, deverão ter área superficial específica de 3 cm<sup>2</sup>. Essas amostras serão lixadas, polidas e, em seguida esterilizadas.

### 2.2 Caracterizações

A densidade relativa das amostras foi determinada relacionando a massa específica após a sinterização e a densidade real do material. A massa específica das amostras foi determinada pelo método de imersão proposto por Arquimedes. Análise de fases cristalinas presentes nas amostras, foram realizadas por difratometria de raios X, utilizando radiação Cu-K $\alpha$  com varredura entre 10° e 80°, com passo angular de 0.05° e tempo de contagem de 2s por ponto.

#### 2.2.1 Propriedades mecânicas

A dureza e tenacidade à fratura de cada amostra desenvolvida foi determinada usando-se penetradores de diamante dos tipos Vickers,<sup>[5]</sup> sabendo-se que este tipo de material sofre recuperação elástica, quando o penetrador deixa a superfície da amostra que está sendo ensaiada.

### 2.3 Avaliação Biológica

Os testes *in vitro* para a análise da citotoxicidade, através do método de incorporação do Vermelho Neutro,<sup>[6]</sup> foram realizados de acordo com a norma ISO 10993-5:<sup>[7]</sup> Amostras dos materiais foram esterilizadas e adicionadas em Meio Mínimo de Eagle (MEM) na proporção de 1 cm<sup>2</sup>/mL e incubado por 48h a 37°C.

Diluições seriadas foram feitas dos extratos de amostras, de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (controle negativo) e de solução de fenol 2% (controle positivo).

Para o preparo da suspensão celular, primeiramente houve o cultivo das células NCTC-clone L929 de tecido conectivo de camundongo, originária da American Type Culture Collection [ATCC-(CCL1)], em garrafa de cultura celular ( $75\text{cm}^2$ ), em meio de cultura composto por Meio de Eagle (MEM) com adição de 10% de soro fetal bovino, aminoácidos não essenciais e piruvato de sódio (Meio-uso). Após confluência, a cultura foi tratada com solução ATV (Tripsina 0,2% e Versene 0,02%), para o destaque das células. A densidade celular foi avaliada em hemocítômetro e a suspensão celular foi ajustada para cerca de  $5 \times 10^3$  a  $5 \times 10^4$  células por mL. O preparo da microplaca consistiu na realização de uma suspensão celular de NCTC - clone L929 da ATCC-CCL1, de  $2,5 \times 10^5$  células/mL e distribuição de  $200\mu\text{L}$  em cada poço ( $5 \times 10^4$  céls/poço). A placa foi incubada em estufa úmida a  $37^\circ\text{C}$  e atmosfera com 5%  $\text{CO}_2$  por cerca de 24h, para atingir a confluência desejada.

O ensaio propriamente dito foi realizado através da adição de  $200\mu\text{L}$  de cada diluição do extrato em contato com as células aderidas em cada poço, em triplicata. Controles, positivo e negativo, receberam o mesmo procedimento da amostra, com concentrações de extrato de: 1= 100%; 2= 50%; 3= 25%; 4= 12,5% e 5= 6,25%. Os poços com controle de células receberam Meio-uso, isto é, meio de cultura composto por Meio de Eagle (MEM) com adição de 10% de soro fetal bovino, aminoácidos não essenciais e piruvato de sódio. Este controle corresponde a 100% de sobrevida celular.

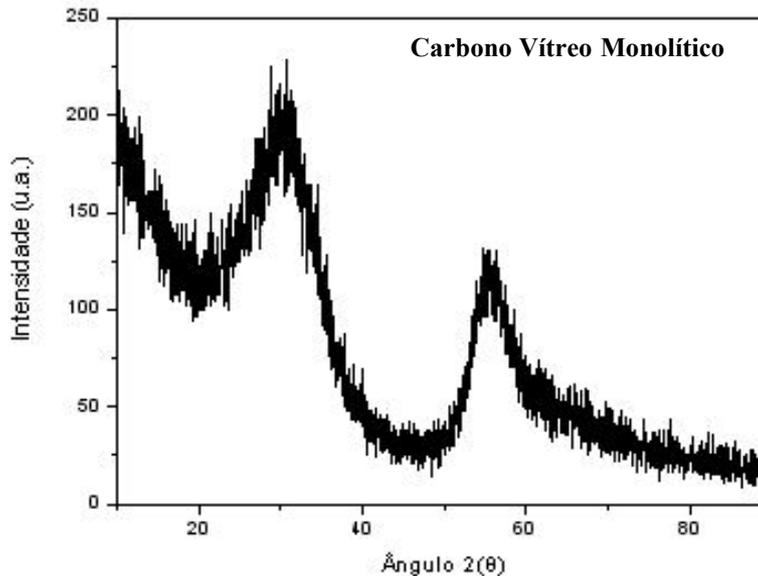
A placa foi então mantida em estufa úmida a  $37^\circ\text{C}$  e atmosfera com 5%  $\text{CO}_2$  por 24h. Decorrido este período os meios foram trocados por Meio-uso fresco contendo  $50\mu\text{g}$  do corante vermelho neutro/mL e a placa foi incubada por 3h para a incorporação do corante. Após esta etapa a placa foi lavada duas vezes com PBS e uma vez com a solução de lavagem e em seguida cada poço recebeu  $200\mu\text{L}$  de solução de extração, sendo esta solução constituída por 1% de ácido acético e 50% de etanol. A placa foi levada para leitor de ELISA com filtro de 540nm e filtro de referência de 620nm, e após ser agitada por 10 min, foi realizada leitura de densidade óptica em 540nm.

Por último, foi calculada a média das leituras de densidade óptica de cada diluição e feita a comparação com a média do controle de células (100%), obtendo-se a % de sobrevida das células em cada diluição. Projetando-se em gráfico a % de sobrevida em função da diluição do extrato obteve-se uma curva, na qual pode ser encontrado o índice de citotoxicidade ( $\text{IC}_{50\%}$ ) do material.  $\text{IC}_{50\%}$  significa a concentração do extrato que lesa ou mata 50% da população celular no ensaio de citotoxicidade.

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1 Caracterização das Amostras**

A Figura 1 apresenta os resultados de difração de raios X das amostras de carbono vítreo desenvolvidas nesse trabalho. O aspecto do difratograma é de um material amorfo sem a presença de picos cristalinos bem definidos.



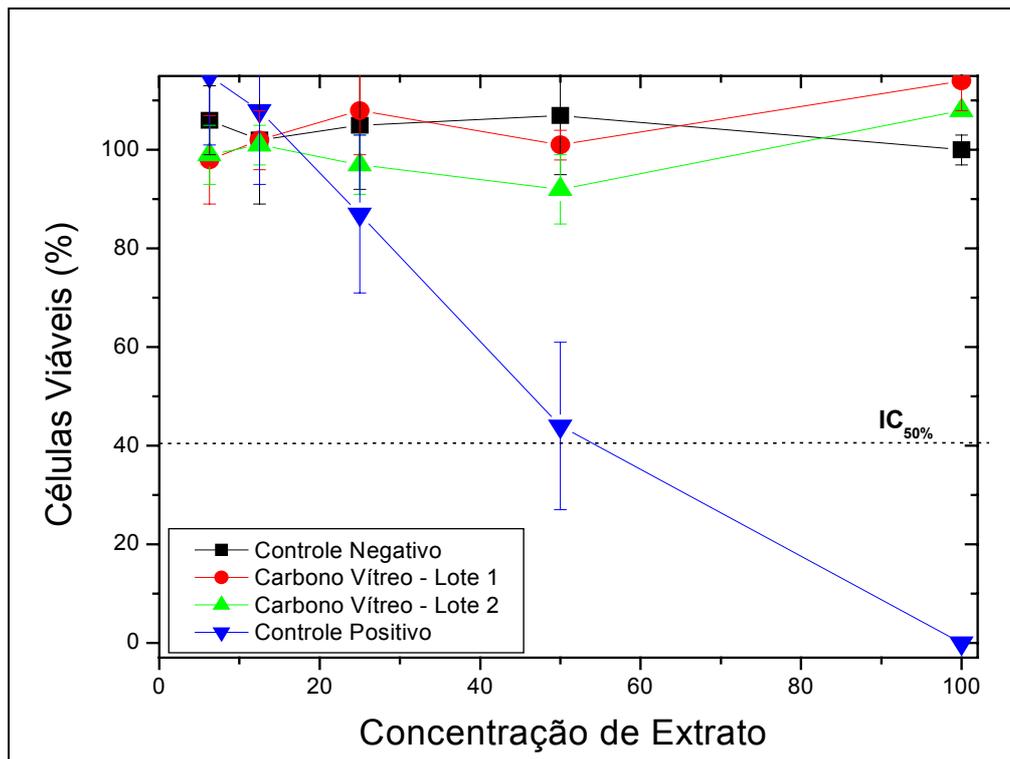
**Figura 1** - Difratograma de raios X, do carbono vítreo monolítico.

Os resultados de densidade relativa indicaram valores promissores para esse material, quando obtidos pelo processo à vácuo. A densidade relativa ficou acima de 95%, ou seja, o material apresenta menos de 5% de porosidade fechada em sua estrutura.

Os resultados dos testes de dureza indicaram valores da ordem de 3GPa, para os materiais desenvolvidos, compatíveis com dados obtidos na literatura.<sup>[8]</sup> Os resultados de tenacidade à fratura se apresentaram incoerentes, para o uso da técnica de indentação Vickers, já que esta é uma técnica não destrutiva e precisa, porém, a maioria das impressões não é clara, devido ao Carbono Vítreo ser considerado um material frágil/elástico e a impressão ser caracterizada por uma substancial recuperação elástica.<sup>[8]</sup> Os relatos referentes a tenacidade desse material indicam a presença de valores que variam entre  $0,5 \text{ MPam}^{1/2}$  e  $1,2 \text{ MPam}^{1/2}$ .<sup>[8]</sup> Somente em algumas amostras de Carbono Vítreo foram observadas a geração e a propagação de trincas nas vizinhanças da impressão, para algumas cargas aplicadas. De acordo com Ostojic e McPherson,<sup>[9]</sup> penetradores pontiagudos podem comportar-se como penetradores arredondados produzindo cones hertzianos, caso o material contenha um grande número de falhas como, por exemplo, alta porosidade.

### 3.3 Avaliação Biológica

Na Figura 2, mostra-se o resultado obtido para amostras de Carbono Vítreo Monolítico obtido pelo processo à vácuo.



**Figura 2** – Ensaio de citotoxicidade: Análise das amostras de CVM.

Pelo gráfico de citotoxicidade pôde-se perceber que as amostras obtiveram um ótimo resultado, já que foram obtidas porcentagens de células viáveis em torno de 100%. Valores indicativos acima de 100%, com desvios-padrões de até 10% são inerentes do sistema de leitura através de densidade ótica, porém os mesmos são consideráveis aceitáveis para o tipo de ensaio realizado.<sup>[6]</sup> Assim, de acordo com os resultados apresentados, nenhum material mostrou citotoxicidade, exceto o controle positivo. Isto porque o controle positivo é aquele que simula condições inadequadas para o crescimento celular. Demonstrou-se ainda que não há diferença na citotoxicidade entre os materiais obtidos de diferentes substratos.

Além disso, através deste teste, garante-se que não houve contaminação em quantidade significativa durante o processamento, não comprometendo o experimento.

#### 4 CONCLUSÕES

Amostras de Carbono Vítreo Monolítico (CVM) de elevada densidade relativa foram obtidas e apresentaram-se com alta fração de fase amorfa, conforme comprovado pelo difratograma de raios-X. Os resultados de dureza Vickers desse material indicaram dureza da ordem de 3 GPa. A técnica de indentação vickers não se mostrou eficaz para caracterizar a tenacidade a fratura desse material. Os testes de citotoxicidade apresentaram ótimos resultados, mostrando que o material em estudo apresenta grande tendência a ser um material biocompatível. Este fato é muito importante já que busca-se um material para posterior aplicação em válvulas cardíacas. Ainda sobre a avaliação biológica, constatou-se que o substrato utilizado para a formação do carbono vítreo não apresentou interferência significativa nos resultados, sendo assim, o material possui ótimas características biológicas em qualquer uma dessas condições.

## **Agradecimentos**

Os autores gostariam de agradecer a *FAPESP* (processo 04/04386-1) pelo apoio financeiro.

## **REFERÊNCIAS**

- 1 REZENDE, M.C., **Pore structure and mechanical property relationships in glassy carbon obtained from furfuryl and phenolic resins**. RELATÓRIO DE ESTÁGIO. Universidade de Bath/UK, School of Materials Science, 1989.
- 2 BOKROS, J.C.. **Carbon biomedical devices**. Carbon, 15:355, 1977.
- 3 JENKINS, G.M., GRIGSON, C.J..**The fabrication of artifacts out of glassy carbon and carbon-fiber-reinforced carbon for biomedical applications**. J. Biomed. Mater. Res., 13:372, 1979.
- 4 INPI – PEÇANHA, R. M. ; Gama ; Rezende ; Coelho ; Botelho ; Gonçalves . **Processo para obtenção de carbono vítreo monolítico em vácuo a partir de resina furfurílica** – Depósito 2004.
- 5 SOUZA, S.A.. **Ensaio Mecânicos de Materiais Metálicos – Fundamentos teóricos e práticos**. Ed. Edgard Blucher, Ltda, 5ª ed., 1982
- 6 ROGERO, S.O.; LUGÃO, A.B.; IKEDA, T.I.; CRUZ, A.S. **Teste in vitro de citotoxicidade: Estudo comparativo entre duas metodologias**. Mater. Res. 2003, 6(3): 317-320.
- 7 ISO document 10993-5, **Biological evaluation of medical devices, Part 5, Tests for cytotoxicity: in vitro methods.**, 1992.
- 8 REZENDE, M.C., **Produção de carbono vítreo em escala de laboratório, a partir de resina furfurílica e fenólica (volume I)**. Tese de Doutorado; EP-USP – São Paulo, 1991.
- 9 OSTOJIC, P., MCPHERSON, K.. **A review of indentation fracture theory: its development, principles and limitations**. Internat. J. Fracture, 33:297, 1987.