

# Avaliação *in vitro* da biocompatibilidade dos braquiópodos para a elaboração de um novo material

José Reis dos Santos Júnior  
Abeno. Cotia – SP [Brasil]  
ju.88@uol.com.br

Kristianne Santos Porta Fernandes  
Uninove. São Paulo – SP [Brasil]  
kristianneporta@terra.com.br

Manoela Domingues Martins  
Uninove. São Paulo – SP [Brasil]  
mmmartinss@ig.com.br

Sandra Kalil Bussadori  
Uninove. São Paulo – SP [Brasil]  
skb@osite.com.br

Elaine Marcílio Santos  
UMC. São Paulo – SP [Brasil]  
elamarcilio@ig.com.br

Esta pesquisa avaliou *in vitro* a citotoxicidade dos braquiódopos em fibroblastos embrionários de ratos, para o desenvolvimento de um novo material. Os materiais foram colocados em lamínulas de vidro, depositadas nas células em cultura. Foram utilizados fibroblastos NIH-3T3 e plaqueados em  $1 \times 10^4$  células por placa de Petri. Nas culturas controle, as lamínulas de vidro foram adicionadas sem substância. Foram executados testes de longo prazo em períodos experimentais de um, três, cinco e sete dias; e de curto prazo, em zero, quatro, oito e 12 horas. Nesses períodos, efetuamos a contagem celular, em triplicata, para cada substância testada, pelo método de exclusão de células coradas pelo azul de Trypan. Em ambas as linhagens celulares, o material permitiu o crescimento celular e, por isso, concluiu-se que nenhuma das concentrações demonstrou ser citotóxica *in vitro*, em cultura de fibroblastos.

**Palavras-chave:** Biocompatibilidade. Chitosan. Citotoxicidade. Fosfato de cálcio. Quitina.

## 1 Introdução

Os braquiópodos são animais marinhos que possuem exoesqueleto formado por carbonato de cálcio, encerrado numa rede protéica, a quitina.

Arsenault, Castell e Ottensmeyer (1984) analisaram o exoesqueleto de crustáceos por meio de um microscópio eletrônico para estabelecer o inter-relacionamento do cálcio, do fósforo e do enxofre, presentes em cada estrutura anatômica. Na fase inicial de mineralização, o exoesqueleto se divide em zona endocuticular e lamelar, contendo uma densa camada de cálcio. Nessa fase, não há conexão com as microfibrilas. Nas fases posteriores de desenvolvimento, depósitos minerais existentes na exocutícula avançam para a endocutícula. As alterações morfológicas e químicas são associadas com a mineralização e desmineralização do exoesqueleto dos braquiópodos.

Fernandez Monagas e colaboradores (1988), em seu estudo, observaram que a quitina (substância presente nas carapaças dos crustáceos), quando associada ao ácido sulfúrico, pode ser utilizada como anticoagulante sangüíneo.

Velasco e colaboradores (1989) realizaram um estudo comparativo, usando substrato da concha desmineralizada de camarão ou quitina semipurificada e observaram que a produção de quitinase, quando usada com concha de camarão, está associada ao crescimento microbiano. Verificaram que, nessas condições, a produção máxima de quitinase, quititosanase, carboximetilcelulase e de protease alcançada se deu após 96 horas de incubação.

O carbonato de cálcio, ao entrar em contato com a água, forma o ácido carbônico, que dá origem ao bicarbonato de sódio e aos íons  $H^+$ , responsáveis pelo poder tampão, como foi observado por Fernandez Monagas (1998), num estudo realizado para verificar a atividade da lisozima sobre a carboximetilquitina e carboximetilquitosana, em que concluiu que ambas são hidrolisadas em condições fisiológicas.

Mattioli-Belmonte e colaboradores (1999) realizaram um estudo em que comprovaram a eficácia do fosfato de cálcio, quando associado ao quitosano, para uso em odontologia restauradora e endodôntica.

Revoredo e colaboradores (1998) estudaram os possíveis veículos em que a quitina apresentaria melhores resultados como princípio ativo. Os veículos testados foram o aquoso e o oleoso. A avaliação *in vitro* mostrou que a maior porcentagem de quitina liberada estava no veículo oleoso.

Varma e colaboradores (1999) observaram, em seu estudo, que o fosfato de cálcio induziu a formação de hidroxiapatita ao longo do tempo.

Fernandez Monagas (2000) também pesquisou as propriedades físico-químicas de três carboximetilados derivados da quitina, obtidas das conchas de lagostas. O comportamento hidrodinâmico das soluções dessas substâncias foi analisado, comprovando-se as características polieletrólíticas.

Muzzarelli e Muzzarelli (2002) constataram que o carbonato de cálcio, fosfato de cálcio e sílica apresentavam compatibilidade sangüínea ao serem utilizados em cimentos para reparação e reconstituição óssea.

Teixeira (2002) realizou um estudo com carapaças de crustáceos em que observou, *in vitro*, o potencial antimicrobiano de alguns derivados da quitina, tais como quitosona e carboximetilquitosona, em diferentes pesos moleculares e graus de desacetilação para enfrentar os microorganismos da cavidade bucal.

Xu e colaboradores (2002) verificaram que o cimento de fosfato de cálcio (CPC) usado para formar hidroxiapatita não apresentava bons resultados em periápice e em dentes com mobilidade. Para sanar essa deficiência do produto, os autores fizeram uma combinação do cimento de fosfato de cálcio com quitosano, obtendo um módulo flexural maior e mais resistente quando aplicado em regiões que sofrem maior tensão.

Na utilização clínica de um novo biomaterial, são necessários inúmeros estudos, entre os quais o estudo inicial sobre a avaliação da

biocompatibilidade do produto, de modo que comprove a sua segurança e possibilite sua aplicação odontológica (SILVA et al., 2003).

## 2 Objetivos

O objetivo deste estudo foi o de avaliar, *in vitro*, a biocompatibilidade das conchas trituradas (braquiópodos), o que servirá de base à futura elaboração de um novo material para proteção do complexo dentina-polpa e restaurações de cavidades dentárias.

## 3 Materiais e método

As conchas trituradas e refinadas foram colocadas em lamínulas de vidro e depositadas nas células em cultura.

Para a execução deste estudo foram utilizadas células NIH-3T3, fibroblastos originados de embriões de camundongos, linhagem celular contínua de células com alta inibição de contato (ATCC CRL 1658). Todos os procedimentos experimentais foram realizados sob capela de fluxo laminar.

Um tubo criogênico contendo as células congeladas foi rapidamente descongelado (60 segundos) em banho de água a 37 graus Celsius (°C). Para a remoção da substância crioprotetora (dimetilsulfóxido [DMSO]), o conteúdo da ampola foi transferido para um tubo de ensaio contendo 10 mililitros (mL) de meio de cultura e centrifugado a 300 gramas (g) durante cinco minutos, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e o precipitado de células, resultante da centrifugação, ressuspenso em 1 mL de meio de cultura fresco. A suspensão de células foi transferida para um frasco plástico de cultivo celular de 25 centímetros quadrados (cm<sup>2</sup>) de área cultivável, contendo 5 mL de meio de cultura fresco. O meio de cultura utilizado foi o de Eagle, modificado por Dulbecco (Dmem-Sigma Chemical Co., St. Louis, Estados Unidos), contendo 10%

de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, São Paulo, Brasil) e 1% de solução antibiótica-antimicótica (Sigma).

As células foram mantidas em estufa a 37 °C, numa atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub>. A monitorização do crescimento celular realizou-se a cada 24 horas, utilizando-se microscópio invertido de fase. O subcultivo foi feito quando a monocamada celular se tornou subconflente.

A ação do contato dessas drogas sobre os fibroblastos cultivados foi analisada por meio da resposta celular imediata (testes de curto prazo), após zero, quatro, oito e 12 horas, e da sobrevivência celular (testes de longo prazo), depois de um, três, cinco e sete dias.

As células foram plaqueadas numa densidade de  $1 \times 10^4$  células, em placas de Petri de 60 milímetros (mm) de diâmetro, e, depois de obtida a confluência (72 horas), depositadas em lamínulas de vidro de 15 mm, contendo 0,06 g da substância a ser testada; as culturas controle, entretanto, receberam lamínulas de vidro sem material.

Após o contato das células com as substâncias, as células de três placas de Petri, para cada período experimental, foram tripsinizadas e contadas em câmaras de Neubauer, utilizando-se o método de exclusão de células coradas pelo azul de Trypan (FRESHNEY, 1990).

Os dados obtidos foram tratados com teste estatístico de Kruskal-Wallis, e as diferenças, consideradas significantes no nível de 5%.

## 4 Resultados

Realizamos dois testes de citotoxicidade: no primeiro, denominado teste de resposta celular imediata ou de curto prazo, analisamos a viabilidade celular sob a ação imediata do produto (zero a 12 horas); no segundo, chamado de teste de crescimento celular ou de longo prazo, avaliamos se o material interferia na capacidade proliferativa dos fibroblastos. Esses testes, se transferidos para a situação clínica, pode-

riam dar informações do que ocorreria com as células superficiais do tecido logo após a aplicação das drogas (testes de curto prazo), e do que se verificaria, tardiamente, naquele tecido que entrou em contato com as drogas (testes de longo prazo).

Na primeira fase da pesquisa, ou seja, nos testes de curto prazo, o material não foi tóxico. Ao contato com as culturas de fibroblastos NIH-3T3, esse material demonstrou viabilidade celular menor que a do grupo controle, mas permitiu que se chegasse até o fim do experimento.

Por meio da análise dos valores obtidos, referentes à viabilidade celular apresentada no experimento de curto prazo, pôde-se observar que o material à base de óxido de cálcio não foi citotóxico, demonstrando uma porcentagem de viabilidade em torno de 80%, cuja diferença, com relação ao grupo controle, não foi, estatisticamente, significativa.

Na segunda fase de nossa pesquisa, estudamos a reação dos fibroblastos NIH-3T3, cultivados em contato com o material por meio da construção de curvas de crescimento celular, caracterizando os experimentos de longo prazo, o que demonstra uma proliferação celular semelhante à do grupo controle.

Nos experimentos de longo prazo, observou-se que, após o período de um dia do contato das substâncias com as células, todos os grupos experimentais apresentaram viabilidade celular entre 80 e 100%, e que, a partir desse período, as substâncias provocaram redução dessa viabilidade.

## 5 Discussão

Os braquiópodos são animais invertebrados envoltos por uma concha ou carapaça calcária, em que há uma substância complexa, denominada quitina, constituindo as paredes (ARSENAULT; CASTELL; OTTENSMEYER, 1984; FERNANDEZ MONAGAS et al., 1988; FERNANDEZ MONAGAS, 1998).

Os conhecimentos acerca da evolução dos materiais odontológicos promoveram mudanças na abordagem e no tratamento da cárie, por meio das técnicas de restaurações atraumáticas (ART). Com isso, a crescente necessidade de uma odontologia mais conservadora e prática tem impulsionado uma série de pesquisas, com o intuito de buscar novas técnicas que a simplifiquem de modo que minimizem seus inconvenientes, restabelecendo de maneira simples, porém eficaz, as funções orais e a saúde bucal.

Por esse motivo, surgiu a idéia de desenvolver um novo material, o óxido de cálcio, cuja matéria base temos em abundância em nosso país: conchas de crustáceos compostas de cálcio e quitina.

A quitina, que apresenta potencial anticoagulante, tem-se mostrado biocompatível, como pode ser observado quando combinada com ácido sulfúrico (FERNANDEZ MONAGAS et al., 1988), ou com quitosana (MATTIOLLI-BELMONTE et al., 1999; XU et al., 2002), além de seus derivados terem potencial antimicrobiano (VELASCO et al., 1989, TEIXEIRA, 2002).

O carbonato de cálcio e a quitina mostraram-se capazes de induzir a formação de hidroxiapatita (VARMA et al., 1999; MUZZARELLI; MUZZARELLI, 2002; XU et al., 2002), o que sugere pesquisas na área odontológica para avaliar o potencial indutor da formação de dentina reacional, viabilizando, por exemplo, o seu uso em técnicas de restaurações atraumáticas (ART) ou em cimentos de forramento.

A carboximetilquitina e a carboximetilquitosana, principais derivados da quitina, são hidrolisadas em condições fisiológicas (FERNANDEZ MONAGAS, 1998), formando ácido carbônico, que origina o bicarbonato de sódio e os íons  $H^+$ , responsáveis pelo poder tampão, e mostram, por meio de seu comportamento hidrodinâmico, sua capacidade polieletrólítica (FERNANDEZ MONAGAS, 2000). Porém, o veículo em que houve sua maior liberação foi o oleoso, como pode ser observado por Revoredo e colaboradores (1998).

Quando se desenvolve um novo produto, é extremamente necessário que se realizem testes laboratoriais e clínicos que comprovem sua não-toxicidade para os tecidos nos quais será utilizado. Tais cuidados permitem a utilização clínica segura desse novo produto, além de fornecer mais subsídios que permitam seu emprego pelos profissionais.

A toxicidade de um material dentário pode ser avaliada em experimentos com animais, em estudos clínicos com humanos e em testes *in vitro* (LARSSON, 1994). O sistema biológico mais utilizado para testes de toxicidade *in vitro* é a cultura celular e constitui valioso instrumento para observar a reação celular em relação aos materiais dentários. O principal objetivo da técnica de análise da citotoxicidade utilizando o cultivo celular é permitir o estudo do comportamento celular em um meio controlado, livre das complexas interações do organismo. Para a sua execução, a metodologia de cultura de células ou de tecidos necessita do uso de equipamentos especializados, tais como capela de fluxo laminar e incubadoras que mantenham as condições de manutenção de viabilidade celular, com níveis adequados de temperatura e atmosfera. As vantagens dessa metodologia são controle ambiental das células, facilidade de execução, rapidez e baixo custo (FRESHNEY, 1990).

Por essa razão, avaliamos *in vitro* a ação dessas substâncias sobre culturas de fibroblastos, por meio do método de exclusão de células coradas pelo azul de Trypan.

A forma de preparo do material é de extrema importância para utilizar a metodologia *in vitro*. O ideal é preparar e testar o material, observando como foi usado clinicamente (SPANGBERG; PASCON, 1988), sendo mais importante padronizar a área de superfície ativa da peça-teste em contato com as células do que o peso do material utilizado (KAWAHARA; IMANISHI; OSHIMA, 1979). Nessas condições, o óxido de cálcio foi aplicado nas lamínulas de vidro introduzidas nas placas de Petri, nas quais colocamos as substâncias em contato direto com as células.

## 6 Considerações finais

Nos experimentos de curto prazo, pôde-se verificar que, após a aplicação do material, houve sobrevivência de células viáveis em todas as fases do experimento.

Nos experimentos de longo prazo, constatou-se que o óxido de cálcio, embora tivesse apresentado crescimento celular ligeiramente menor quando comparado ao grupo controle, permitiu crescimento até o último período experimental.

Nossos resultados nos levaram a concluir que nenhuma das concentrações demonstrou ser citotóxica *in vitro* em cultura de fibroblastos, tanto a curto quanto a longo prazo.

### *In vitro* evaluation of the biocompatibility the braquiopodes for the new elaboration materials

The purpose of this study was to carry out an *in vitro* evaluation of the cytotoxicity of conchs, to prepare a new material with calcium carbonate or calcium phosphate. The conchs were triturated and rained in fine drops. The material were placed in glass slides and after placed in cells cultured. We used cell line NIH-3T3 and gingival fibroblasts plaqued  $1 \times 10^4$  cells in Petri dish. The counting was realized in optic microscopioic in one, three, five and seven days and zero, four, eight and 12 hours. After the contact of the material in cells cultured, the cells number were determined by counting the cells using Trypan blue dye excluding assay. In both tests the material allowed cellular growing. The results conclude that: the material wasn't cytotoxicity *in vitro* in fibroblasts cultured.

**Key words:** Biocompatibility.  
Calcium phosphate. Chitin. Chitosan.  
Cytotoxicity.

## Referências

ARSENAULT, A. L.; CASTELL, J. D.; OTTENSMEYER, F. P. The dynamics of exoskeletal-epidermal structure during molt in juvenile lobster by electron microscopy and electron spectroscopic imaging. *Tissue and Cell*, Edimburgo, v. 16, n. 1, p. 93-106, 1984.

FERNANDEZ MONAGAS, S. A. Características hidrodinámicas de carboximetilquitina y carboximetilquitosana. *Revista Cubana de Farmacia*, Havana, v. 34, n. 1, p. 6-11, 2000.

FERNANDEZ MONAGAS, S. A. et al. Sulfatos de quitina y quitosana como anticoagulantes sanguíneos. *Revista Cubana de Farmacia*, Havana, v. 22, n. 13, p. 11-18, 1988.

FERNANDEZ MONAGAS, S. A. Hidrólisis enzimática de carboximetilquitina y carboximetilquitosana. *Revista Cubana de Farmacia*, Havana, v. 32, n. 2, p. 125-129, 1998.

FRESHNEY, R. I. *Culture of animal cells: a manual of basic technique*. 2. ed. Nova York: Wiley-Liss, 1990.

KAWAHARA, H.; IMANISHI, Y.; OSHIMA, H. Biological evaluation on glass ionomer cement. *The Chinese Journal of Dental Research*, New Malden, v. 58, n. 3, p. 1.080-1.086, 1979.

LARSSON, K. S. Screening tests for systemic effects of dental materials. *Journal of Dentistry*, Londres, v. 22, n. 2, p. 12-15, 1994.

MATTIOLI-BELMONTE, M. et al. Bioactivity of chitosan in dentistry. Preliminary data on chitosan-based cements. *Minerva Stomatologica*, Turim, v. 48, n. 12, p. 567-576, 1999.

MUZZARELLI, C.; MUZZARELLI, R. A. Natural and artificial chitosan-inorganic composites. *Journal Inorganic Biochemistry*, Ancona, v. 92, n. 2, p. 89-94, 2002.

REVOREDO, O. B. et al. Utilización de quitina en formas farmacéuticas. I Ungüento. *Revista Cubana de Farmacia*, Havana, v. 32, n. 3, p.188-193, 1998.

SILVA, L. R., et al. Remoção da cárie com Carisolv. *Revista Gaúcha de Odontologia*, Porto Alegre, v. 51, n. 4, p. 282-284, 2003.

SPANGBERG, L.; PASCON, E. A. The importance of material preparation for the expression of cytotoxicity during *in vitro* evaluation of biomaterials. *Journal of Endodontics*, Baltimore, v. 14, n. 5, p. 247-250, 1988.

TEIXEIRA, J. A. *Ação antimicrobiana 'in vitro' de derivados da quitina sobre bactérias orais organizadas em biofilme*. 2002. Dissertação (Mestrado em Odontologia Social)- Departamento de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2002.

VARMA, H. K. et al. Porous calcium phosphate coating over phosphorylated chitosan film by a biomimetic method. *Biomaterials*, Oxford, v. 20, n. 9, p. 879-884, 1999.

VELASCO, A. C. et al. Producción de enzimas por streptomycoses sp crescendo con caparazón de camarón como sustrato. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, Cuernavaca, v. 31, n. 1, p. 71-76, 1989.

XU, H. H. K. et al. Processing and properties of strong and non-rigid calcium phosphate cement. *Journal of Dental Research*, Alexandria, v. 81, n. 3, p. 219-241, 2002.

Recebido em 15 mar. 2006 / aprovado em 17 jun. 2006

### Para referenciar este texto

SANTOS JÚNIOR, J. R. de., et al. Avaliação in vitro da biocompatibilidade dos braquiópodos para a elaboração de um novo material. *ConScientiae Saúde*, São Paulo, v. 5, p. 91-96, 2006.