

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Redução da biocarga e garantia de esterilidade em implantes mamários de silicone

Glaucia Cristina Mello Santos

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Profa. Titular Terezinha de Jesus Andreoli Pinto

São Paulo
2009

Glaucia Cristina Mello Santos

Redução da biocarga e garantia de esterilidade em implantes mamários de silicone

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto
orientador/presidente

Profa. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado

Profa. Dra. Maria Jose Vieira Fonseca

São Paulo, 16 de dezembro de 2009.

*A Deus,
por demonstrar perfeito e constante amor,
concedendo-me muito mais do que necessito
e tornando os meus dias cheios de alegria e
esperança, por sentir a Sua presença*

*Ao meu esposo Roni,
pelo incentivo, pelo carinho, pelo apoio, pelo amor,
pela dedicação permanente buscando tornar meus
sonhos realidade*

*Aos meus pais, Hudson e Angela,
por sua existência, por serem simplesmente
maravilhosos*

*À minha família querida,
pelo constante apoio, em qualquer situação*

*À Prof^a Terezinha,
pelo voto de confiança, pela compreensão e exemplo*

Agradecimentos

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

Às analistas do CONFAR, Cleide, Diane, Glaucia e Sueli pela amizade e preciosa colaboração na execução deste trabalho.

À Felipe, Satiko, Marly, Túlia, Delia e Gabi, pelo apoio e incentivo.

À empresa SILIMED – Silicone e Instrumental Médico Hospitalar, pelo fornecimento dos implantes mamários de silicone

Ao CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo auxílio financeiro.

A todos que colaboraram para que a conclusão de mais esta etapa fosse possível.

RESUMO

SANTOS, G. C. M. **Redução da Biocarga e Garantia de Esterilidade em Implantes Mamários de Silicone**. 2009. 87 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2009.

Os implantes mamários de silicone constituem-se em biomateriais os quais têm sido amplamente utilizados em cirurgias para reconstituição da mama após ocorrência de câncer, acidentes, correção do tamanho dos seios quando há uma diferença de volume entre eles, ou até mesmo, para o aumento do tamanho da mama por motivos estéticos. Com o intuito de conferir segurança em sua aplicação, intimamente ligada à saúde dos pacientes, grande atenção tem sido dada aos processos de esterilização aplicados a biomateriais. Ao avaliar o processo produtivo de implantes mamários de silicone, um dos processos de esterilização mais comumente empregados é o calor seco, que necessita de elevadas temperaturas por longo tempo para o sucesso da esterilização. A exposição do implante a tais condições potencialmente pode ocasionar alterações de suas características. De outro lado, uma etapa preliminar do processo produtivo do implante é a vulcanização, que consiste no aquecimento do implante a temperaturas da ordem de $165 \pm 5^{\circ}\text{C}$ por aproximadamente 9 horas. Considerando tempo e temperatura empregados nesta etapa, o objetivo deste estudo foi avaliar a carga microbiana dos implantes mamários de silicone antes do processo de vulcanização, assim como o decaimento da carga microbiana neste processo e também confirmar a esterilidade do gel contido internamente à membrana. Desta forma, foi possível observar que o nível de contaminação microbiana dos implantes gelatinosos é relativamente baixo e que a vulcanização foi um processo que possibilitou a inativação de até 10^8 esporos, a concentração de esporos mais alta utilizada no estudo. Os resultados mostraram que a vulcanização possibilitou não só a redução da carga microbiana, mas também consiste em mecanismo para garantir a esterilidade do gel interno ao produto. Desta forma, o processo esterilizante final teve como contribuição elevar o Nível de Garantia de Esterilidade (SAL ou Sterility Assurance Level), condição interessante ao se considerar a tendência de adoção da liberação paramétrica, assim como o conceito de validação combinado bioburden/indicador biológico em vez de sobre-morte. Avaliação complementar foi feita ao quantificar endotoxina nos implantes antes e após o processo

de esterilização (calor seco e óxido de etileno), verificando-se que os processos considerados não alteram significativamente a quantidade de endotoxina. Ainda assim, em todas as situações foram obtidos níveis aceitáveis, conforme USP 31.

Palavras-chave: silicone, implante mamário, esterilização, calor seco, vulcanização, biocarga

ABSTRACT

SANTOS, G. C. M. **Bioburden Reduction and Sterility Assurance in Silicone Gel Breast Implants**. 2009. 87 p. Dissertation (Master's Degree) – Faculty of Pharmaceutical Science, University of São Paulo, 2009.

Silicone breast implants consist of biomaterials widely used in breast reconstitution surgeries after the occurrence of cancer, accidents, breast size correction (in case of different volume between both breasts) or in mammary augmentation for esthetic reasons. With a view to confer security in its application, directly related to patients health, great attention has been given to sterilization processes applied to biomaterials. Among these, dry heat is one of the most often employed. For a successful sterilization, it requires high temperatures for a long period, what may give rise to alteration of the implant characteristics. On the other hand, a preliminary stage of the implant production process is vulcanization, which consists of heating the implant to $165 \pm 5^{\circ}\text{C}$ for approximately 9 hours. Taking into account the time and temperature used in this stage, the aim of this work was to evaluate the bioburden of silicone breast implants prior to the vulcanization process and the decline in bioburden due to this process, and to confirm the sterility of the gel contained in the membrane. This study led us to the conclusion that the level of microbial contamination of gel implants is relatively low, and that vulcanization allowed for the inactivation of up to 100 million spores, the highest concentration of spores used in this study. The results obtained showed that vulcanization enabled not only the reduction of the microbial load, but also guaranteed the sterility of the gel inside the product. Thus, the final sterilizing process contributed to an increase in the Sterility Assurance Level, an interesting phenomenon if we consider the tendency toward adoption of parametric release and the concept of a combined validation bioburden/biological indicator rather than overkill. Complement evaluation was made measuring endotoxins in the implants before and after the sterilization process (dry heat and ethylene oxide), verifying that the considered processes do not modify the amount of endotoxin significantly, as expectation. Still thus, in all the situations had been gotten acceptable levels, as USP 31.

Keywords: silicone, breast implant, sterilization, dry heat, vulcanization, bioburden

SUMÁRIO

1. Introdução	15
2. Revisão da Literatura	19
2.1. Biomateriais	19
2.2. Polímeros	22
2.2.1. Silicone	23
2.2.1.1. Tipos de Silicone	26
2.2.1.2. Uso de Silicone aplicado a Dispositivos Médicos	28
2.3. Implantes Mamários	28
2.3.1. Efeitos Adversos	30
2.4. Processos de Esterilização	33
2.4.1. Calor	36
2.4.1.1. Calor Seco	37
2.4.2. Óxido de Etileno	38
2.4.3. Radiações Ionizantes	40
2.5. Validação da Esterilização	42
2.5.1. Indicador Biológico	44
2.6. Endotoxinas Bacterianas	45
2.6.1. Métodos de determinação de endotoxinas	47
3. Objetivos	49
4. Materiais e Métodos	50
4.1. Materiais	50
4.2. Métodos	54
4.2.1. Validação da determinação quantitativa da biocarga	56
4.2.1.1. Membranas	56
4.2.1.2. Insumos, Mistura dos componentes do polímero e Impantes, antes e após vulcanização	57

4.2.2. Determinação quantitativa da biocarga	58
4.2.2.1. Membranas	58
4.2.2.2. Insumos, Mistura dos componentes do polímero e Impantes, antes e após vulcanização	59
4.2.3. Decaimento da carga microbiana	59
4.2.4. Quantificação de endotoxina bacteriana pelo método cromogênico cinético	60
5. Resultados	62
5.1. Determinação quantitativa da biocarga	62
5.1.1. Percentuais de Recuperação	62
5.1.2. Biocarga nas etapas consideradas	65
5.2. Decaimento da carga microbiana	67
5.3. Quantificação de endotoxina bacteriana pelo método cromogênico cinético	69
6. Discussão	72
7. Conclusões	78
8. Referências Bibliográficas	79

LISTA DE ABREVIATURAS

AAMI	Association for the Advancement of Medical Instrumentation
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ANSI	American National Standards Institute
ATCC	American Type Culture Collection
FDA	Food and Drug Administration
ISO	International Organization for Standardization
LAL	Limulus Amebocyte Lysate
PDMS	Polidimetilsiloxano
PE	Polietileno
PMMA	Polimetilmetacrilato
PP	Polipropileno
PS	Poliestireno
PTFE	Politetrafluoretileno ou Teflon
PVC	Poli(cloreto de vinila)
RCA	Reinforced Clostridial Agar
SDA	Sabouraud Dextrose Agar
SAL	Sterility Assurance Level (Nível de Garantia de Esterilidade)
TSA	Tryptic Soy Agar
TSB	Tryptic Soy Broth
UFC	Unidade Formadora de Colônia
USP	United States Pharmacopeia

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Apresentação de amostras avaliadas, considerando quantidades de material empregado e réplicas (membranas, componentes poliméricos – pré e pós mistura – do gel, implantes – pré e pós vulcanização), material de acondicionamento e indicação de tempos de armazenamento das membranas	52
Tabela 2	Resultados da recuperação de contaminação promovida no interior do invólucro de silicone texturizado	63
Tabela 3	Resultados da recuperação de contaminação promovida sobre invólucro de silicone texturizado	63
Tabela 4	Resultados da recuperação de contaminação promovida sobre o Insumo A (Poliol)	63
Tabela 5	Resultados da recuperação de contaminação promovida sobre o Insumo B (Isocianato)	63
Tabela 6	Resultados da recuperação de contaminação promovida sobre a Mistura dos componentes do polímero	64
Tabela 7	Resultados da recuperação de contaminação promovida sobre o Implante antes da vulcanização	64
Tabela 8	Resultados da recuperação de contaminação promovida sobre o Implante após vulcanização	64
Tabela 9	Contagem microbiana (UFC) obtida a partir de membranas de implantes de silicone em diferentes lotes de produção e tempos de armazenamento (partes interna e externa) e de componentes poliméricos (pré mistura)	65
Tabela 10	Contagem microbiana (UFC) obtida a partir de componentes poliméricos (pós mistura) e de implantes (pré e pós vulcanização) .	66
Tabela 11	Avaliação das tiras dos “Graded Biological Indicator” antes da submissão ao desafio (10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 e 10^8 esporos microbianos) quanto ao número de esporos pelo método de semeadura em profundidade (Fabricante das Tiras: Raven Biological Laboratories Inc.) e avaliação das tiras dos “Graded Biological Indicator” após o ciclo da vulcanização (Ciclo 1) quanto ao crescimento microbiano, em 20 unidades por ciclo	67

Tabela 12	Avaliação das tiras dos “Graded Biological Indicator” antes da submissão ao desafio (10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 e 10^8 esporos microbianos) quanto ao número de esporos pelo método de semeadura em profundidade (Fabricante das Tiras: Raven Biological Laboratories Inc.) e avaliação das tiras dos “Graded Biological Indicator” após o ciclo da vulcanização (Ciclo 2) quanto ao crescimento microbiano, em 20 unidades por ciclo	68
Tabela 13	Avaliação das tiras dos “Graded Biological Indicator” antes da submissão ao desafio (10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 e 10^8 esporos microbianos) quanto ao número de esporos pelo método de semeadura em profundidade (Fabricante das Tiras: Raven Biological Laboratories Inc.) e avaliação das tiras dos “Graded Biological Indicator” após o ciclo da vulcanização (Ciclo 3) quanto ao crescimento microbiano, em 20 unidades por ciclo	69
Tabela 14	Resultados do percentual da recuperação de contaminação promovida nas amostras analisadas de implantes mamários de silicone durante a validação da metodologia de determinação quantitativa de endotoxinas pelo método cromogênico cinético	70
Tabela 15	Quantificação de endotoxina nos implantes mamários de silicone, com dois grupos de amostra por semana (antes e após esterilização, calor seco e óxido de etileno), durante as semanas 1 e 2	70
Tabela 16	Quantificação de endotoxina nos implantes mamários de silicone, com dois grupos de amostra por semana (antes e após esterilização, calor seco e óxido de etileno), durante as semanas 3, 4 e 5	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Redução da sílica a silício elementar	24
Figura 2	Síntese dos clorosilanos	24
Figura 3	Hidrólise dos clorosilanos	25
Figura 4	Polimerização e policondensação para obtenção de silicones	25
Figura 5	Invólucro de implante mamário de silicone com superfície texturizada	50
Figura 6	Invólucros de implantes mamários de silicone com superfície texturizada acondicionadas em saco plástico, com 6 meses de estoque	51
Figura 7	Implante de gel de silicone com superfície texturizada após o processo de vulcanização	51
Figura 8	Tira de esporo acondicionada em saco plástico	53
Figura 9	Teste de quantificação de endotoxina pelo método cromogênico cinético: placa com 96 poços. Coloração amarelada indicando presença de endotoxina	71

1. Introdução

O corpo humano é vulnerável, estando seus tecidos e órgãos sujeitos a doenças e injúrias que podem levar à dor, perda da função, restrição dos movimentos, podendo acarretar, inclusive, incapacidade. Para permitir que as funções desempenhadas sejam mantidas, em muitos casos, o tratamento envolve a remoção do tecido ou órgão afetado e sua substituição por um enxerto de tecido vivo ou um análogo artificial – um biomaterial.

Dentre os diferentes biomateriais encontram-se os metais, compósitos, os cerâmicos, vidros e polímeros, sendo este último grupo onde os silicones se enquadram. Após polimerização do dimetilsiloxano, dependendo do tamanho das cadeias formadas e das ramificações, o silicone obtido pode se apresentar nas formas fluida, de gel e elastomérica.

Diante da possibilidade de adquirir variadas formas e possuir propriedades peculiares, o silicone tem sido empregado em diversas aplicações. Em se tratando da área de saúde, aparece em técnicas médicas, farmacêuticas e cosméticas que incluem cirurgia plástica estética e reparadora, oftalmologia, reconstrução de tecidos; formulações orais; cremes protetores, protetores capilares e outros. A mama é um dos inúmeros tecidos e estruturas que podem ser substituídos por próteses de silicone em cirurgias de aumento ou de reconstrução, tendo sido sua utilização cercada de grande controvérsia quanto à indução de efeitos adversos.

Um dos seus riscos potenciais é a infecção, que é a causa líder de morbidade que ocorre depois da implantação na mama e é a causa de complicação em 2,0-2,5% das intervenções. A origem da infecção em mulheres com implantes permanece difícil de determinar, mas pesquisas incluem potencialmente um implante contaminado, a própria cirurgia ou o ambiente cirúrgico, a pele ou dutos mamários da paciente. Também, estudos sugerem ser o local do implante propício à infecção quando ocorre a migração, por meio da corrente sanguínea, da bactéria causadora de infecção em local distinto. (PITTET; MONTANDON; PITTET, 2005).

Com o objetivo de garantir a qualidade do produto a ser implantado, tendo por meta a sua identidade, atividade, pureza, eficácia e segurança, órgãos reguladores

após interação com universidades, institutos de pesquisa e produtores, determinam medidas e mecanismos de controle. As medidas e mecanismos efetivam-se essencialmente pelas especificações de qualidade do processo produtivo, do produto e de sua distribuição, com a verificação do cumprimento das boas práticas de fabricação e controle (BRASIL, 1977, 2001). Normas nacionais e internacionais são elaboradas para estabelecer condições para a obtenção de próteses seguras quanto aos aspectos físico, químico e biológico. Sendo assim, procedimentos padronizados e validados atendendo ao preconizado por estas normas devem fazer parte da fabricação e controle de biomateriais, dentre os quais se incluem os implantes mamários de silicone, alvos deste estudo. Grande atenção é dada aos métodos e processos de esterilização utilizados, já que, na dependência de sua natureza, podem constituir-se em fator de comprometimento da estrutura química do polímero, podendo influenciar na característica de biocompatibilidade.

Estudos foram realizados para verificar diferenças quanto aos efeitos dos tipos de esterilização em se tratando de implantes mamários de silicone. Os processos de esterilização estudados, que se mostraram adequados, envolveram calor seco aplicado aos implantes de silicone gel (superfície lisa e texturizada); óxido de etileno empregado na esterilização dos implantes de silicone gel (superfície lisa, texturizada e com revestimento de poliuretano); radiação gama usada na esterilização dos implantes pré-cheios com solução salina. Foi verificado que os implantes de superfície lisa esterilizados por óxido de etileno apresentaram, quando submetidos a estresse intencional no “Bleed Test”, valor de massa de gel difundida maior em relação aos submetidos ao processo de esterilização por calor seco (AZEVEDO, 2004). Sob esta perspectiva, o calor seco apresenta vantagens em sua utilização, além de não apresentar o inconveniente de formação de resíduos tóxicos, como ocorre com o processo de esterilização por óxido de etileno (LUCAS et al., 2003).

A norma ISO 14607:2002 – *Implants for surgery – specific requirements for mammary implants* – no item 9, onde trata da esterilização reporta-se à norma ISO 14630:1997 *Non-active surgical implants – General requirements* – onde o Nível de Garantia de Esterilidade (Sterility Assurance Level – SAL) requerido para os implantes mamários é de 10^{-6} , o que não significa porém inferir que se admita a não esterilidade

em um a cada milhão de unidades. É implícita a importância de se agregar cuidados adicionais que, a partir de menor biocarga, efetivamente permitam o emprego seguro do produto.

A validação de um processo esterilizante consiste em verificar a eficácia do processo e aplica em sua última etapa, qualificação de desempenho, a avaliação da letalidade dos indicadores biológicos. Dentre as opções de validação, tem-se o método de sobre-morte (overkill), método combinado (indicador biológico e biocarga) ou biocarga absoluto. O método de biocarga requer controle rígido quantitativo e da resistência dos contaminantes do produto, advindo das várias fontes como insumo, ambiente e operadores. O método combinado considera tanto o controle (menos rígido) da biocarga como o indicador biológico. O método de sobre-morte vale-se da elevada resistência do indicador biológico, caracterizando letalidade da ordem de 10^6 acrescida de garantia de segurança de esterilidade (SAL) de 10^{-6} . Este é o princípio do método do meio-ciclo, em que uma população 10^6 de um indicador resistente é inativada durante o meio-ciclo na validação e então, o período da exposição é dobrado na operação rotineira. O método de sobre-morte é amplamente empregado quando se esterilizam materiais termoestáveis, porém pode ocasionar efeitos adversos como consequência de tempos de esterilização extensos (AGALLOCO, 2007).

Segundo a Norma ABNT NBR ISO 11138-1 (2004), para validação de um processo esterilizante, o indicador biológico deve ser colocado no local de mais difícil acesso ao agente esterilizante, simulando assim situação de pior caso nos itens da carga a serem esterilizados. No cumprimento desta orientação, é possível que se submeta o produto a condições estressantes dependendo das características do produto e do método de esterilização. Isto justifica a avaliação de etapas do processo de fabricação, pontos críticos e favoráveis relativos à microbiota do produto e atributo de esterilidade, objetivando correlacioná-los aos parâmetros críticos de qualidade e fundamentalmente com foco no paciente.

Uma das etapas do processo produtivo é a vulcanização. Experimentalmente, fez-se esta transformação empregando-se aquecimento a $165 \pm 5^\circ\text{C}$ durante aproximadamente 9 horas. A vulcanização consiste em condição imprescindível para que o produto atinja sua característica química especificada, alcançando propriedades

físicas ideais para a sua funcionalidade em adição a biocompatibilidade e esterilidade. Ocorre que esta condição térmica certamente exerce efeito na redução da biocarga do produto. Desta forma, aventou-se aspecto vantajoso no estudo da sua influência, seja conferindo maior Nível de Garantia de Esterilidade (SAL), seja em atingir a esterilidade do produto com menor tempo de exposição à temperatura, portanto, minimizando efeitos nocivos da condição térmica na biocompatibilidade e na estabilidade do produto. Embora a temperatura de 165°C possa eventualmente comprometer a estabilidade, aparência e as características de biocompatibilidade do implante, a confirmação de seu efeito, permite a adoção de valores intermediários.

Além da atenção dada à esterilidade, é também importante garantir que o produto esteja livre de endotoxinas, ou que estas estejam em nível aceitável, conforme o caso. Considerando as características das endotoxinas, sabe-se que, de uma forma geral, os métodos esterilizantes comumente utilizados não levam à despirogenização do produto. Porém, há autores que evidenciaram a despirogenização como consequência de processos esterilizantes (PEDERSEN; HANSEN, 1989; SILVA et al., 2007), o que leva à consideração de avaliar o comportamento do produto em termos de quantidade de endotoxina antes da esterilização e também para se verificar a influência ou não do processo esterilizante.

2. Revisão da Literatura

2.1. Biomateriais

Uma das definições atuais diz que biomateriais são “materiais (sintéticos ou naturais; sólidos ou, às vezes, líquidos) utilizados em dispositivos médicos ou em contato com sistemas biológicos” (RATNER et al., 2004) enquanto que na definição clássica biomaterial é “parte de um sistema que trate, aumente ou substitua qualquer tecido, órgão ou função do corpo” (HELMUS; TWEDEN, 1995).

Os biomateriais são empregados na obtenção de dispositivos que substituam uma parte ou função do corpo de forma segura, confiável, econômica e fisiologicamente aceitável (HENCH; ERTHRIDGE, 1982; PARK; LAKES, 2007). Biomateriais consistem em materiais sintéticos usados para substituir partes de sistemas ou agir em contato íntimo com tecidos vivos (PARK; LAKES, 2007; WONG; BRONZINO, 2007). A Clemson University Advisory Board for Biomaterials definiu formalmente um biomaterial sendo “uma substância sistêmica e farmacologicamente inerte designada para implantação ou incorporação com sistemas vivos”. Black (1992) definiu biomateriais como “materiais não viáveis usados em dispositivos médicos, com a finalidade de interagir com sistemas biológicos”. Outros autores incluem “materiais de origem sintética ou natural em contato com tecido, sangue e fluidos biológicos, destinados ao uso em próteses, diagnóstico, terapia, aplicações de armazenamento sem afetar adversamente o organismo e seus componentes” (BRUCK, 1980). Há ainda a definição como sendo “quaisquer substâncias (exceto fármacos) ou combinação de substâncias, de origem sintética ou natural, que podem ser usadas por qualquer período de tempo, como conjunto ou como parte de um sistema que trate, aumente ou substitua qualquer tecido, órgão ou função do corpo” (WILLIAMS, 1987). Com base nessas definições, é possível compreender que há oportunidade para um vasto campo de conhecimento interdisciplinar conduzindo estudos colaborativos abrangendo diferentes especialidades, com o objetivo de desenvolver e usar os biomateriais na medicina e odontologia. Dessa forma, há intensa

investigação direcionada à síntese, otimização, caracterização, análise de biomateriais e à biologia de interação entre organismo e materiais. Tais estudos são planejados visando projetar superfícies que suscitem interações adequadas com células e proteínas, em conformidade com aplicações específicas, ou seja, que sejam materiais biocompatíveis, para não trazer danos ao paciente (ANDERSON, 2008; WILLIAMS, 1987).

A definição de biocompatibilidade inclui que o material deve apresentar como atributos de qualidade ser atóxico, não promover alergenicidade, carcinogenicidade, mutagenicidade e não exercer influência sobre a fertilidade de um paciente que o utilize (ROGERO et al., 2003).

Uma variedade de produtos é usada no tratamento de doenças ou injúrias. Exemplos comuns são suturas, agulhas, cateteres, placas, etc. O emprego desses produtos inclui substituição de partes anatômicas com perda de função devido a doença ou trauma, auxílio na cura, desenvolvimento de função e correção de anormalidades funcionais ou problemas estéticos. Dentre os diferentes tipos de biomateriais encontram-se os metais, as cerâmicas, os compósitos, os vidros e os polímeros.

Os biomateriais metálicos compreendem metais e suas ligas, entre os quais titânio e suas ligas, ligas de cobalto-cromo, ouro, aço inoxidável. Apresentam como características alta força tensil e resistência ao desgaste, mas podem sofrer corrosão, são densos e de difícil processamento. Podem ser empregados em fixação ortopédica, placas do osso e parafusos, implantes dentários, fios de sutura.

As cerâmicas e vidros são altamente biocompatíveis, possuem alta resistência à corrosão, mas são frágeis, possuem baixa força tensil e não são resilientes. Podem ser empregados em implantes dentários e ortopédicos. As cerâmicas implantáveis foram intituladas biocerâmicas e são agrupadas em três categorias baseadas em seu comportamento biológico em certos ambientes: as cerâmicas relativamente bioinertes, as cerâmicas bioreativas ou com superfície reativa e as cerâmicas biodegradáveis ou reabsorvíveis. As cerâmicas relativamente bioinertes são cerâmicas contendo carbono não-absorvível, alumina, zircônia e nitretos de silício. Em contato com o ambiente biológico do local de implante, mantém suas propriedades físicas e mecânicas. São usadas nas formas densas e porosas, geralmente possuem boa resistência e são

excelentes para funções de deslizamento. São usadas para produzir, por exemplo, substituintes da cabeça do fêmur. São usadas tipicamente como implantes de suporte estrutural. As cerâmicas bioativas incluem vidros, cerâmicas-vidros e materiais baseados em fosfato de cálcio. São caracterizadas pela habilidade em provocar respostas ósseas e teciduais no seu entorno, o que lhes confere vantagem na fixação do implante ou redução do estresse. Têm sido usadas com sucesso como revestimento, em camadas e partículas de encaixe nas cirurgias ortopédicas e dentárias. Por fim, as biodegradáveis incluem fosfato de cálcio, alumínio, coralina, hidroxiapatita e fosfato tricálcico. São mais solúveis que as bioativas e, conseqüentemente degradadas pelos tecidos que as envolvem. Devido a sua estrutura porosa, podem estimular o crescimento tecidual. Têm sido usadas na fabricação de vários implantes ortopédicos (GRECO; PRINZ; SMITH, 2005).

Os compósitos são materiais formados de dois ou mais constituintes com distintas composições, estruturas e propriedades e que estão separados por uma interface. O objetivo principal em se produzir compósitos é de combinar diferentes materiais para produzir um único dispositivo com propriedades superiores às dos componentes unitários. Alguns exemplos de compósitos são as fibras de carbono-resina termofixa, fosfato de cálcio-colágeno, os quais apresentam como vantagem a inércia, resistência à corrosão e alta força de tensão, mas são difíceis de produzir. Podem ser empregados na confecção de válvulas cardíacas, implantes de juntas de joelho, resina dentária, cimento ósseo (PARK; LAKES, 2007; WONG; BRONZINO, 2007).

Tendo em vista o fato de cada tipo de biomaterial possuir características específicas, eles são empregados de acordo com a função que vão desempenhar, buscando similaridade àquela do órgão ou tecido que está substituindo, tratando ou ampliando. Sendo assim, materiais mais rígidos como metais são utilizados na substituição de tecidos de sustentação como ossos, enquanto alguns polímeros são empregados em tecidos moles, como no caso do silicone em relação à mama (GEBELEIN; KOBLITZ, 1981).

2.2. Polímeros

Materiais poliméricos receberam crescente interesse ao longo do século 20 e têm sido usados em um vasto número de aplicações médicas e farmacêuticas como implantes ortopédicos, dentários ou mamários, órgãos artificiais, marcapassos, suturas, enxertos vasculares, válvulas cardíacas, lentes intra-oculares e de contato, dialisadores renais e outros dispositivos, sistemas de liberação controlada de fármacos ou na reconstrução de tecidos. As vantagens principais de biomateriais poliméricos comparados aos materiais metálicos ou cerâmicos são a versatilidade para produzir diversas formas (látex, filme, folha, fibras, líquidos viscosos), o fácil processamento, o custo razoável e a disponibilidade na obtenção de materiais com as propriedades físicas e mecânicas desejadas (WONG; BRONZINO, 2007).

Um polímero é um material de alto peso molecular obtido pela repetição de uma unidade simples (o monômero), por meio de ligações covalentes na cadeia principal com C, N, O, Si, etc. Em algumas situações a repetição é linear, podendo ainda, as cadeias estarem interligadas para formar uma rede tridimensional (PARK; LAKES, 2007).

Um polímero é linear quando a macromolécula é um encadeamento linear de átomos, por exemplo, o polietileno: $(-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-)$. Mesmo que a cadeia apresente ramificações (desde que a ramificação não ligue uma cadeia à outra vizinha) o polímero continua sendo considerado linear. Ex: borracha sintética (neopreno): $\dots[-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}-]\dots$. Os polímeros lineares dão origem a materiais termoplásticos, isto é, plásticos que podem ser amolecidos pelo calor várias vezes e, ao resfriarem, voltam a apresentar propriedades iniciais semelhantes.

Um polímero tridimensional ocorre quando a macromolécula se desenvolve em todas as direções, isto é, há ligações entre cadeias adjacentes, através de átomos localizados ao longo da cadeia. Esses polímeros dão origem a materiais termofixos ou materiais termoendurecentes. No primeiro caso, pelo menos a última fase de produção da macromolécula deve ser feita simultaneamente com a modelagem do objeto

desejado, pois uma vez prontos, esses polímeros não podem ser novamente fundidos pelo calor (um aquecimento excessivo causará a decomposição até a queima do material mas nunca sua fusão) e conseqüentemente, esses polímeros não podem ser reaproveitados industrialmente na moldagem de novos objetos. Os polímeros termoendurecentes, quando prontos, só podem ser fundidos uma vez, pois, durante a fusão, as moléculas reagem entre si, aumentando a massa molecular do polímero e este, endurecendo, torna-se insolúvel e infusível.

Polímeros naturais incluem a borracha natural, polissacarídeos, celulose, seda e proteínas. Dentre os polímeros sintéticos têm-se polietileno (PE), polipropileno (PP), polimetilmetacrilato (PMMA), poliestireno (PS), poli(cloreto de vinila) (PVC), poliéster, politetrafluoretileno ou teflon (PTFE), policarbonatos, poliamidas ou nylons, resinas, silicone e poliuretanos (GRECO; PRINZ; SMITH, 2005).

As propriedades requeridas de um biomaterial polimérico são similares às de outros biomateriais. Devem ser biocompatíveis (não carcinogênicos, apirogênicos, atóxicos, e não-alergênicos), passíveis de esterilização (autoclave, calor seco, óxido de etileno e radiação), apresentar propriedades físicas e mecânicas adequadas (força, elasticidade e durabilidade) e com aplicabilidade em processo de fabricação (WONG; BRONZINO, 2007).

2.2.1. Silicone

Descoberto no final do século XIX e tendo permanecido como curiosidade científica até a década de 40, os silicones são polímeros sintéticos, compostos semi-orgânicos com o silício na cadeia principal (o silício substitui o carbono), combinado principalmente com o oxigênio, tendo uma estrutura química baseada em unidades alternadas de silício e oxigênio. Além de duas ligações ao oxigênio para formar a cadeia polimérica, os átomos de silício são ligados a grupos orgânicos, geralmente grupos metila, mas muitos outros grupos, como fenila, vinila e trifluoropropila podem substituir os grupos metila ao longo da cadeia. Seu nome vem da denominação dada por F.S.

Kipping por achar que se tratavam de cetonas dos compostos silícicos (do inglês: Silicon + Ketone), já que há em média um átomo de silício para um oxigênio e dois grupos metila (KIPPING, 1904).

O silício, elemento fundamental dos silicones, é encontrado na forma de sílica (SiO_2), em forma de areia ou cristais de rocha e na forma de silicato de alumínio.

A primeira etapa de produção do silicone é a redução da sílica a silício elementar (Figura 1) (GUIDOIN; AWAD; GABRA, 1973; RATNER et al., 2004):

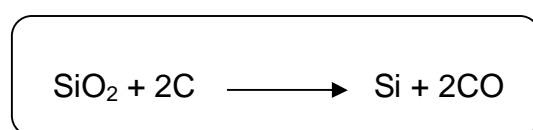


Figura 1 – Redução da sílica a silício elementar

O silício reage com cloreto de metila, originando os clorosilanos (metiltriclorosilanos, ou ainda, os dimetildiclorosilanos e trimetilclorosilanos) (Figura 2):

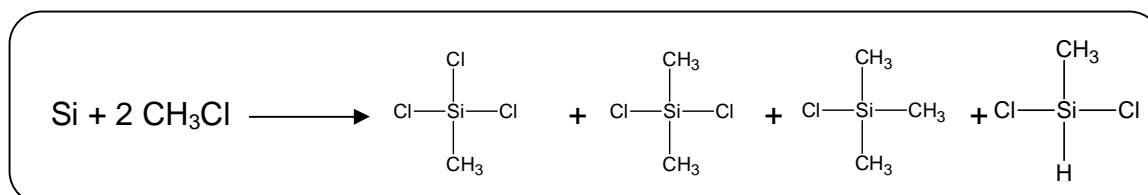


Figura 2 – Síntese dos clorosilanos

Por meio da hidrólise, o dimetildiclorosilano é convertido em silanol, um composto instável. O silanol formado reage imediatamente com outras moléculas de silanol, formando as pontes de siloxano ($\text{Si}-\text{O}-\text{Si}$), que geram os oligômeros (número finito de monômeros) lineares e cíclicos. (Figura 3).

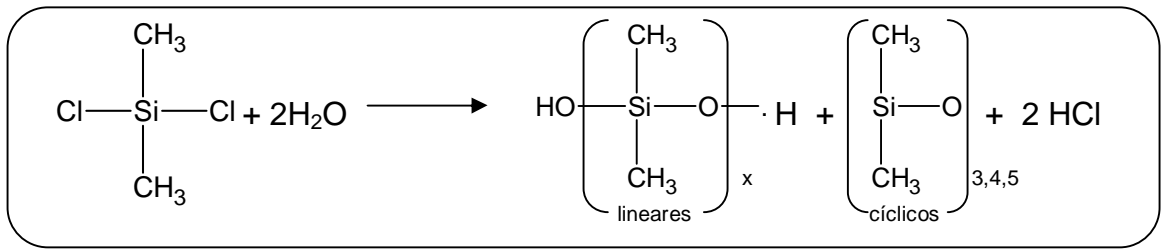


Figura 3 – Hidrólise dos clorosilanos

Estes oligômeros possuem o comprimento da cadeia curto demais para muitas aplicações. Os cíclicos precisam ser polimerizados e os lineares, condensados, para gerar macromoléculas de comprimento suficiente (NOLL, 1968), conforme demonstradas na Figura 4:

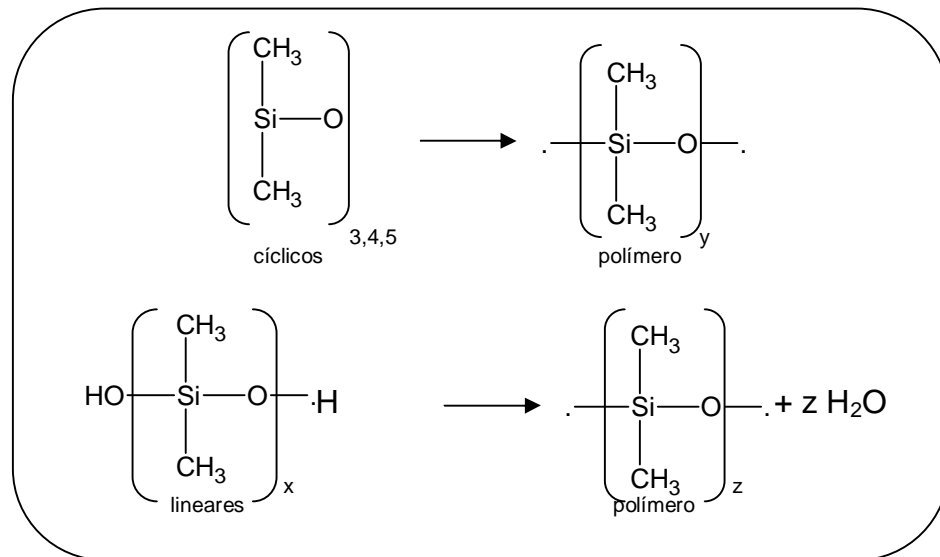


Figura 4 – Polimerização e policondensação para obtenção de silicones

Durante a reação, regida pelo equilíbrio, as ligações SiO são constantemente clivadas e refeitas em uma série de reações envolvendo espécies cíclicas e lineares, construindo assim, uma estrutura molecular até que o equilíbrio seja alcançado. O controle do peso molecular é obtido pelo uso de “end-blockers”, como derivados de hexametildisiloxano, que atuam como agentes de término de cadeia.

Após polimerização, em que a temperatura exerce influência, dependendo do tamanho das cadeias formadas e das ramificações, o silicone obtido pode se apresentar nas formas fluida, de gel e elastomérica.

De maneira geral, suas principais propriedades são: estabilidade térmica e oxidativa a altas temperaturas, retenção da flexibilidade e elasticidade a baixas temperaturas, habilidade de produzir superfícies mutuamente não adesivas, propriedades não espumantes e habilidade de conceder aos materiais repelência à água, baixa tensão superficial, extrema inércia, resistência ao intemperismo, à luz solar, ao ozônio, bom isolamento elétrico, boa lubricidade e compatibilidade biológica (WILLIAMS, 2000).

2.2.1.1. Tipos de Silicone

O processo de hidrólise produz polímeros de cadeia curta. A policondensação de pré-polímeros é realizada sob condições controladas e sob ação de catalisadores e, dependendo do processo utilizado, pode dar origem a óleos, gomas e resinas. O silicone pode, então, se apresentar, em decorrência do comprimento e ramificações da cadeia, nas formas fluida, de gel e elastomérica.

Os grupos metila ligados aos átomos de silício são extremamente móveis, ocupando um espaço considerável e resultando em aumento da distância entre moléculas adjacentes. Além disso, a cadeia Si-O de um polímero tem um caráter altamente polar devido ao ângulo de 160° entre as ligações Si-O-Si. Isso significa que os átomos estão largamente espaçados, resultando em menor coesão molecular. Estes fatores contribuem para que a cadeia polimérica seja altamente flexível e muito móvel (WILLIAMS, 2000).

Silicones fluidos (óleos) são geralmente formados por cadeias lineares de polidimetilsiloxano, ou PDMS, que possuem terminação com grupos trimetilsilil. Fluidos de PDMS apresentam, distintas viscosidades, e são essencialmente insolúveis em

água. Fluidos de PDMS podem ser modificados com a adição de grupos organofuncionais em qualquer ponto da cadeia polimérica.

Os silicones gel são cadeias de PDMS levemente ligadas por ligações cruzadas, que são introduzidas por meio de um silano trifuncional – como CH_3SiCl_3 dando uma estrutura de silicone “T-ramificada” – ou por meio de uma reação química entre um grupo Si-vinil numa cadeia polimérica com um hidrogênio ligado ao silício em outra. Este enlace entre cadeias de siloxanos produz uma estrutura tridimensional que pode ser preenchido com fluidos de PDMS para dar uma massa coesa e aderente.

Para que haja a formação das ligações cruzadas e conseqüente estrutura tridimensional, o polímero passa por um processo chamado vulcanização, onde na presença de catalisadores e de aquecimento, há o acoplamento de cadeias em ligações químicas primárias nos locais de mais amplo distanciamento (WILLIAMS, 2000). É um processo imprescindível para que o produto atinja sua característica química especificada, alcançando propriedades físicas ideais para a sua funcionalidade.

Silicones elastoméricos são cadeias de polisiloxano caracterizadas por ligações cruzadas que possuem estrutura tridimensional com maior nível de interligações que o gel. Além disso, há muito pouco fluido livre na matriz. Enchimentos, como sílica amorfa, são freqüentemente adicionados à matriz para dar maior reforço à estrutura e assim, aumentar a resistência mecânica do produto.

As resinas de silicone possuem em sua estrutura polimérica ligações cruzadas formadas pela introdução de monômeros tri ou tetra funcionais, como metiltriclorosilano. As propriedades físicas da resina de silicone podem ser ajustadas para diversas aplicações variando a intensidade de ramificações e siloxanos lineares e também pelos grupos funcionais ligados ao silício.

As propriedades físicas do silicone podem ser deliberadamente modificadas de diversas formas. Com o aumento do peso molecular, a cadeia do polímero torna-se maior e menos móvel, resultando em um material mais rígido. Alterando a composição química da cadeia principal, substituindo as cadeias laterais, ligações cruzadas ou ramificações podem também levar a modificações nas propriedades do polímero (GRECO; PRINZ; SMITH, 2005).

2.2.1.2. Uso do Silicone aplicado a Dispositivos Médicos

Os polímeros de polidimetilsiloxano podem ser utilizados em diversas aplicações. Entre elas, podem ser usados em lentes intra-oculares flexíveis, drenos para hidroencefalia, dispositivos de desfibrilação e controle cardíacos, bombas de infusão implantáveis, articulações dos dedos, dispositivos para incontinência e impotência, implantes de laringe, expansores teciduais, cateteres, implantes de tecido mole em cirurgias de reconstrução por razões congênitas ou em decorrência de câncer (BONDURANT; ERNSTER; HERDMAN, 2000).

O desenvolvimento e aplicação desses materiais têm sido significativamente influenciados pelos avanços da medicina, cirurgia, biotecnologia e ciência de materiais. Especificamente, avanços em técnicas cirúrgicas e instrumentação têm possibilitado a colocação de implantes em locais antes pouco acessíveis.

Um dos usos mais freqüentes do silicone como dispositivo médico é na forma de implante, e suas características permitem fabricação de estruturas de formas variadas, possibilitando o implante em diferentes sítios anatômicos. Embora muitas vezes a motivação ocorra por razões estéticas, para o desenvolvimento de implantes de contorno, por exemplo, de glúteos, panturrilha, queixo, mamários, testículos, em outras circunstâncias decorre de doenças e acidentes. De qualquer forma, a pesquisa na área de biomateriais visa promover a qualidade de vida do indivíduo, buscando o desenvolvimento de materiais cada vez mais adequados às finalidades a que se destinam (BELLAMY et al., 2003).

2.3. Implantes Mamários

O aumento de seio com implantes mamários continua sendo um dos procedimentos em cirurgia plástica mais comumente realizados. Apesar da controvérsia

sobre a segurança e eficácia de implantes de silicone gel, o desejo por alcançar uma auto-imagem anatomicamente perfeita e seios perfeitamente formados levou à alta incidência de cirurgias de aumento dos mesmos.

O aumento mamário por causas estéticas é a causa mais freqüente para a colocação de implantes mamários. Este procedimento deriva habitualmente das seguintes razões: ausência congênita ou deformidade de uma ou das duas mamas, vontade de aumentar o volume mamário após perda de conformação, vontade de corrigir assimetria mamária ou insatisfação com o volume ou forma mamária. Este tipo de intervenção procura melhorar na maioria das situações o bem estar e a sensação de auto-estima do doente, melhorando assim a sua qualidade de vida (CONTANT et al., 2000; INFARMED, 2004).

Embora desenvolvido inicialmente em 1962 com a finalidade de aumento do tamanho do seio, o implante mamário de gel de silicone evoluiu para se transformar no principal método para a reconstrução após a mastectomia. Com melhoria em técnicas cirúrgicas reconstrutivas nos anos 70, o uso do implante mamário para o paciente da mastectomia tornou-se prática aceita, no início para a reconstrução tardia e então para a reconstrução em casos de mastectomia (NOONE, 1997). Os benefícios físicos e psicológicos do implante mamário ao paciente da mastectomia são bem documentados (DELGADO et al., 2008; SCHAIN, 1991).

Os dois tipos de implantes de uso altamente difundido são os implantes preenchidos por gel ou por solução salina, ambos possuindo uma camada externa de silicone altamente polimerizada. Os dois tipos de implantes podem ser lisos, microtexturizados ou com revestimento de poliluretano, esféricos ou anatômicos. Ambos os tipos podem ser posicionados em um local subglandular ou submuscular empregando alternativamente três incisões comuns e bem descritas na literatura, a saber, a transaxilar, periareolar e inframamária, dependendo da preferência do cirurgião (BACKOVIC; WOLFRAM, 2007; PETERS, 2002). Os implantes salinos são infláveis e são cheios com salina pelo cirurgião após a inserção, com a vantagem de uma incisão menor e volume final ajustável. Sua desvantagem, entretanto, é sua susceptibilidade ao esvaziamento e à deflação repentina (PITTET; MONTANDON; PITTET, 2005).

2.3.1. Efeitos Adversos

O sucesso do emprego de um biomaterial em um implante é altamente dependente de três fatores principais: as propriedades e biocompatibilidade do implante, a condição de saúde do paciente e as condições cirúrgicas durante a implantação e monitoração. (PARK; LAKES, 2007).

A biocompatibilidade de um implante, por sua vez, depende de parâmetros variáveis do paciente e de características intrínsecas do material. Os principais fatores que dependem do paciente são a raça, a herança genética, o sítio de implantação, o microambiente, enquanto os fatores principais que dependem do material são forma, tamanho, superfície química e rugosidade, planejamento, morfologia e porosidade, composição, esterilidade, duração de contato e degradação. Estes parâmetros podem ser responsáveis por variações na intensidade e duração da reação tecidual. Biocompatibilidade baseia-se essencialmente em fenômenos de superfície, representados por interações célula-célula, célula-polímero e polímero-proteína. Seguinte à implantação, uma interface polímero-sangue é imediatamente criada e o primeiro passo de uma resposta tecidual é uma adsorção não específica de sangue e proteínas na superfície do material estranho. Em seguida, células imunológicas e inflamatórias intervêm no sentido de proteger o corpo pelo isolamento do material estranho em uma cápsula fibrosa (FOURNIER et al., 2003; WNEK; BOWLIN, 2008).

Esta é uma reação natural do organismo diante da presença de um corpo estranho. No entanto, em se tratando de um composto biocompatível, esta reação inflamatória inicial não evolui para níveis mais graves, que acarretem perda de função celular ou morte celular.

Um dos efeitos adversos mais comuns decorrentes do implante de prótese mamária de silicone é a contratura capsular, resultado de uma reação típica a corpo estranho. É quando o tecido de cicatrização (ou cápsula) que normalmente se forma em volta do implante pode comprimi-lo. A contratura capsular é mais comum após infecções, hematomas e irritação mecânica. Sua ocorrência pode estar relacionada

também à migração do silicone gel (*silicone gel bleed*), com maior incidência em implantes de membrana lisa (IWUAGWU; FRAME, 1997), assim como por corpos estranhos como pós lubrificantes das luvas usadas no procedimento cirúrgico e ainda o trauma pós-operatório (CHANDLER; KASPER, 2003). Os sintomas decorrentes da contratatura capsular variam de endurecimento e desconforto leves a dores, distorções e alterações na palpabilidade, chegando a ocorrer situações de deslocamento do implante. Nos casos em que a dor somada possivelmente ao enrijecimento são intensos, é necessária uma cirurgia adicional. Essa cirurgia varia desde a remoção do tecido da cápsula do implante até a remoção e possível substituição do próprio implante.

A migração do preenchimento do implante também pode ocorrer em decorrência de ruptura do implante. Algumas razões possíveis que implicam na ruptura são a idade do implante, trauma ou ferimento no seio (embora a maioria das rupturas não estejam associadas a qualquer ocorrência de trauma (HEDÉN et al., 2006)), capsulotomia (uma técnica que usa pressão manual para remover tecido fibroso ao redor do implante) e mamografia. Porém, a resistência à ruptura das membranas dos implantes é dependente do tipo de implante, espessura da membrana e tempo de implantação (GERSZTEN, 1999). Em estudos com implantes mamários de silicone da marca Inamed, os resultados obtidos estabeleceram uma taxa de prevalência de ruptura de 8% em 11 anos para este implante, evidência que sugere baixa prevalência de ruptura a longo prazo (HEDÉN et al., 2006). Porém é difícil comparar resultados específicos de forma a extrapolar os resultados de maneira a se obter informações generalizadas, pois os estudos são realizados em condições muito peculiares. Em relação à composição da membrana, estudos demonstraram a superioridade de implantes mamários texturizados sobre os lisos na diminuição da taxa de contratatura capsular (BARNESLEY; SIGURDSON; BARNESLEY, 2006). Há ainda estudos que indicam não existir correlação entre fibrose e qualquer característica química ou toxicológica dos materiais de silicone ou de enchimentos de sílica que estejam presentes no elastômero. Por outro lado, há boa evidência que sugere que esta fibrose é devida à irritação mecânica e estimulação celular associada com o micro-movimento da interface implante-tecido, tendo-se em

mente que estes dispositivos encontram-se em um tecido que é naturalmente sujeito a significativo movimento (WILLIAMS, 2008).

Infecção é a causa líder de morbidade que ocorre depois da inserção de implantes mamários e é a causa de complicação em 2,0 a 2,5% das intervenções na maioria dos casos. Dois terços das infecções desenvolvem-se no período pós-operatório, enquanto que algumas infecções podem desenvolver-se após anos ou décadas depois da cirurgia. A origem da infecção em mulheres com implantes permanece difícil de determinar, mas pesquisas potenciais incluem um implante contaminado, a própria cirurgia ou o ambiente cirúrgico, a pele ou dutos mamários da paciente. Ainda, conforme sugerem muitos estudos, devido à migração do agente de contaminação, por meio da corrente sanguínea, tendo em vista que o local do implante é propício à colonização por bactérias que estejam infectando local distinto. (PITTET; MONTANDON; PITTET, 2005).

Em 1992, a FDA anunciou que implantes mamários preenchidos com gel de silicone estariam disponíveis somente após de estudos clínicos controlados, apesar de terem sido utilizados em mamoplastias em milhares de mulheres ao redor do mundo por mais de 30 anos. Os implantes à base de silicone foram retirados do mercado em 1992 depois de ter sido desencadeada uma série de ações judiciais coletivas por queixas de mulheres que afirmavam sofrer de doenças auto-imunes na seqüência de fugas do gel de silicone no organismo. A segurança do implante mamário de gel de silicone foi questionada depois que vários autores independentes relataram uma possível associação entre os implantes e subsequente desenvolvimento de doenças nos tecidos conjuntivos na década de 80.

Estudos subsequentes foram realizados, fornecendo resultados contrários aos relatos anteriores, ocasionando grande controvérsia. Tais estudos permitiram inclusive, evidências de que implantes de silicone não eram associados com sarcoma humano. Vários experimentos foram realizados com intuito de avaliar uma potencial relação entre implantes mamários e câncer de mama. Nenhum deles identificou qualquer aumento na incidência de câncer de mama em mulheres com implantes mamários quando comparadas àquelas sem implante. Não foi obtida evidência significativa de que qualquer produto de silicone, atuando isoladamente, possa facilitar a indução de doença

autoimune em animais ou em humanos (BEKEREÇIOGLU et al., 2008). As evidências epidemiológicas indicam que mulheres com implantes mamários que tiveram filhos não apresentaram aumento no risco de desordens esofágicas, doenças reumáticas ou malformações congênitas. Não há igualmente evidências de uma associação causal entre implantes mamários e doenças neurológicas (GERSZTEN, 1999; McLAUGHLIN et al., 2007).

A FDA voltou a autorizar os implantes mamários em silicone depois da proibição que durou 14 anos. A FDA autoriza duas empresas da Califórnia a comercializar estes implantes por razões médicas para mulheres de todas as idades e por razões estritamente estéticas apenas para mulheres com uma idade mínima de 22 anos. A FDA também impõe a estas empresas uma tecnovigilância durante dez anos a 40 mil mulheres que recebam os implantes.

A aplicação clínica de um biomaterial não deve causar qualquer reação adversa no organismo e não deve colocar em perigo a vida do paciente. Materiais a serem usados como componentes de um dispositivo que se caracterizem como biomateriais devem ser biocompatíveis. Os requisitos funcionais residem em proporcionar a reprodução das características do tecido, no caso, mamário, que é composto de tecido glandular e adiposo, com manutenção a longo prazo de forma e volume (WILLIAMS, 2008).

Diante das vantagens dos polímeros, é necessário se garantir ausência dos riscos de contaminação e de reações adversas pela utilização de um material que não seja biocompatível. Sendo assim, testes são realizados com o intuito de se garantir a biocompatibilidade do material.

2.4. Processos de Esterilização

A crescente utilização dos produtos médico-hospitalares, atendendo às necessidades da evolução na ciência médica, induziu a acelerado incremento em diversidade e quantidade, incorporando aos mesmos exigências quanto a

características de funcionamento, de resistência e segurança, e quando pertinente a de esterilidade e ausência de endotoxinas bacterianas. Os métodos esterilizantes devem garantir a esterilidade do produto, sem alterar sua biocompatibilidade.

Esterilização é o conjunto de operações que objetiva destruir ou inativar todas as formas de vida, incluindo esporos bacterianos, com capacidade de desenvolvimento durante os estágios de armazenamento e de utilização do produto. Consiste em aplicar condições que, com elevado nível de garantia e reprodutibilidade, permita a obtenção de produtos livres de todas as formas microbianas viáveis. Na esterilização, a morte microbiana é descrita como uma função logarítmica, sendo a esterilização conseqüentemente expressa em termos de probabilidade de ausência de microrganismos com capacidade de sobrevivência (ROGERS, 2005). O termo esterilidade ou nível de segurança remete-se à incapacidade de desenvolvimento das formas sobreviventes ao processo de esterilização, durante a manutenção e utilização de um produto. Os métodos de esterilização, particularmente aqueles considerados terminais, ou seja, envolvendo cinética de morte microbiana, permitem assegurar níveis de esterilidade compatíveis às características exigidas nos produtos em questão. A sua escolha deve depender da natureza do material e da carga microbiana inicialmente presente nos itens considerados (NOGAROTO; PENHA, 2006).

Os processos e parâmetros adotados nos processos esterilizantes devem ser potencialmente capazes de esterilizar produtos poliméricos ou de outros materiais sem afetar adversamente seus atributos de qualidade, variam e são limitados. Não há um método específico que atenda esses requisitos para todos os tipos de materiais. Os métodos de esterilização podem ser físicos e químicos. Dentre os físicos há o calor, sob a forma úmida e seca, a radiação ionizante e a não-ionizante. Dentre os métodos químicos há os agentes empregados sob as formas líquida assim como gasosa e vapor. Alguns exemplos: químicos (óxido etileno, plasma, agentes oxidantes – peróxido de hidrogênio, ácido peracético, hipoclorito e soluções de iodo), radiação (irradiação gama e feixe de elétron) e esterilização por calor (vapor, calor seco). Os fabricantes são no geral muito criteriosos na seleção dos materiais que usam no desenvolvimento dos componentes e dispositivos, que serão expostos à esterilização, de forma a preservar a segurança dos pacientes. Faz-se necessário conhecer como os materiais interagem

com os vários processos de esterilização. A preocupação com aspectos físico-químicos, biocompatibilidade e estabilidade permitirão ciclos de vida mais longos para o produto, com otimização na segurança ao paciente (ROGERS, 2005).

A determinação de todo método de esterilização terminal, envolvendo cinética de morte microbiana, adota o valor de redução decimal, conhecido como valor D (D_v ou D). O valor D é o tempo, energia ou dose que um processo de esterilização requer para inativar uma população microbiana reduzindo em 1 logaritmo ($1 \log_{10}$) ou em 90% da população inicial. Uma equação simplificada da equação de Stumbo (ROGERS, 2005) é $D_v = \text{tempo} / \text{Log } N_o - \text{Log } N_b$, onde N_o é a população microbiana ou de esporo inicial e N_b é a população microbiana ou de esporo sobrevivente depois do tempo de exposição.

Na esterilização, procura-se inativar formas extremamente resistentes de entidades viáveis reprodutoras, tais como esporos de bactérias e prions, resultados que intrinsecamente demandam tempo, sendo difíceis de analisar imediatamente. Fatores de incerteza e níveis distintos de aproximação são inerentes a cada um dos métodos de cálculo de Valor D, que por sua vez são empregados nos métodos de validação aplicados para cada um dos processos de esterilização. É importante ressaltar que, em qualquer situação, o valor D traduz a resistência da espécie microbiana, seja aquela do indicador biológico ou da biocarga, mediante um determinado processo esterilizante com parâmetros definidos. Por exemplo, esporos de *Geobacillus stearothermophilus* situam-se entre os mais resistentes à esterilização por vapor. Já na esterilização por radiação, a validação considera a dose emitida relacionada à informação da biocarga.

Os três fatores que de forma universal exercem maior influência no processo de esterilização são temperatura, tempo e biocarga (aspectos quantitativo e qualitativo). Ao se avaliar o parâmetro temperatura, deve-se considerar que esta pode ser a medida da câmara esterilizante, do meio esterilizante ou do item que está sendo esterilizado. Em todos os casos, é por sua vez importante que o dimensionamento deve acompanhar todo o processo vinculado ao tempo, parâmetro igualmente essencial. Os cálculos matemáticos irão incluir aquelas parcelas do ciclo que não estão na temperatura ótima, mas devido à energia que transmitem, ocasionam alguma mortalidade mensurável à população microbiana. Como é comum com tudo o que é vivo, os microrganismos têm uma resistência inerente à morte. Alguns são relativamente pouco resistentes, mas

outros, tais como os esporos, apresentam uma resistência relativamente elevada; esta é a razão porque os esporos são geralmente selecionados como o desafio microbiológico para processos da esterilização (SHIRTZ, 2007).

2.4.1. Calor

O calor é o mais antigo e conhecido agente empregado em processos esterilizantes, apresentando-se sob as formas úmida ou seca, que apresentam processos letais diferentes.

Para consolidar as variáveis essenciais em um sistema que permite avaliação da capacidade de destruição térmica de um ciclo de processo de esterilização específico, três termos foram desenvolvidos: valor D (tempo em minutos requeridos para inativar 1 log dos microrganismos desafiados), valor z (número de graus da variação da temperatura necessária para mudar o valor D em um fator de 10) e valor F (tempo equivalente a uma determinada temperatura de todo o calor possível de promover a destruição de esporos ou formas vegetativas de um microrganismo (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003)).

A esterilização por calor ocorre seguindo uma função probabilística que depende do número de microrganismos desafiados, da resistência ao calor desses microrganismos e da quantidade de calor a que são expostos. O uso dos valores D, z e F permite comparar a eficácia de vários ciclos de esterilização, usando modelos matemáticos.

O processo de esterilização térmica empregando vapor saturado sob pressão é realizado em uma câmara chamada autoclave. No caso do calor úmido, na forma de vapor saturado sob pressão, a destruição do microrganismo é obtida pela desnaturação irreversível das enzimas e estruturas protéicas. A temperatura para que a desnaturação ocorra varia inversamente com quantidade de água presente (RUSSELL; HUGO; AYLIFFE, 1982).

Os parâmetros a serem monitorados durante a esterilização por calor úmido são a temperatura, a pressão e o tempo de exposição. Há a utilização de indicadores químicos (mudam de cor consoante a temperatura, como os tubos de Brown e a fita adesiva Bowie-Dick) e biológicos (*Bacillus atrophaeus* ATCC 9372), sendo que apenas estes permitem comprovar a eficácia do processo.

Este método apresenta como desvantagem a impossibilidade de esterilizar óleos, pós e produtos termossensíveis, mas possui como vantagem o rápido aquecimento e rápida penetração em artigos têxteis ou tecidos de algodão, destruição dos esporos microbianos em curto período de exposição, fácil controle de qualidade e letalidade, ausência de resíduos tóxicos nos materiais, sendo também econômico além de eficaz. É empregado para produtos termo-resistentes e compatíveis com a umidade. Considerando polímeros em particular, aqueles sujeitos ao ataque pelo vapor d'água, este método não deve ser empregado, como é o caso do PVC, poliacetais, polietilenos (variedades de baixa densidade) e poliamidas (nylons) (PARK; LAKES, 2007). Também, muitos implantes não-metálicos e materiais embalados não podem ser esterilizados por este método (RATNER et al., 2004).

2.4.1.1. Calor Seco

A inativação microbiana quando empregando calor seco, em condições mais drásticas comparativamente ao calor úmido, ocorre por mecanismo oxidativo das células constituintes (RUSSELL; HUGO; AYLIFFE, 1982). A esterilização se dá por elevação da temperatura (180°C a 300°C, sendo que no valor inferior apenas esterilizam, e no superior, despirogenizam – PINTO; KANEKO; OHARA, 2003), por irradiação de calor cuja distribuição no equipamento deve ser o mais uniforme possível. O indicador biológico típico emprega esporos de *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372, anteriormente denominado *Bacillus subtilis* var *niger* ATCC 9372.

Os parâmetros a serem monitorados durante a esterilização por calor seco incluem a temperatura e o tempo de exposição, além de ser fundamental a verificação da inativação dos indicadores biológicos.

Além da limitação de não esterilizar líquidos, o uso de temperaturas muito elevadas pode interferir na estabilidade de alguns materiais. Muitas vezes, a temperatura convencional de esterilização varia em uma faixa superior à temperatura de fusão de muitos polímeros lineares como polietileno e polimetilmetacrilato e por isso, a esterilização destes polímeros pelo calor é inapropriado. No caso de poliamida (nylon), a oxidação ocorrerá na temperatura típica de esterilização, embora abaixo da sua temperatura de fusão. Polímeros que podem ser esterilizados por calor seco são politetrafluoroetileno (Teflon) e silicones (PARK; LAKES, 2007). Este processo pode também ser aplicado em envases de vidro, despirogenizando vidrarias e outros materiais. Adequadamente aplicado não oxida metais, e não danifica materiais de corte. É o ideal para vidros, metais, algumas gorduras, substâncias pulverizadas, instrumentos de ponta ou de corte, óleos e pomadas. Aplica-se também a esterilização de biomateriais que sejam resistentes ao calor.

A esterilização por calor seco pressupõe o aquecimento prévio da estufa; a adição dos materiais a serem esterilizados, em embalagens adequadas; a elevação da temperatura até atingir a temperatura determinada e a partir daí começar a contagem do tempo de exposição. Após o término de tempo de exposição, aguarda-se o resfriamento para a retirada dos materiais (CASE; HEFFERNAM, 2007; DEWHURST; HOXEY, 2007).

2.4.2. Óxido de Etileno

Usado como agente químico ionizante, o óxido de etileno é um gás inflamável, explosivo e carcinogênico que, quando misturado sob determinadas proporções com gases inertes torna-se não inflamável ou explosivo. Em condições pré-determinadas de temperatura, umidade e tempo, proporcionam um método de esterilização bastante

eficiente. Seu emprego ocorre, principalmente para produtos que não podem ser submetidos a altas temperaturas, como polímeros termossensíveis. Seu mecanismo de ação ocorre pela alquilação protéica (DNA e RNA) da parte sulfídrica da proteína do sítio ativo no núcleo do microrganismo, impedindo o metabolismo celular normal e a replicação microbiana (NOGAROTO; PENHA, 2006). A esterilização por óxido de etileno deve ser conduzida numa faixa de temperatura de 21-70°C e umidade relativa de 30 – 60%, com concentração de gás variando entre 400 a 1600 mg/L. A umidade é um fator importante que influencia os efeitos do óxido de etileno nas populações microbianas. Ele é ineficaz contra microrganismos desidratados em ambientes secos. A água atua como um carreador do óxido de etileno através de barreiras permeáveis. A atividade da água da célula microbiana e a umidade relativa do ambiente em que se encontra são de importância crítica para o deslocamento da água e penetração do agente esterilizante químico para atuar nos sítios alvo (HALLS, 1994).

O processo de esterilização é geralmente realizado em câmara pressurizada semelhante à autoclave, mas com características adicionais únicas para esterilizantes que empregam este gás. Para esterilização por óxido de etileno, os produtos contidos em embalagens permeáveis ao gás são colocados na câmara de esterilização. É feita a elevação da temperatura até aproximadamente 54°C, seguida pela evacuação da câmara para retirada do ar, e assim reduzir a diluição do agente esterilizante. Em seguida, é realizada a umidificação e aquecimento, condições necessárias para permitir uma maior penetração do agente esterilizante nas embalagens, além de favorecer a reação de alquilação das cadeias protéicas microbianas. Posteriormente, o gás é injetado em concentração previamente definida. O tempo de exposição ao gás depende do tipo de embalagem, do volume e densidade da carga e se o esterilizador possui circulação de gás. Após o tempo previsto, são realizadas evacuações com redução de pressão (vácuo) para eliminação do gás e dos resíduos. Em seguida, ocorre aeração com sucessivos ciclos de injeção de ar filtrado e vácuo, para eliminação do gás e dos resíduos até níveis seguros para a utilização dos artigos. Os resíduos recolhidos nas aerações passam por uma solução ácida de ácido sulfúrico para a formação de etilenoglicol, que é descartado desta forma. (NOGAROTO; PENHA, 2006)

É importante demonstrar que todos os parâmetros críticos do processo estejam conforme especificado. Realiza-se conforme a etapa do processo o controle da umidade, da concentração do óxido de etileno, da pureza do gás diluente e do gás óxido de etileno, dos resíduos nos produtos e no ambiente, da temperatura, da pressão (positiva e negativa), do tempo de exposição, da distribuição do gás na câmara. O uso de indicadores biológicos (*Bacillus atrophaeus* ATCC 9372) permite avaliar a eficácia do processo.

Devido à natureza altamente reativa do óxido de etileno, podem ocorrer reações devido a contaminação com álcalis, aminas, ácidos, água, cloretos metálicos, óxidos metálicos ou uma grande variedade de outras substâncias orgânicas e inorgânicas. Os resíduos do óxido de etileno são etilenocloridrina e etilenoglicol, devendo ser comprovado que a concentração residual dos mesmos e do próprio óxido de etileno não se apresente acima dos limites permitidos, conforme estipulado na Portaria Interministerial nº 482, de 16 de abril de 1999. Para se verificar a concentração de resíduos no dispositivo é feita uma extração com água purificada no dispositivo e em seguida, esta água é analisada utilizando a Cromatografia Gasosa, onde é possível correlacionar a área do pico com a concentração, após a construção da curva padrão ao utilizar concentrações conhecidas para sua construção. Os valores encontrados são avaliados quanto aos limites de segurança estabelecidos (Portaria Interministerial nº 482; ISO 10993-7:2008).

São esterilizados por óxido de etileno produtos que são sensíveis ao calor e à irradiação. Materiais poliméricos como polipropileno de baixa densidade, polimetilmetacrilato, poliuretano e silicones, entre outros, são esterilizados por este método (PINTO, 1991).

2.4.3. Radiações Ionizantes

As radiações ionizantes são emissões de alta energia, sob a forma de ondas eletromagnéticas (raios X, raios gama e luz ultravioleta (UV)) ou partículas (raios alfa,

raios beta, prótons e nêutrons) que, ao se chocarem com os materiais expostos, alteram sua carga elétrica por deslocamento de elétrons, transformando os átomos em íons com carga positiva ou negativa. Quando estas radiações atravessam células criam hidrogênio livre, radicais hidroxila e alguns peróxidos, os quais por sua vez, podem causar diferentes tipos de lesões intracelulares (JACOBS, 2007).

As vantagens da esterilização por radiação incluem baixa reatividade química, baixos resíduos mensuráveis, e o fato de que há poucas variáveis a controlar. A esterilização por radiação é a única em que a base de controle é essencialmente a dose de radiação absorvida, que pode ser precisamente medida. Também é controlado o tempo de exposição, é verificado se a dose mínima requerida de radiação foi liberada (dosímetros químicos e físicos) e o uso de indicadores biológicos (*Bacillus pumilus* NCTC 10337) pode ser empregado. A irradiação causa mínimos aumentos de temperatura, mas pode afetar certas classes e tipo de vidros e plásticos.

O ⁶⁰cobalto é o elemento de eleição como fonte de radiação gama, devido à sua abundância na natureza e propriedade de emitir radiação de alta energia, além de ausência de indução radioativa em outros elementos químicos.

Para radiação gama, a validação de um procedimento inclui o estabelecimento da compatibilidade dos materiais, estabelecimento do carregamento padrão dos produtos e definição da dose de irradiação (incluindo identificação dos limites mínimo e máximo de dose), estabelecimento do tempo do ciclo e demonstrativo da liberação da dose esterilizante requerida. Deve ser determinada também a dose esterilizante efetiva, que é aquela tolerada sem causar dano. Os materiais expostos à radiação gama podem ser utilizados imediatamente após o processo de esterilização, tendo em vista a elevada eficácia do processo e o fato de que não apresentam resíduos.

Em geral, esterilização por irradiação é um método eficiente e oferece como vantagem ser capaz de esterilizar um produto embalado com pouca ou nenhuma elevação térmica. O poder de penetração da radiação gama é maior do que de elétrons, mas possui elevados custos de instalação e controle (PALSULE; CLARSON; WIDENHOUSE, 2008). Entretanto, há estudos que observaram alterações nas propriedades do polímero submetido à irradiação (BRUCK; MUELLER, 1988; WOO et al., 1998). Certos plásticos degradam quando irradiados e mudanças químicas podem

ser induzidas no artigo a nível molecular dependendo da estrutura química envolvida, como cisão da cadeia e despolimerização (ZHANG et al., 1996) ou formação de ligações cruzadas (BENSON, 2002). Uma ampla faixa de materiais são compatíveis com a esterilização por radiação, incluindo polietileno, poliésteres, poliestireno, polisulfonas e policarbonato. O fluoropolímero politetrafluoroetileno (PTFE) não é compatível com este método, apresentando extrema sensibilidade à radiação (RATNER et al, 2004).

Há estudos indicando que, no caso de dispositivos de silicone, a radiação pode causar a ruptura das ligações de hidrogênio da interface do enchimento entre a superfície dos grupos silanol do enchimento e do siloxano do polímero. Isto causaria uma queda na densidade aparente das ligações cruzadas e pequenas alterações no módulo. Foi verificado que, quando exposto à radiação gama, o silicone apresenta a cisão de ligações cruzadas na cadeia principal. Entretanto, pequenas quantidades das cadeias rompidas podem levar a pequenas quantidades de polisiloxanos cíclicos e lineares de baixo peso molecular e estes produtos são novamente presos à rede e podem ser subseqüentemente repostos à estrutura por ligações cruzadas, sendo considerado como efeito da radiação gama em silicones aumentar as ligações cruzadas nos elastômeros. Estudos de degradação termogravimétrica não revelaram qualquer mudança significativa nas características de degradação de materiais pós-esterilização. Não houve evidência observável de formação de produtos de degradação de baixo peso molecular decorrente da irradiação gama de silicone (PALSULE; CLARSON; WIDENHOUSE, 2008).

2.5. Validação da Esterilização

Validação da esterilização é um procedimento documentado demonstrando que uma especificação prescrita foi alcançada, pela obtenção de dados, registros e interpretação de resultados que demonstram que o processo produz consistentemente um produto livre de microrganismos, com um alto grau de garantia e confiança. A

validação pode ser considerada um programa total. Este programa abrange qualificação paralela do produto e embalagem, determinação da eficácia da esterilização, efeito do processo em amostras do produto, uma qualificação do equipamento na instalação, qualificação do desempenho do processo e certificação. Uma vez que um processo é validado completamente, o processo e o equipamento são tipicamente revalidados periodicamente ou anualmente. Um processo validado terminado permite a rotina de processamento e liberação do produto (ROGERS, 2005).

Um parâmetro importante no desenvolvimento e validação de ciclos de esterilização é o valor D, que pode ser definido como o tempo requerido para reduzir uma população inicial microbiana em 1 \log_{10} ou 90%. Conhecendo-se o valor D para a esterilização de um determinado produto utilizando um determinado processo de esterilização, com condições específicas, é possível estimar o tempo requerido para que se alcance um nível de garantia da esterilidade (SAL) de 10^{-6} (PAULSON, 1995). O número de ciclos logarítmicos reduzidos na população do bioindicador define o nível de esterilidade ou Sterility Assurance Level (SAL) do produto. O nível de segurança do processo define a probabilidade de falha prevista para a operação, estabelece o número final de sobreviventes por unidade de produto e define o tempo de processo à temperatura de referência. O conceito de garantia de esterilidade envolve a idéia de confiança. A norma ISO 14607:2002 – *Implants for surgery – specific requirements for mammary implants* – no item 9, onde trata da esterilização reporta-se à norma ISO 14630:1997 *Non-active surgical implants – General requirements* – onde o Nível de Segurança de Esterilidade (Sterility Assurance Level – SAL) requerido para os implantes mamários é de 10^{-6} . Isto não significa porém inferir que se admita a não esterilidade em um a cada milhão de unidades, e sim agregar cuidados adicionais que, efetivamente, permitam o emprego seguro do produto. Para se obter esta garantia, deve-se possuir bons conhecimentos dos efeitos dos processos esterilizantes nas populações microbianas (HALLS, 1994).

A validação de um processo esterilizante consiste em verificar a eficácia do processo e emprega em sua última etapa qualificação de desempenho, a avaliação da letalidade dos indicadores biológicos. Dentre as opções de validação, tem-se o método de sobre-morte (overkill), método combinado (indicador biológico/bioburden) ou

bioburden absoluto. O método de bioburden requer controle rígido quantitativo e da resistência do bioburden. O método combinado considera tanto o controle (menos rígido) do bioburden como o indicador biológico. O método de sobre-morte vale-se da elevada resistência do indicador biológico, caracterizando letalidade da ordem de 10^6 acrescida de garantia de segurança de esterilidade (SAL) de 10^{-6} . Este é o princípio do conceito de meio-ciclo, em que uma população 10^6 de um indicador resistente é inativado durante o ciclo da validação e então, o período da exposição é dobrado na operação rotineira. O método de sobre-morte é amplamente empregado quando se esterilizam materiais termoestáveis, porém pode levar a efeitos adversos como consequência de tempos de esterilização extensos (AGALLOCO, 2007).

2.5.1. Indicador Biológico

Indicador biológico consiste em uma estrutura que tem como sensor um microrganismo específico, resistente a um determinado processo de esterilização. É usado para qualificação de uma operação física de um aparelho de esterilização, no desenvolvimento e estabelecimento de processo de esterilização validado para um artigo específico, e na esterilização de equipamento, material e embalagens para processamento asséptico. É usado também para monitorar um ciclo de esterilização estabelecido (NOGAROTO; PENNA, 2006).

Há pelo menos três tipos de indicadores biológicos. Cada tipo de indicador incorpora uma espécie conhecida de microrganismos de resistência conhecida ao método esterilizante.

Uma forma de indicador biológico inclui esporos que são adicionados a carreadores (um disco ou tira de filtro de papel, vidro, plástico, ou outros materiais) e acondicionado para manter a integridade e viabilidade do carreador inoculado. Carreadores e embalagem primária não devem conter qualquer contaminação (física, química ou microbiana) que afetaria adversamente a performance ou as características

do indicador biológico. O carreador e a embalagem primária não devem ser degradados pelo processo específico de esterilização.

Outra apresentação de indicador biológico é uma suspensão de esporo que é inoculado sobre ou dentro de unidades representativas de produtos a serem esterilizados. Isto representa um produto inoculado, entretanto, um produto simulado inoculado pode ser usado se houver impedimento inocular o produto real. Um produto simulado difere em um ou mais aspectos formas do produto real, mas responde como o mesmo sob condições teste ou durante processo de esterilização (ABNT NBR ISO 11138-1, 2004).

Uma terceira forma de indicador biológico é um indicador autocontido. Um indicador biológico autocontido é semelhante à primeira forma apresentada, porém com o suporte contido em embalagem primária, destinada à incubação sem manuseio depois do processo esterilizante. Contém, inicialmente isolado, o meio de crescimento para recuperação dos esporos microbianos expostos ao processo, podendo ser considerado um sistema que, de forma integrada, fornece informações quanto à resistência ao processo de esterilização. Também pode consistir de uma suspensão de esporos em seu próprio meio. Contém no meio de cultura um indicador de pH, o qual em decorrência de alterações promovidas pelo metabolismo microbiano, indica positivo ou negativo crescimento pós-incubação (DABBAH; PORTER, 2007).

Crescimento ou ausência de crescimento dos esporos tratados são determinados visualmente (pela observação de mudança de cor do indicador incorporado ao meio ou pela turbidez) (ABNT NBR ISO 11138-1, 2004).

2.6. Endotoxinas Bacterianas

Com o intuito de se garantir a qualidade de um dispositivo a ser implantado, além de se verificar a esterilidade, na certeza da ausência de formas viáveis e reprodutoras de microrganismos, busca-se a garantia quanto a níveis máximos seguros de

endotoxinas, já que a existência de bactérias Gram-negativas pode levar à sua presença no produto (DABBAH; PORTER, 2007).

Endotoxinas são lipopolissacarídeos (LPS) de alto peso molecular, componentes da parede celular externa de bactérias Gram-negativas que causam febre e outras ações biológicas, entre as quais uma rápida queda na pressão sangüínea se introduzida no sangue ou tecidos do corpo. Por possuir a endotoxina característica ubíqua na natureza, pelo fato de ser estável e pequena o suficiente para passar através de filtros esterilizantes convencionais, seu controle, principalmente para produtos implantáveis, é rigoroso (ANSI/AAMI ST72:2002). O limite é de 0,5 UE/mL (Unidades de Endotoxina/mL), recomendado pela Food and Drug Administration (FDA, 1987); não mais que 20,0 UE/implante (USP 31, 2008).

A despirogenização pode ser obtida de duas formas, seja pela inativação ou remoção de endotoxinas. A inativação pode ser obtida pela detoxificação da molécula de LPS usando tratamentos químicos que quebrem pontes lábeis ou bloqueiem sítios necessários à atividade pirogênica (soluções ácidas ou básicas fortes). Pode ainda ocorrer oxidação pelo uso de peróxido de hidrogênio. Como alternativa, a molécula pode ser totalmente destruída sob altas temperaturas (calor seco). A remoção de endotoxinas também pode ocorrer baseada em características físicas da endotoxina, como tamanho, peso molecular (ultrafiltração, remoção por troca iônica ou agregação seguida por filtração), carga eletrostática (troca iônica) ou afinidade de endotoxina a diferentes superfícies (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003; WILLIAMS, 2007).

A aplicação de calor seco tem sido o método de escolha para materiais termo-resistentes. O método padrão descrito é de exposição a não menos que 250°C por não menos que 30 minutos, sendo o mecanismo de ação a incineração. A cinética de inativação do LPS segue um processo não linear, de segunda ordem, em contraste à inativação de esporos bacterianos, que segue cinética de primeira ordem (HALLS, 1994). LPS apresenta cerca do dobro da resistência térmica com relação à endotoxina nativa da qual foi derivada.

De forma geral, os métodos de esterilização comumente empregados não levam à despirogenização do produto, com exceção do calor seco, em que é necessária temperatura superior à necessária para esterilização. Porém, para alguns dispositivos,

foi observado que a esterilização foi eficaz na inativação do LPS, como no caso na esterilização de limas em autoclave ou forno de Pasteur (SILVA et al., 2007) e na esterilização de tubos de vidro por óxido de etileno (PEDERSEN; HANSEN, 1989).

2.6.1. Métodos de determinação de endotoxinas

Os métodos de determinação de endotoxinas visam detectar ou quantificar endotoxinas bacterianas que podem estar presentes em ou sobre amostras de produtos aos quais o teste é aplicado.

A técnica Ponto Final de Gelificação (Gel-Clot) baseia-se na reação da endotoxina com o LAL (Lisado de Amebócito *Limulus*), que é um reagente extraído de amebócitos circulantes de caranguejos em forma de ferradura de cavalo, *Limulus polyphemus* ou *Tachypleus tridentatus* (TAL), formando um coágulo gelatinoso. A reação é dependente da ativação de enzima de alto peso molecular pela endotoxina, que por sua vez gelifica proteínas coaguláveis de baixo peso molecular. Esta reação é crítica na definição de um ponto final no teste LAL. O ensaio constitui-se em teste limite, levando em consideração a sensibilidade do LAL empregado (variando entre 0,25 e 0,015 UE/mL). Por ser ensaio limite, apresenta a desvantagem de impedir a quantificação da endotoxina a níveis abaixo daqueles em que se forma o gel consistente. Nas técnicas de gel-clot, a reação de ponto final é determinada a partir de diluições do material sob teste em comparação direta com diluições paralelas de uma endotoxina de referência, e as quantidades de endotoxina são expressas em Unidades de Endotoxina (EU). Volumes iguais de reagente LAL e da solução teste (0,1mL de cada) são transferidos aos tubos teste, de vidro despirogenizado. A mistura é homogeneizada e incubada em banho de água a 37°C por 1 hora. Na remoção cuidadosa e individual dos tubos e sua inversão a 180°, havendo presença de gel, que se mantém sólido, o teste é positivo para endotoxina (ANSI/AAMI ST72:2002; PINTO; KANEKO; OHARA, 2003).

As técnicas cromogênica e turbidimétrica permitem a quantificação de endotoxinas, por método cinético ou de ponto final.

O ensaio turbidimétrico é baseado no fato de que qualquer aumento na concentração de endotoxinas causa um proporcional aumento na turbidez devido à precipitação de proteína coagulável (coagulogênio) no lisado. Procede-se a leitura da densidade óptica de várias diluições da substância a ser testada e compara-se com uma curva padrão, conforme o caso (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003).

A técnica cromogênica baseia-se no desenvolvimento de cor após clivagem de complexo peptídico-cromógeno sintético. Neste método, há atividade de uma enzima de coagulação ativada, com ação amidase específica para resíduos glicina-arginina carboxiterminais, induzida pela endotoxina na dependência da liberação do cromóforo (p-nitroanilina), medida pela leitura em absorvância a 405 nm. Uma amostra é misturada ao LAL e substrato reagente, colocada em uma placa incubadora de leitura e monitorada automaticamente até o desenvolvimento de uma coloração amarela (WILLIAMS, 2007).

O método de ponto final para as técnicas cromogênica e turbidimétrica é baseado na relação linear entre a concentração de endotoxina e a formação de cor (cromogênica) ou turbidez medida baseada na densidade óptica em um determinado comprimento de onda. Essa relação é avaliada por meio da construção de uma curva padrão com o emprego de uma pequena faixa de diluições (ANSI/AAMI ST72:2002).

O teste quantitativo cinético é baseado no tempo de reação requerido pela amostra para alcançar uma absorvância específica. O tempo necessário para a reação (tempo de reação) é inversamente proporcional à quantidade de endotoxina presente, ou seja, um pequeno tempo de reação indica uma alta concentração de endotoxina na amostra. O tempo gasto para a reação é relacionado à quantidade de endotoxina, que é usado para a construção da curva padrão e posteriormente comparação com a amostra analisada (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003).

3. Objetivos

Este estudo possui como objetivos:

- avaliar a influência de etapas produtivas do implante mamário (membranas, insumos, mistura dos insumos, implantes antes e após vulcanização) sobre a sua qualidade microbiana;
- observar a capacidade de redução da biocarga durante a etapa de vulcanização;
- avaliar as quantidades de endotoxina nos implantes antes e após o processo de esterilização (calor seco e óxido de etileno), verificando-se se os processos considerados alteram significativamente a quantidade de endotoxina.

4. Materiais e Métodos

4.1. Materiais

Para avaliar a qualidade microbiana nas distintas etapas envolvendo a obtenção de implantes mamários, idealizou-se iniciar com a amostragem dos insumos empregados na obtenção do gel de silicone (componentes A (Poliol) e B (Isocianato)), assim como ambos após mistura. Foram também amostrados os invólucros (ou membranas) dos implantes, como demonstrado na Figura 5, após tratamento térmico destes componentes (pré-vulcanização) e inclusive depois de tempos de armazenamento, para avaliar o nível de contaminação das membranas. A Figura 6 ilustra o acondicionamento dos invólucros dos implantes (em sacos plásticos).



Figura 5 – Invólucro de implante mamário de silicone com superfície texturizada



Figura 6 – Invólucros de implantes mamários de silicone com superfície texturizada acondicionadas em saco plástico, com 6 meses de estoque.

Os implantes (membranas após enchimento com gel de silicone), anteriormente e após submetidos ao processo de vulcanização (Figura 7) foram também amostrados e avaliados.

O esquema apresentado na Tabela 1 define quantidades de material empregado ou réplicas da amostra, conforme o caso.



Figura 7 – Implante de gel de silicone com superfície texturizada após o processo de vulcanização

Tabela 1: Apresentação de amostras avaliadas, considerando quantidades de material empregado e réplicas (membranas, componentes poliméricos – pré e pós mistura – do gel, implantes – pré e pós vulcanização), material de acondicionamento e indicação de tempos de armazenamento das membranas.

<i>Material</i>		<i>Acondicionamento / Tempo de Armazenamento*</i>	<i>Amostragem</i>	<i>Réplicas</i>	
Membranas		Sacos plásticos / menos de 1 mês	Unidade	3	
		Sacos plásticos / 6 meses	Unidade	3	
		Sacos plásticos / 10 meses	Unidade	3	
Componentes do Gel de Silicone	Parte A (Poliol)	Lote 1	Potes de 80mL	50g	3
		Lote 2	Potes de 80mL	50g	3
		Lote 3	Potes de 80mL	50g	3
	Parte B (Isocianato)	Lote 1	Potes de 80mL	50g	3
		Lote 2	Potes de 80mL	50g	3
		Lote 3	Potes de 80mL	50g	3
Componentes do Gel de Silicone (Após mistura)	Lote 1	Potes de 80mL	50g	3	
	Lote 2	Potes de 80mL	50g	3	
	Lote 3	Potes de 80mL	50g	3	
Membranas texturizadas de 700mL cheias com gel de silicone - antes da vulcanização (Implantes não vulcanizados)	Lote 1	Sacos plásticos	Unidade	3	
	Lote 2	Sacos plásticos	Unidade	3	
	Lote 3	Sacos plásticos	Unidade	3	
Membranas texturizadas de 700mL cheias com gel de silicone - após vulcanização (Implantes vulcanizados)	Lote 1	Sacos plásticos	Unidade	3	
	Lote 2	Sacos plásticos	Unidade	3	
	Lote 3	Sacos plásticos	Unidade	3	
Total de Amostras				54	

Para realizar a avaliação do decaimento da carga microbiana durante o processo de vulcanização, foram realizados 3 ciclos de vulcanização, onde foram analisadas 20 unidades (implantes de silicone) correspondentes a cada ciclo. Em cada unidade havia tiras de esporos – “Graded Biological Indicators”, com cargas de 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 e 10^8 esporos microbianos. As tiras foram introduzidas no interior do implante, posição central no gel. Após vulcanização, as mesmas foram retiradas do implante e acondicionadas, uma a uma, em saco plástico, seguindo para a análise, conforme ilustrado na Figura 8. Sendo assim, a cada ciclo de vulcanização utilizavam-se 100 tiras de esporos, totalizando 300 tiras ao final dos 3 ciclos.



Figura 8 – Tira de esporo acondicionada em saco plástico

Para realizar a quantificação de endotoxina, foram analisadas 12 amostras por semana, sendo 6 de implantes não submetidos ao processo de esterilização, 3 implantes após o processo de esterilização por calor seco e 3 implantes após o processo de esterilização por óxido de etileno. A análise foi repetida durante 5 semanas. Foi utilizado para a análise de quantificação de endotoxina o kit de teste Kinetic-QCL[®]. Fazem parte do kit: o Reagente Kinetic-QCL[®] (mistura co-liofilizada de lisado, preparado a partir de amebócitos circulantes do caranguejo ferradura, *Limulus polyphemus*, e substrato cromogênico) e o padrão de Endotoxina *E. coli* 055:B5.

As amostras foram cedidas por produtor nacional que se caracteriza pelo atendimento às normas de qualidade nacionais e internacionais. Regularmente auditada, a empresa está em conformidade com as certificações a ela atribuídas. Possui registro de todos os produtos no Ministério da Saúde brasileiro e as matérias-primas de origem norte-americana devidamente registradas na FDA. Tem o Certificado de Boas Práticas de Fabricação, emitido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e também segue ao sistema de qualidade GMP (Good Manufacturing Practices of Medical Products), sendo aprovado pela FDA. Possui também o Certificado de qualidade ISO 9001 e a Marca CE, selo que dá aos produtos a garantia de qualidade, em termos específicos da indústria para fins médicos ou de saúde em geral,

para toda a área da Comunidade Européia. Tais condições tornam a amostragem adequada ao estudo.

4.2. Métodos

O processo produtivo de implantes mamários de silicone da empresa da qual os implantes foram alvos do estudo (implantes de membrana texturizada preenchidos por gel) ocorre paralelamente em duas vertentes: a formação da membrana externa e a formação do gel. De forma sucinta, ocorre da seguinte forma:

Para a formação da membrana externa, o componente da membrana é colocado em fôrma de acordo com o tamanho do implante, onde são adicionadas múltiplas camadas de silicone fluido formando uma película, a membrana. A membrana apresenta um orifício que será utilizado para posterior preenchimento do implante. A membrana passa por um processo de pré-vulcanização (aquecimento) e em seguida, é estocada aguardando o preenchimento com gel.

Para obtenção do gel, um dos componentes do Gel de Silicone (Parte A) é misturado ao segundo componente do Gel de Silicone (Parte B) sob agitação. Em seguida, a mistura A + B é introduzida internamente à membrana já produzida, no processo de enchimento. O implante preenchido segue para o processo de acabamento, para retirada de qualquer imperfeição ou descarte total, no evento de significativa característica não-conforme. O implante preenchido e após acabamento segue para o processo de vulcanização (aquecimento a 165°C por 9 horas e 15 minutos). O implante já vulcanizado segue para limpeza e acabamento e em seguida, para embalagem. Os implantes embalados seguem para a esterilização (calor seco, 121°C, 36-40h).

Para realização do presente estudo foram aplicados métodos microbiológicos, compreendendo a determinação quantitativa da biocarga nos insumos, na mistura dos componentes do polímero, nas membranas e nos implantes, antes e após vulcanização

e avaliação do decaimento da carga microbiana. Também aplicou-se avaliação biológica destinada à quantificação de endotoxinas bacterianas pelo método cromogênico cinético.

Para todas as análises, garantiu-se que o meio de cultura e os materiais utilizados estavam estéreis ou apirogênicos, conforme o caso, e também que o meio de cultura empregado possuía capacidade promotora de crescimento microbiano, para assim, se evitar falsos resultados.

Comprovação da esterilidade dos meios de cultura

Para confirmação da esterilidade dos meios de cultura, após sua preparação, de cada um dos lotes dos meios empregados, foram incubadas três placas por período de: para meios TSA (Tryptic Soy Agar) e RCA (Reinforced Clostridial Agar) 2-3 dias a 30-35°C, sendo as placas contendo RCA foram incubadas em condições de anaerobiose; para SDA (Sabouraud Dextrose Agar) 5-7 dias a 20-25°C; para TSB (Tryptic Soy Broth) 7 dias a 30-35°C (USP 31, 2008).

Verificação da capacidade promotora de crescimento dos meios de cultura

Para verificação da capacidade promotora de crescimento dos meios de cultura, de cada lote de meio de cultura estéril foram inoculados, em duplicata, com aproximadamente 100 UFC/tubo, empregando os microrganismos a seguir descritos:

- Para o meio TSA, foram empregados os microrganismos *Staphylococcus aureus* 6538 e *Pseudomonas aeruginosa* 9027 e após inoculação os tubos foram incubados por 2-3 dias a 30-35°C. Também inoculou-se os tubos com *Bacillus subtilis* 6633, estes incubados por 2 dias a 37°C;
- Para o meio RCA foram empregados os microrganismos *Bacteroides vulgatus* ATCC 8482 e *Clostridium sporogenes* ATCC 11437 e após inoculação os tubos foram incubados por 2-3 dias a 37°C, em condições de anaerobiose;

- Para o meio SDA foram empregados os microrganismos *Candida albicans* 10231 e *Aspergillus niger* 16404 e após inoculação os tubos foram incubados por 5-7 dias a 20-25°C;
- Para o meio TSB foram empregados os microrganismos *Micrococcus luteus* 9341 e após inoculação os tubos foram incubados por 2-3 dias a 37°C e *Candida albicans* 10231 e *Aspergillus niger* 16404, que após inoculação os tubos foram incubados por 7 dias a 30-35°C (USP 31, 2008).

4.2.1. Validação da determinação quantitativa da biocarga

A validação dos procedimentos de extração e contagem microbiana envolveu a contaminação intencional das membranas, dos insumos, da mistura dos componentes do polímero e dos implantes, antes e após vulcanização empregando suspensões microbianas padronizadas, visando assim determinar os percentuais de recuperação das células inoculadas.

4.2.1.1. Membranas

A validação foi efetuada em duplicata de implantes para cada uma das cepas microbianas empregadas: *Staphylococcus aureus*, ATCC 6538; *Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 9027; *Bacillus subtilis*, ATCC 6633 e *Candida albicans*, ATCC 10231. Foram empregadas culturas de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *B. subtilis* incubadas durante 24 horas a $35,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ e de *C. albicans* incubada durante 48 horas a $24,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$, obtidas a partir de seus repiques de manutenção. Porções do crescimento obtido foram posteriormente transferidas para tubo contendo meio líquido de caseína soja, estes incubados nas mesmas condições descritas anteriormente, de forma a permitir obter-se suspensão homogênea de células. As suspensões assim obtidas foram submetidas ao método de contagem por placa empregando diluições que variam de 10^{-5} a 10^{-9} , de forma a permitir sua padronização. Empregou-se para os inóculos dos materiais poliméricos em estudo suspensões contendo 100 UFC/mL, aplicadas em

volume de 1 mL. Procedeu-se à inoculação em cada unidade, de 1 mL de suspensão microbiana determinada. Quantidades de aproximadamente 500 mL de solução fisiológica estéril com 0,1% de Tween 80 foram introduzidas no interior das membranas e agitadas por cerca de 30 minutos. Porções de 100 mL foram filtradas através de membranas com poro de 0,45 μm , em 3 réplicas. As membranas foram posicionadas sobre placas contendo ágar caseína soja e incubadas durante 2-3 dias a 30-35°C para bactérias e sobre placas contendo SDA e incubadas a 20-25°C por 5-7 dias para leveduras. Paralelamente à inoculação do volume interno do implante mamário foi realizada a contaminação da superfície externa de silicone texturizado, com a suspensão microbiana empregada anteriormente, utilizando-se 2 unidades para cada microrganismo. Decorrido o tempo de secagem de 96 horas e após esvaziamento das unidades, sendo o líquido interno reservado para determinação da contagem microbiana, procedeu-se ao processo extrativo com volume total de 500 mL, em solução fisiológica estéril contendo 0,1% de Tween 80, sob agitação mecânica durante 30 minutos. A seguir foi realizada filtração através de membrana com tamanho de poro de 0,45 μm , de volumes de 100 mL. As membranas foram, em seguida, assepticamente posicionadas sobre placas contendo ágar caseína soja e incubadas durante 2-3 dias a 30-35°C por para bactérias e sobre placas contendo SDA e incubadas a 20-25°C por 5-7 dias para leveduras (USP 31, 2008).

4.2.1.2. Insumos, Mistura dos componentes do polímero e Implantes, antes e após vulcanização

O estudo consistiu na quantificação da biocarga empregando 10g dos insumos, da mistura dos componentes do polímero e das unidades dos implantes (antes e após vulcanização), com três lotes diferentes de cada item. Empregou-se os seguintes microrganismos: *Staphylococcus aureus*, ATCC 6538, *Bacillus subtilis*, ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 9027, *Candida albicans*, ATCC 10231. Foram empregadas culturas de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *B. subtilis* incubadas durante 24h a $35 \pm 2,0^\circ\text{C}$ e de *C. albicans* incubada durante 48h a $24 \pm 2,0^\circ\text{C}$, obtidas a partir de seus repiques de manutenção, que foram posteriormente transferidas para tubos contendo

meio líquido de caseína soja e estes incubados nas mesmas condições descritas anteriormente, de forma a permitir suspensão homogênea de células.

As suspensões assim obtidas foram submetidas ao método de contagem por placa empregando diluições que variaram de 10^{-5} a 10^{-9} , de forma a permitir sua padronização. Empregou-se para os inóculos dos materiais sob estudo suspensões contendo 100 UFC/mL, aplicadas em volumes de 1 mL.

Foram transferidas 10g da amostra para um frasco contendo 100 mL de solução salina 0,9%, com 0,1 mL de Tween 80 previamente adicionado. Após agitação para homogeneização, alíquotas de 1 mL foram transferidas para 12 placas (3 placas para cada microrganismo, na diluição 10^{-1}). A partir do frasco com solução salina foram feitas mais duas diluições (10^{-2} e 10^{-3}), que também tiveram 1 mL plaqueado para 12 placas, cada diluição (USP 31, 2008).

4.2.2. Determinação quantitativa da biocarga

A determinação da biocarga ocorreu nos insumos, na mistura dos componentes do polímero, nas membranas e nos implantes, antes e após vulcanização.

4.2.2.1. Membranas

Para determinação da biocarga na parte interna da membrana, quantidades de aproximadamente 500 mL de solução fisiológica estéril com 0,1% de Tween 80 foram introduzidas no interior das membranas e agitadas por cerca de 30 minutos. Porções de 100 mL foram filtradas através de membranas com poro de $0,45 \mu\text{m}$, em 3 réplicas. Transferiu-se as membranas para placas contendo 15-20 mL dos meios TSA (Agar trípico de soja), SDA (Sabouraud Dextrose Agar) e RCA (Reinforced Clostridial Agar). As placas foram incubadas a $30-35^{\circ}\text{C}$ por 2-3 dias para bactérias (aeróbias e anaeróbias) e a $20-25^{\circ}\text{C}$ por 5-7 dias para bolores e leveduras. As placas contendo RCA foram incubadas em condições de anaerobiose. Após decorrido o tempo de incubação, foram efetuadas as leituras do número de colônias em cada placa (USP 31, 2008).

Para determinação da biocarga da parte externa da membrana, procedeu-se ao processo extrativo com volume total de 500 mL, em solução fisiológica estéril contendo 0,1% de Tween 80, sob agitação mecânica durante 30 minutos. A seguir foi realizada filtração através de membrana com tamanho de poro de 0,45 μm , de volumes de 100 mL. As membranas foram, em seguida, assepticamente posicionadas sobre placas contendo ágar caseína soja e incubadas durante 30-35°C por 2-3 dias para bactérias e a 20-25°C por 5-7 dias para bolores e leveduras (USP 31, 2008).

4.2.2.2. Insumos, Mistura dos componentes do polímero e Implantes antes e após vulcanização

Dos componentes do gel de silicone (Parte A e Parte B), da mistura (Parte A + B), dos implantes, antes e após vulcanização, tomadas de 10 g foram empregadas para realização da contagem microbiana. Foram transferidas 10 g da amostra para um frasco contendo 100 mL de solução salina 0,9%, com 0,1 mL de Tween 80 previamente adicionado. Após agitação para homogeneização, alíquotas de 1 mL foram transferidas para 9 placas. Em 3 placas, foram adicionados 15-20 mL de meio de cultura TSA resfriado a temperatura aproximada de 45 °C, em 3 placas foram adicionados 15-20 mL de meio de cultura RCA e nas 3 placas restantes foram adicionados 15-20 mL de meio de cultura SDA resfriado. As placas com TSA e com RCA foram incubadas a 30-35°C por 48 horas (para enumeração de bactérias) e as placas com SDA a 20-25°C de 5 a 7 dias (para enumeração de bolores e leveduras). Em placas com RCA, foram incubadas em condição de anaerobiose. Após o decorrido tempo, foram efetuadas as leituras (USP 31, 2008).

4.2.3. Decaimento da carga microbiana

Para avaliação do decaimento da carga microbiana, os suportes (tiras de papel) do indicador biológico já submetidos aos ciclos de vulcanização foram retirados do implante e transferidos assepticamente para tubos com TSB (Tryptic Soy Broth) e incubadas a 30-35°C por 7 dias. Diariamente, os tubos foram avaliados quanto à

presença de crescimento microbiano. As tiras antes da submissão ao desafio (10^4 a 10^8 esporos microbianos) foram avaliadas quanto ao número de esporos pelo método de semeadura em profundidade. Cada tira de esporo foi adicionada em tubo com 9mL de TSB com pérolas de vidro, sendo o conjunto agitado em vórtex até a decomposição das tiras. Os tubos foram submetidos a choque térmico em banho-maria a 60°C durante 10 minutos e em seguida, resfriamento em banho de gelo. Foram realizadas sucessivas diluições de 10^{-1} a 10^{-6} para cada tira correspondente, para posterior plaqueamento. As diluições de 10^{-3} a 10^{-6} foram feitas em triplicata (USP 31, 2008).

4.2.4. Quantificação de endotoxina bacteriana pelo método cromogênico cinético

Para a quantificação de endotoxina, pelo método cromogênico cinético, porções de 25 g dos implantes mamários foram retiradas e a elas foram adicionadas quantidades de 20 mL de água ultra pura, seguindo-se de agitação vigorosa por 30 minutos. De cada solução obtida, transferiu-se, em duplicata, 1 μL a concavidades (poços) da placa tipo Elisa. Para a construção da curva padrão, foram feitas diluições obtendo-se padrões de endotoxina de *E.coli* nas concentrações de 50,000, 5,000, 0,500, 0,050 e 0,005 UE/mL. Transferiu-se 1 μL de cada uma das concentrações de solução padrão aos poços, em duplicata para cada concentração, assim como para o branco (1 μL da água ultra pura utilizada para a extração da amostra). Em seguida, o LAL (Lisado de Amebócito *Limulus*) foi imediatamente reconstituído com água ultra pura e transferido em volumes de 1 μL a cada um dos poços inoculados com as amostras, conforme acima descrito. A microplaca foi então introduzida no leitor de microplaca com software WinKQCL[®], procedendo-se ao ensaio e análise dos dados obtidos (USP 31, 2008).

O método foi previamente validado. Procedeu-se para tanto a análise da amostra em questão, previamente adicionada de endotoxina (10 μL da solução de concentração 5 EU/mL) para verificar se a amostra interferiria no resultado, comprometendo a recuperação desejada.

As análises foram realizadas antes e após ciclos de esterilização, cujas condições aplicadas foram as seguintes:

- Esterilização por Calor Seco: Os implantes já acondicionados foram adicionados na estufa de esterilização marca Grieve, modelo TBH 500. O ciclo de esterilização foi realizado a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 36 horas.
- Esterilização por Óxido de Etileno: Os implantes já acondicionados foram esterilizados segundo os seguintes parâmetros:
 - temperatura: $48 \pm 4^\circ\text{C}$
 - concentração de óxido de etileno: 750 mg/L
 - umidade relativa: mínimo 55%
 - tempo de esterilização: 300 minutos

5. Resultados

Buscou-se avaliar a eficiência do processo de vulcanização como método de reduzir a biocarga de forma a contribuir para condições esterilizantes de menor tempo, conferindo ao processo maior agilidade e segurança, assim como otimizando características de estabilidade do produto. Considerou-se importante quantificar o nível de carga microbiana ao longo do processo produtivo para avaliar como as diferentes etapas do processo de fabricação contribuem para eventual incremento ou redução da biocarga presente no produto. Posteriormente, verificar se temperatura e tempo empregados no processo de vulcanização foram eficazes em reduzir a carga microbiana, em quantos ciclos logarítmicos, utilizando como recurso microrganismos resistentes ao processo, padronizados e inoculados em sua forma esporulada e em cargas exponencialmente crescentes, a suportes celulósicos (Graded Biological Indicators).

5.1. Determinação Quantitativa da Biocarga

5.1.1. Percentuais de Recuperação

As Tabelas 2 a 8 apresentam os resultados dos percentuais médios de recuperação para cada item da etapa considerada, calculados empregando os percentuais de recuperação para cada microrganismo.

Tabela 2: Resultados da recuperação de contaminação promovida no interior do invólucro de silicone texturizado

	<i>P. aeruginosa</i> UFC/mL		<i>S. aureus</i> UFC/mL		<i>B. subtilis</i> UFC/mL		<i>C. albicans</i> UFC/mL	
	Unid.1	Unid.2	Unid.3	Unid.4	Unid.5	Unid.6	Unid.7	Unid.8
Inóculo	104	110	120	140	102	92	90	120
Contagem	104	110	120	140	102	92	90	120
%Recuperação	100		100		100		100	
%Recuperação Média	100							

Tabela 3: Resultados da recuperação de contaminação promovida sobre invólucro de silicone texturizado

	<i>P. aeruginosa</i> UFC/mL		<i>S. aureus</i> UFC/mL		<i>B. subtilis</i> UFC/mL		<i>C. albicans</i> UFC/mL	
	Unid.1	Unid.2	Unid.3	Unid.4	Unid.5	Unid.6	Unid.7	Unid.8
Inóculo	104	110	120	140	102	92	90	120
Contagem	77	84	91	103	68	78	69	88
%Recuperação	75,2		74,6		75,3		74,8	
%Recuperação Média	75							

Tabela 4: Resultados da recuperação de contaminação promovida sobre o Insumo A (Poliol)

	<i>P. aeruginosa</i> UFC/mL			<i>S. aureus</i> UFC/mL			<i>B. subtilis</i> UFC/mL			<i>C. albicans</i> UFC/mL		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Média de 3 Inóculos	141	141	141	104	104	104	124	124	124	86	86	86
Média da Contagem nas 3 Diluições	254	185	187	105	101	98	164	104	83	88	90	83
%Recuperação	147,6			97,4			94,3			101,2		
%Recuperação Média	110,1											

Tabela 5: Resultados da recuperação de contaminação promovida sobre o Insumo B (Isocianato)

	<i>P. aeruginosa</i> UFC/mL			<i>S. aureus</i> UFC/mL			<i>B. subtilis</i> UFC/mL			<i>C. albicans</i> UFC/mL		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Média de 3 Inóculos	141	141	141	104	104	104	124	124	124	86	86	86
Média da Contagem nas 3 Diluições	161	231	242	101	107	99	70	99	92	71	91	88
%Recuperação	149,4			98,5			69,7			96,9		
%Recuperação Média	103,6											

Tabela 6: Resultados da recuperação de contaminação promovida sobre a Mistura dos componentes do polímero

Amostra	<i>P. aeruginosa</i> UFC/mL			<i>S. aureus</i> UFC/mL			<i>B. subtilis</i> UFC/mL			<i>C. albicans</i> UFC/mL		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Média de 3 Inóculos	141	141	141	104	104	104	124	124	124	86	86	86
Média da Contagem nas 3 Diluições	255	218	197	105	100	99	81	77	53	124	130	94
%Recuperação	157,9			97,3			56,7			134,9		
%Recuperação Média	111,7											

Tabela 7: Resultados da recuperação de contaminação promovida sobre o Implante antes da vulcanização

Amostra	<i>P. aeruginosa</i> UFC/mL			<i>S. aureus</i> UFC/mL			<i>B. subtilis</i> UFC/mL			<i>C. albicans</i> UFC/mL		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Média de 3 Inóculos	141	141	141	104	104	104	124	124	124	86	86	86
Média da Contagem nas 3 Diluições	139	176	177	95	98	97	102	104	103	102	92	76
%Recuperação	116,1			92,9			83,2			104,7		
%Recuperação Média	99,2											

Tabela 8: Resultados da recuperação de contaminação promovida sobre o Implante após vulcanização

Amostra	<i>P. aeruginosa</i> UFC/mL			<i>S. aureus</i> UFC/mL			<i>B. subtilis</i> UFC/mL			<i>C. albicans</i> UFC/mL		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Média de 3 Inóculos	141	141	141	104	104	104	124	124	124	86	86	86
Média da Contagem nas 3 Diluições	133	123	120	113	99	104	74	50	48	93	89	98
%Recuperação	88,5			101,3			57,5			108,5		
%Recuperação Média	88,9											

Os percentuais de recuperação para todas as etapas foi superior a 70%, indicando que o procedimento em questão é adequado para as análises pretendidas (USP 31, 2008). Os menores percentuais de recuperação encontrados foram para os invólucros, com um valor de recuperação média de 75%.

5.1.2. Biocarga nas etapas consideradas

Os resultados referentes à contagem microbiana nas etapas consideradas estão descritos nas Tabelas 9 e 10.

Tabela 9: Contagem microbiana (UFC) obtida a partir de membranas de implantes de silicone em diferentes lotes de produção e tempos de armazenamento (partes interna e externa) e de componentes poliméricos (pré mistura).

<i>Material</i>			<i>Amostras</i>	<i>Bactérias Aeróbicas</i>		<i>Bactérias Anaeróbicas</i>		<i>Bolores e Leveduras</i>	
				Interna	Externa	Interna	Externa	Interna	Externa
Membrana (Partes Interna e Externa)	Menos de 1 mês		Amostra 1	ND	ND	ND	ND	07	ND
			Amostra 2	07	ND	ND	ND	ND	ND
			Amostra 3	14	09	20	ND	ND	ND
	6 meses		Amostra 1	ND	ND	07	ND	ND	ND
			Amostra 2	ND	05	27	ND	ND	ND
			Amostra 3	07	ND	40	ND	07	ND
		10 meses	Amostra 1	ND	ND	54	ND	ND	05
			Amostra 2	ND	ND	74	ND	ND	ND
			Amostra 3	ND	ND	34	ND	ND	ND
Gel de Silicone	Parte A (Poliol)	Lote 1	Amostra 1	ND		ND		ND	
			Amostra 2	ND		ND		ND	
			Amostra 3	ND		ND		ND	
		Lote 2	Amostra 1	ND		ND		ND	
			Amostra 2	ND		ND		ND	
			Amostra 3	ND		ND		ND	
		Lote 3	Amostra 1	ND		ND		ND	
			Amostra 2	ND		ND		ND	
			Amostra 3	ND		ND		ND	
	Parte B (Isocianato)	Lote 1	Amostra 1	ND		ND		ND	
			Amostra 2	ND		ND		ND	
			Amostra 3	ND		ND		ND	
		Lote 2	Amostra 1	ND		ND		ND	
			Amostra 2	ND		ND		ND	
			Amostra 3	ND		ND		ND	
		Lote 3	Amostra 1	ND		ND		ND	
			Amostra 2	ND		ND		ND	
			Amostra 3	ND		ND		ND	

ND – Não Detectado (< 10 UFC/g)

ND – Não Detectado (< 1 UFC/unidade) – para resultados referentes às membranas

Tabela 10: Contagem microbiana (UFC) obtida a partir de componentes poliméricos (pós mistura) e de implantes (pré e pós vulcanização).

<i>Material</i>		<i>Amostras</i>	<i>Bactérias Aeróbicas</i>	<i>Bactérias Anaeróbicas</i>	<i>Bolores e Leveduras</i>
Mistura (Partes A + B)	Lote 1	Amostra 1	ND	ND	ND
		Amostra 2	ND	ND	ND
		Amostra 3	ND	ND	ND
	Lote 2	Amostra 1	ND	ND	ND
		Amostra 2	ND	ND	ND
		Amostra 3	ND	ND	ND
	Lote 3	Amostra 1	ND	ND	ND
		Amostra 2	ND	ND	ND
		Amostra 3	ND	ND	ND
Membranas texturizadas de 700mL cheias com gel de silicone - antes da vulcanização (Implantes não vulcanizados)	Lote 1	Amostra 1	ND	ND	ND
		Amostra 2	ND	ND	ND
		Amostra 3	ND	ND	ND
	Lote 2	Amostra 1	ND	ND	ND
		Amostra 2	ND	ND	ND
		Amostra 3	ND	ND	ND
	Lote 3	Amostra 1	ND	ND	ND
		Amostra 2	ND	ND	ND
		Amostra 3	ND	ND	ND
Membranas texturizadas de 700mL cheias com gel de silicone - após vulcanização (Implantes vulcanizados)	Lote 1	Amostra 1	ND	ND	ND
		Amostra 2	ND	ND	ND
		Amostra 3	ND	ND	ND
	Lote 2	Amostra 1	ND	ND	ND
		Amostra 2	ND	ND	ND
		Amostra 3	ND	ND	ND
	Lote 3	Amostra 1	ND	ND	ND
		Amostra 2	ND	ND	ND
		Amostra 3	ND	ND	ND

ND – Não Detectado (< 10 UFC/g)

Os resultados demonstrados nas tabelas 9 e 10 indicam que, para todas as etapas, com exceção das membranas, não foi detectada unidade formadora de colônia. No caso das membranas, os maiores valores de carga microbiana (bactérias anaeróbicas) foram encontrados na parte interna das membranas armazenadas por mais tempo (10 meses).

5.2. Decaimento da carga microbiana

As tabelas 11, 12 e 13 apresentam os resultados referentes às tiras antes da submissão ao desafio (10^4 a 10^8 esporos microbianos) e aqueles derivados da avaliação do decaimento da carga microbiana.

Tabela 11: Avaliação das tiras dos “Graded Biological Indicator” antes da submissão ao desafio (10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 e 10^8 esporos microbianos) quanto ao número de esporos pelo método de semeadura em profundidade (Fabricante das Tiras: Raven Biological Laboratories Inc.) e avaliação das tiras dos “Graded Biological Indicator” após o ciclo da vulcanização (Ciclo 1) quanto ao crescimento microbiano, em 20 unidades por ciclo.

Amostras	Ciclo 1				
	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8
Controle	$1,2 \times 10^4$	$6,3 \times 10^5$	$1,2 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$	$3,3 \times 10^7$
Unidade 1	-	-	-	-	-
Unidade 2	-	-	-	-	-
Unidade 3	-	-	-	-	-
Unidade 4	-	-	-	-	-
Unidade 5	-	-	-	-	-
Unidade 6	-	-	-	-	-
Unidade 7	-	-	-	-	-
Unidade 8	-	-	-	-	-
Unidade 9	-	-	-	-	-
Unidade 10	-	-	-	-	-
Unidade 11	-	-	-	-	-
Unidade 12	-	-	-	-	-
Unidade 13	-	-	-	-	-
Unidade 14	-	-	-	-	-
Unidade 15	-	-	-	-	-
Unidade 16	-	-	-	-	-
Unidade 17	-	-	-	-	-
Unidade 18	-	-	-	-	-
Unidade 19	-	-	-	-	-
Unidade 20	-	-	-	-	-
Branco			$1,6 \times 10^6$		

Obs.: - = Não houve crescimento

Tabela 12: Avaliação das tiras dos “Graded Biological Indicator” antes da submissão ao desafio (10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 e 10^8 esporos microbianos) quanto ao número de esporos pelo método de semeadura em profundidade (Fabricante das Tiras: Raven Biological Laboratories Inc.) e avaliação das tiras dos “Graded Biological Indicator” após o ciclo da vulcanização (Ciclo 2) quanto ao crescimento microbiano, em 20 unidades por ciclo.

Amostras	Ciclo 2				
	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8
Controle	$1,2 \times 10^4$	$6,3 \times 10^5$	$1,2 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$	$3,3 \times 10^7$
Unidade 21	-	-	-	-	-
Unidade 22	-	-	-	-	-
Unidade 23	-	-	-	-	-
Unidade 24	-	-	-	-	-
Unidade 25	-	-	-	-	-
Unidade 26	-	-	-	-	-
Unidade 27	-	-	-	-	-
Unidade 28	-	-	-	-	-
Unidade 29	-	-	-	-	-
Unidade 30	-	-	-	-	-
Unidade 31	-	-	-	-	-
Unidade 32	-	-	-	-	-
Unidade 33	-	-	-	-	-
Unidade 34	-	-	-	-	-
Unidade 35	-	-	-	-	-
Unidade 36	-	-	-	-	-
Unidade 37	-	-	-	-	-
Unidade 38	-	-	-	-	-
Unidade 39	-	-	-	-	-
Unidade 40	-	-	-	-	-
Branco			$1,6 \times 10^6$		

Obs.: - = Não houve crescimento

Tabela 13: Avaliação das tiras dos “Graded Biological Indicator” antes da submissão ao desafio (10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 e 10^8 esporos microbianos) quanto ao número de esporos pelo método de semeadura em profundidade (Fabricante das Tiras: Raven Biological Laboratories Inc.) e avaliação das tiras dos “Graded Biological Indicator” após o ciclo da vulcanização (Ciclo 3) quanto ao crescimento microbiano, em 20 unidades por ciclo.

Amostras	Ciclo 3				
	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8
Controle	$1,2 \times 10^4$	$6,3 \times 10^5$	$1,2 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$	$3,3 \times 10^7$
Unidade 41	-	-	-	-	-
Unidade 42	-	-	-	-	-
Unidade 43	-	-	-	-	-
Unidade 44	-	-	-	-	-
Unidade 45	-	-	-	-	-
Unidade 46	-	-	-	-	-
Unidade 47	-	-	-	-	-
Unidade 48	-	-	-	-	-
Unidade 49	-	-	-	-	-
Unidade 50	-	-	-	-	-
Unidade 51	-	-	-	-	-
Unidade 52	-	-	-	-	-
Unidade 53	-	-	-	-	-
Unidade 54	-	-	-	-	-
Unidade 55	-	-	-	-	-
Unidade 56	-	-	-	-	-
Unidade 57	-	-	-	-	-
Unidade 58	-	-	-	-	-
Unidade 59	-	-	-	-	-
Unidade 60	-	-	-	-	-
Branco			$1,6 \times 10^6$		

Obs.: - = Não houve crescimento

Os resultados das tabelas 11, 12 e 13 demonstram que não houve crescimento em nenhum dos tubos contendo as tiras de esporos.

5.3. Quantificação de endotoxina bacteriana pelo método cromogênico cinético

Os resultados da validação da metodologia da determinação quantitativa de endotoxina nos implantes mamários de silicone pelo método cromogênico cinético estão descritos na Tabela 14 e aqueles referentes à quantificação de endotoxina nas

amostras avaliadas nas Tabelas 15 e 16. A Figura 9 ilustra a formação de cor na placa de 96 poços, quando na presença de endotoxina.

Tabela 14: Resultados do percentual da recuperação de contaminação promovida nas amostras analisadas de implantes mamários de silicone durante a validação da metodologia de determinação quantitativa de endotoxinas pelo método cromogênico cinético.

Amostras	% de Recuperação
1	102
2	111
3	94
% Recuperação Média	102,3
Faixa de % Recuperação Aceitável*	50 - 200

* ANSI/AAMI ST72:2002

Tabela 15: Quantificação de endotoxina nos implantes mamários de silicone, com dois grupos de amostra por semana (antes e após esterilização, calor seco e óxido de etileno), durante as semanas 1 e 2.

Esterilização	Amostra Semana 1	EU/ unidade	Amostra Semana 2	EU/ unidade
Antes	1.1	3,9	2.1	< 2,7
	1.2	3,4	2.2	< 2,7
	1.3	< 3,4	2.3	< 2,7
	1.4	< 3,4	2.4	< 2,7
	1.5	< 3,4	2.5	< 2,7
	1.6	< 3,4	2.6	< 2,7
Calor Seco	1.7	< 2,7	2.7	< 2,7
	1.8	< 2,7	2.8	< 2,7
	1.9	< 2,7	2.9	< 2,7
Óxido de Etileno	1.10	< 2,7	2.10	< 2,7
	1.11	5,1	2.11	< 2,7
	1.12	< 2,7	2.12	< 2,7

Tabela 16: Quantificação de endotoxina nos implantes mamários de silicone, com dois grupos de amostra por semana (antes e após esterilização, calor seco e óxido de etileno), durante as semanas 3, 4 e 5.

Esterilização	Amostra Semana 3	EU/ unidade	Amostra Semana 4	EU/ unidade	Amostra Semana 5	EU/ unidade
Antes	3.1	< 2,8	4.1	3,7	5.1	3,2
	3.2	< 2,8	4.2	3,4	5.2	3,3
	3.3	< 2,7	4.3	< 2,7	5.3	< 2,8
	3.4	< 2,7	4.4	< 2,8	5.4	< 2,7
	3.5	< 2,7	4.5	< 2,7	5.5	< 2,8
	3.6	6,1	4.6	< 2,8	5.6	< 2,7
Calor Seco	3.7	< 2,8	4.7	< 2,8	5.7	4,0
	3.8	< 2,8	4.8	< 2,7	5.8	5,7
	3.9	< 2,7	4.9	< 2,7	5.9	< 2,8
Óxido de Etileno	3.10	< 2,7	4.10	< 2,7	5.10	9,3
	3.11	< 2,7	4.11	< 2,7	5.11	< 2,7
	3.12	< 2,8	4.12	< 2,7	5.12	< 2,7

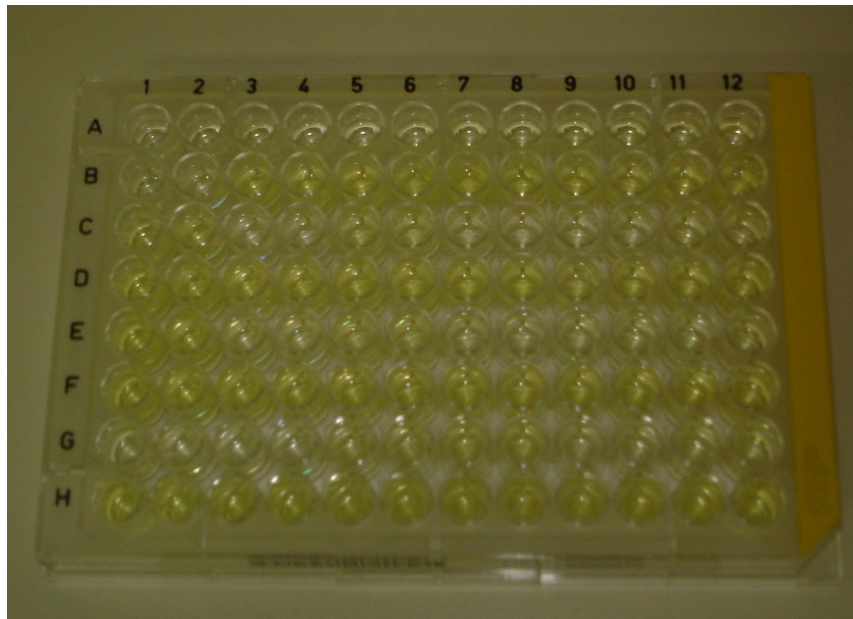


Figura 9 – Teste de quantificação de endotoxina pelo método cromogênico cinético: placa com 96 poços. Coloração amarelada indicando presença de endotoxina.

6. Discussão

Grande preocupação é dada à segurança de um implante, por isso, procedimentos padronizados e validados devem fazer parte da fabricação e controle desses dispositivos, inclusive os implantes mamários de silicone, alvos deste estudo. Sendo assim, esta preocupação deve se iniciar desde o estudo para concepção do material a ser empregado, passando pelo desenvolvimento dos processos que incluem moldagem, limpeza e esterilização. Quando as próteses são implantadas, deve-se ter garantida a condição de esterilidade das mesmas, já que é fator preponderante pela qualidade sanitária do produto, mas principalmente para garantir a segurança do paciente pós-implante, uma vez que infecções clínicas, dentre outros fatores, são responsáveis pela contratura capsular. Todo o processo de desenvolvimento, produção e controle dos produtos é permeado por ensaios de natureza química, biológica, microbiológica, física e mecânica aplicável a cada etapa e situação. Havendo segurança plena quanto a estes aspectos, tem-se a garantia de qualidade do produto.

Além de considerar a questão da segurança em termos de qualidade do produto, é importante avaliar os procedimentos exercidos após sua produção e distribuição, no caso, sua utilização no momento cirúrgico de implantação. E isso engloba procedimentos não só com o implante a ser implantado, mas com todos os outros materiais e instrumentos utilizados durante a cirurgia. Recentemente a ANVISA publicou a Resolução - RDC N° 8, de 27 de fevereiro de 2009, que dispõe sobre medidas para a redução da ocorrência de infecções por *Micobactérias de Crescimento Rápido* – MCR em serviços de saúde. Esta resolução alerta para os procedimentos de limpeza, desinfecção e esterilização de instrumental cirúrgico e dispositivos médicos classificados como críticos (Resolução – RE n° 2606, de 11 de agosto de 2006), por entender que a falha nesses procedimentos está diretamente relacionada à ocorrência de infecções. No caso de implantes mamários, muitas vezes as complicações que ocorrem no pós-operatório podem ser decorrentes de contaminação no momento da cirurgia, levando em algumas situações à retirada do implante (HANDEL et al., 2006; PAJKOS et al., 2003; PITTET; MONTANDON; PITTET, 2005).

Para garantir um produto em condições ideais para sua utilização, considerando todos os aspectos que envolvem a sua qualidade, é importante que durante todo o processo de fabricação a carga microbiana seja controlada, para que assim, os parâmetros do processo esterilizante aplicado estejam adequados.

O uso de Graded Biological Indicators permite monitorar a influência do tempo de exposição ao agente esterilizante, sendo a morte microbiana constatada em termos de crescimento ou não do indicador, no tempo considerado. Sabendo-se que a morte microbiana é essencialmente logarítmica e a taxa de morte é constante sob condições específicas e também constantes de esterilização, o número inicial de esporos usados no indicador biológico permite dimensionar o tempo de exposição requerido considerando o valor exponencial negativo planejado, usualmente de 10^{-6} (KERELUK; GAUGHRAN, 1977).

Mediante validação preliminar, foi possível determinar o tempo necessário para garantir um nível de esterilidade 10^6 e utilizando o método de meio-ciclo, chegou-se ao tempo de 36 horas, para garantir um nível de esterilidade 10^{12} . Sendo assim, no caso do desafio do processo esterilizante utilizando calor seco, para que ocorra a inativação do indicador biológico, se faz necessário submeter o material a 121°C durante 36-40 horas. O uso de elevadas temperaturas poderia eventualmente promover a hidrólise e/ou fusão da matriz do polímero, comprometendo a biocompatibilidade dos implantes. Isto justifica o emprego do processo de esterilização por calor seco a temperatura inferior às convencionalmente preconizadas. Procedeu-se à avaliação de etapas do processo de fabricação, pontos críticos e favoráveis relativos à microbiota do produto e atributo de esterilidade, objetivando correlacioná-los aos parâmetros críticos de qualidade e fundamentalmente com foco no paciente.

A caráter experimental, aplicou-se a unidades de implantes condições de vulcanização mais drásticas que aquelas adotadas rotineiramente pelo produtor. Embora a condição de 165°C , por 9 horas adotada neste estudo não permita emprego pelo não desenvolvimento de estudos de estabilidade e biocompatibilidade, foi definida para ser um diferencial de maior relevância que a condição usual de 135°C .

Com o intuito de garantir resultados verdadeiros, o método utilizado para determinação da biocarga foi validado (USP 31, 2008). Isso permite avaliar se o

material permite a recuperação dos microrganismos, assim como, se a metodologia utilizada permite a remoção das células eventualmente aderidas na superfície do material ou em sua massa. As tabelas 2 a 8 indicam os percentuais de recuperação para cada etapa considerada, comprovando que o método adotado foi adequado para as análises seguintes. Os menores percentuais de recuperação encontrados foram para os invólucros (parte externa), com um percentual de recuperação média de 75%. Este resultado pode ser devido à irregularidade das superfícies e também ao favorecimento da adesão microbiana pelo silicone (RIMONDINI; FINO; GIARDINO, 2005; VIRDEN, 1992). A escolha dos microrganismos empregados no procedimento de recuperação microbiana teve por objetivo contemplar características distintas de forma abrangente, englobando uma bactéria Gram-negativa (*P. aeruginosa*), uma Gram-positiva (*S. aureus*), um microrganismo formador de esporos (*B. subtilis*) e uma levedura (*C. albicans*).

As tabelas 9 e 10 demonstram os valores de biocarga encontrados nas etapas do processo consideradas. O conhecimento da biocarga de um determinado produto é de fundamental importância ao se estabelecer os parâmetros de esterilização do produto final, juntamente com a cinética de inativação desta população quando exposta ao efeito letal. A aplicação dessas informações permite estabelecer parâmetros para um determinado tipo de processo esterilizante, em que uma proporção constante da população sobrevivente é inativada a cada incremento de exposição ao agente letal (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003) e assim, levar a produtos que apresentem a condição de esterilidade.

A determinação dos valores de biocarga também pode contribuir para o controle das etapas do processo, em se tratando de monitoração ambiental, procedimentos de limpeza e manipulação dos instrumentos e produtos, além de permitir o controle e qualificação de fornecedores, ambientes e colaboradores (BOOTH, 1998; HARGREAVES, 2007).

Com base nos resultados apresentados nas tabelas 9 e 10, é possível verificar que o processo em questão encontra-se devidamente controlado, havendo baixa contaminação microbiana quando se trata das etapas produtivas. Um fator que contribui para a baixa contaminação é a própria característica dos insumos utilizados para a

produção dos implantes da incompatibilidade com a vida microbiana. Porém, dependendo do tipo de microrganismo eventualmente presente na superfície do material e também do nível de umidade relativa, é possível a sua proliferação. Certos tipos de microrganismos demandam um mínimo de nutrientes (matéria orgânica) para seu crescimento. Para eles, a atividade de água somado ao tempo de armazenamento são condições suficientes para o seu desenvolvimento (DAVEY, 1989; DENYER; BAIRD, 2007; LENOVICH, 1987). As membranas armazenadas por mais tempo (10 meses) apresentaram os maiores valores, demonstrando ser essa uma etapa que necessita de maior controle, mesmo considerando que as membranas permaneçam protegidas do meio ambiente (em sacos plásticos), sejam armazenadas em ambientes com temperatura e umidade adequadas e que passarão posteriormente pelo processo de esterilização. Vale ressaltar que os maiores valores encontrados foram para as bactérias anaeróbicas, presentes na parte interna da membrana. É possível que no interior da membrana, devidamente acondicionada por saco plástico, as bactérias anaeróbicas alcançaram ambiente com concentração de oxigênio baixa o suficiente para efetuar seu crescimento. É importante considerar que os valores de carga microbiana encontrados nas membranas podem estar relacionados ao fato desta etapa do processo produtivo apresentar alto índice de manipulação. As mãos dos operadores em contato com as membranas podem ser fonte de contaminação. Sabe-se que a contaminação derivada dos operadores é normalmente significativa. Durante atividades normais, a perda de escamas da pele é da ordem de 10^4 por minuto. Os contaminantes por elas transportados são micrococos não patogênicos, difteróides e estafilococos, mas também podem se constituir de *Staphylococcus aureus* como parte da flora normal. Outros ainda, como *Salmonella* e *Escherichia coli*, embora não constituintes da flora residente, podem estar transitoriamente a ela associados, na dependência dos hábitos de higiene dos operadores (PINTO; OHARA; KANEKO, 2003). Apesar destes microrganismos não se caracterizarem como altamente resistentes ao processo esterilizante, sua presença é diretamente relacionada à contaminação por endotoxina bacteriana. Sabe-se que a existência de bactérias Gram-negativas pode levar à presença de endotoxinas no produto, o que para implantes é condição crítica e não

permitida, sendo necessária a análise para garantir ausência de endotoxinas no implante ou sua existência em níveis aceitáveis.

A inclusão do estudo de endotoxinas bacterianas teve por base o fato de que, em contaminação de insumo, de processo, de residual de água que pudesse redundar na presença de bactérias Gram-negativas, embora seja ensaio biológico, é demonstrativo indireto da biocarga ou de esterilidade.

Avaliando os resultados da análise quantitativa de endotoxinas demonstrados nas tabelas 15 e 16, a concentração encontrada está consideravelmente abaixo dos níveis aceitáveis, atendendo às especificações (USP 31, 2008). Um valor mais alto obtido para a amostra 5.10 (9,3 EU/unidade) pode ter sido obtido por contaminação no momento da análise, por parte dos utensílios utilizados ou por parte do analista. Ainda assim, não se justificou investigação específica, pois o valor está abaixo do preconizado pela Farmacopéia Americana, que é de 20,0 EU/unidade. Os processos de esterilização verificados não provocaram redução na quantidade de endotoxina. Isso vem de encontro ao conhecimento de que os métodos esterilizantes não conduzem à despirogenização, e neste experimento, à revelia de informações obtidas por outros autores, sequer redução de níveis endotóxicos foi detectada (PEDERSEN; HANSEN, 1989; SILVA et al., 2007). Há que se lembrar de que outros métodos, químicos e físicos, com ênfase no processo térmico (com temperaturas mais elevadas), são utilizados na despirogenização, empregados na dependência de características do produto (ROBERTSON; GLEASON; TSUJI, 1978; SWARBRICK, 2007). No contexto ora considerado, o processo em sua totalidade permite controle adequado também no que tange a quantidade de endotoxinas.

O método de quantificação de endotoxina escolhido mostrou-se devidamente validado, conforme demonstrado na tabela 14, além de ter como vantagens a possibilidade de realizar simultaneamente a análise de um grande número de amostras, e também de permitir a quantificação em limites abaixo dos detectáveis pelo método gel-clot (EASTER, 2003; GÓRNY et al, 1999; WILLIAMS, 2007).

Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que o processo de aquecimento chamado vulcanização, realizado na produção de implantes mamários de silicone e fundamental para a manutenção das características do produto, atua também

levando à esterilização do interior do implante (gel), sendo capaz de inativar até 10^8 esporos, presentes no interior do produto estudado. Justifica-se, portanto, um posterior estudo avaliando novas condições de esterilização utilizando calor seco, reduzindo o tempo de exposição, considerando-se que o interior do implante já se encontra estéril ao término da vulcanização. Deve-se avaliar, então, as condições para se garantir a esterilidade do produto externamente, validando-as, nas condições específicas de fabricação.

Os resultados mostraram que a vulcanização possibilitou não só a redução da carga microbiana, mas também consiste em mecanismo para garantir a esterilidade do gel interno ao produto. Desta forma, o processo esterilizante final teve como contribuição elevar o Nível de Garantia de Esterilidade (SAL ou Sterility Assurance Level), condição interessante ao se considerar a tendência de adoção da liberação paramétrica, assim como o conceito de validação combinado biocarga/indicador biológico em vez de sobre-morte. Essa avaliação de uma validação por método combinado poderia trazer como vantagem a redução do tempo de exposição a altas temperaturas, favorecendo características físico-químicas e funcionais do implante.

Possibilita ainda que se considere, no caso dos implantes mamários de silicone, a certeza de que a situação de pior caso para posicionamento dos indicadores biológicos no processo de esterilização não é internamente do gel, podendo ser posicionado na superfície do implante.

7. Conclusões

- As etapas do processo produtivo de implantes mamários de silicone se mostraram devidamente controladas, por apresentarem valores de biocarga consideravelmente baixos.

- O processo de aquecimento chamado vulcanização atuou levando à esterilização do interior do implante (gel), sendo capaz de inativar até 10^8 esporos, presentes no interior do produto estudado.

- A baixa carga microbiana dos implantes após o processo de vulcanização ainda não estéreis empregados neste estudo contribuiu para o atendimento ao limite de endotoxinas bacterianas especificado para os implantes mamários.

- Os processos de esterilização empregados, calor seco e óxido de etileno, não alteraram significativamente as quantidades de endotoxinas.

8. Referências Bibliográficas

AGALLOCO, J. P. *Understanding Overkill Sterilization: An End to the Confusion*. Pharmaceutical Technology, Maio 1, 2007. Disponível em:

<http://pharmtech.findpharma.com/pharmtech/article/articleDetail.jsp?id=423946&pageID=1&sk=&date=> , acessado em 18/03/2009.

AMERICAN NATIONAL STANDARD/ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF MEDICAL INSTRUMENTATION. *ANSI/AAMI ST72:2002: Bacterial endotoxins – Test methodologies, routine monitoring, and alternatives to batch testing*. Arlington: AAMI, 2002.

ANDERSON, J.M. Biocompatibility and Bioresponse to Biomaterials. In: ATALA, A., LANZA, R., THOMSON, J., NEREM, R. *Principles of regenerative medicine*. Burlington: Academic Press, 2008.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *ABNT NBR ISO 11138: Esterilização de produtos para saúde – Indicadores biológicos, Parte 1: Requisitos Gerais*. Rio de Janeiro: ABNT, 2004.

AZEVEDO, J.C. de. *Segurança Biológica de Implantes Mamários de Silicone: inter-relação entre processos esterilizantes e biocompatibilidade*. São Paulo, 2004. (Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo)

BACKOVIC, A., WOLFRAM, D. Silicone mamary implants – Can we turn back the time? *Experimental Gerontology* 2007, 42: 713-718.

BARNESLEY, G.P., SIGURDSON, L.J., BARNESLEY, S.E. Textured Surface Breast Implants in the Prevention of Capsular Contracture among Breast Augmentation Patients: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trails. *Plast. Reconstr. Surg.* 2006, 117:2182-2190.

BEKERECIOGLU, M., ONAT, A.M., TERCAN, M., BUYUKHATIPOGLU, H., KARAKOK, M., ISIK, D., BULUT, O. The association between silicone implants and both antibodies and autoimmune diseases. *Clinical Rheumatology* 2008, 27:147-150.

- BELLAMY, K., LIMBERT, G., WATERS, M.G., MIDDLETON, J. An elastomeric material for facial prostheses: synthesis, experimental and numerical testing aspects. *Biomaterials* 2003, 24 (17): 5061-5066.
- BENSON, R. S. Use of radiation in biomaterials science. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 2002, 191:752-757.
- BLACK, J. *Biological Performance of Materials*, 2.Ed. New York: M. Dekker, Inc., 1992.
- BONDURANT, S. ERNSTER, V.L., HERDMAN, R. *Safety of Silicone Breast Implants*. Washington: National Academies Press, 2000.
- BOOTH, A.F. *Sterilization of medical devices*. Illinois: Interpharm Press, 1998.
- BRASIL. Leis, decretos, etc. Resolução – RDC nº 8 de 27 de fevereiro de 2009. *Diário Oficial da União*, 2 mar. 2009. [Dispõe sobre as medidas para redução da ocorrência de infecções por Micobactérias de Crescimento Rápido - MCR em serviços de saúde].
- BRASIL. Leis, decretos, etc. Resolução – RE nº 2606 de 11 de agosto de 2006. *Diário Oficial da União*, 14 ago. 2006. [Dispõe sobre as diretrizes para elaboração, validação e implantação de protocolos de reprocessamento de produtos médicos e dá outras providências].
- BRASIL. Leis, decretos, etc. Portaria Interministerial nº 482 de 16 de abril de 1999. *Diário Oficial da União*, 19 abr. 1999. [Aprova o Regulamento Técnico e seus Anexos, objeto desta Portaria, contendo disposições sobre os procedimentos de instalações de Unidade de Esterilização por óxido de etileno e de suas misturas e seu uso, bem como, de acordo com as suas competências, estabelecer as ações sob a responsabilidade do Ministério da Saúde e Ministério do Trabalho e Emprego].
- BRASIL. Leis, decretos, etc. Decreto nº 79094 de 5 de janeiro de 1977. *Diário Oficial da União, Brasília*, 5 jan. 1977. [O Ministério da Saúde submete a sistema de vigilância sanitária os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, produtos de higiene, saneantes e outros]. Artigo 130 alterado pelo Decreto nº 3961, de 10 de outubro de 2001.

- BRUCK, S.D. *Properties of Biomaterials in the Physiological Environment*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1980.
- BRUCK, S.D., MUELLER, E.P. Radiation sterilization of polymeric implant materials. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1988; 22 (S13): 133-144.
- CASE, L.B., HEFFERNAM, G.D. Dry Heat Sterilization and Depyrogeneration Validation and Monitoring. In: AGALLOCO, J., CARLETON, F.J. *Validation of Pharmaceutical Process*, 3rd Edition. New York: Informa Healthcare, 2007.
- CHANDLER, P. J., KASPER, C. S. Frequency and distribution of talc contamination in patients with silicone gel-filled breast implants. *Ann. Plast. Surg.* 2003; 51: 358-360.
- CONTANT, C.M.E., VAN WERSCH, A.M.E.A., WIGGERS, T., WAI, R.T.J. VAN GEEL, A.N. Motivations, satisfaction, and information of immediate breast reconstruction following mastectomy. *Patient Education and Counseling* 2000, 40:201–208.
- DABBAH, R. PORTER, D.A. Microbiology of sterilization Processes. In: AGALLOCO, J., CARLETON, F.J. *Validation of Pharmaceutical Process*, 3rd Edition. New York: Informa Healthcare, 2007.
- DAVEY, K.R. A predictive model for combined temperature and water activity on microbial growth during the growth phase. *Journal of Applied Bacteriology* 1989, 67: 483-488.
- DELGADO, J.F., PEDRAZA, M.J., BLASCO, J.A., ANDRADAS-ARAGONES, E., SÁNCHEZ-MÉNDEZ, J.I., SORDO-MIRALLES, G., REZA, M.M. Satisfaction with and psychological impact of immediate and deferred breast reconstruction. *Annals of Oncology* 2008, 19(8):1430-1434.
- DENYER, S.P., BAIRD, R.M. *Guide to microbiological control in pharmaceuticals and medical devices*. Boca Raton: CRC Press, 2007.
- DEWHURST, E.L., HOXEY, E.V. Sterilization Methods. In: DENYER, S.P., BAIRD, R.M. *Guide to microbiological control in pharmaceuticals and medical devices*. Boca Raton: CRC Press, 2007.

EASTER, M.C. *Rapid microbiological methods in the pharmaceutical industry*. London: Interpharm/CRC Press, 2003.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Guideline on validation of *Limulus* amoebocyte test as an end-product endotoxin test for human and animal parenteral drugs, biological products, and medical devices. Rockville, 1987.

FOURNIER, E., PASSIRANI, C., MONTERO-MENEI, C.N., BENOIT, J.P. Biocompatibility of implantable synthetic polymeric drug carriers: focus on brain biocompatibility. *Biomaterials*. 2003, 24: 3311-3331.

GEBELEIN, C.G., KOBLITZ, F.F. *Biomedical and Dental Applications of Polymers*. New York: Plenum Press, 1981.

GERSZTEN, P.C. A formal risk assessment of silicone breast implants. *Biomaterials* 1999, 20: 1063-1069.

GÓRNY, R.L., DOUWES, J., VERSLOOT, P. HEEDERIK, D., DUTKIEWICZ, J. Application of the classic *Limulus* Test and the Quantitative Kinetic Chromogenic LAL Method for evaluation of endotoxin concentration in indoor air. *Ann. Agric. Environ. Med.* 1999, 6: 45–51.

GRECO, R.S., PRINZ, F.B., SMITH, R.L. *Nanoscale Technology in Biological Systems*. Londres: CRC Press, 2005.

GUIDOIN, R.G., AWAD, J.A., GABRA, G. *Les silicones: revue des processus de préparation et de vulcanisation*. *Vie Med. Can. Fr.*, Montreal, v.2, p.310-317, 1973.

HALLS, N.A. *Achieving Sterility in Medical and Pharmaceutical Products*. New York: Marcel Dekker, Inc., 1994.

HANDEL, N., CORDRAY, T., GUTIERREZ, J. JENSEN, J.A. A Long-Term Study of Outcomes, Complications, and Patient Satisfaction with Breast Implants. *Plastic and Reconstructive Surgery* 2006, 117(3): 757-767.

- HARGREAVES, P. Good Manufacturing Practice in the Control of Contamination. In: DENYER, S.P., BAIRD, R.M. *Guide to microbiological control in pharmaceuticals and medical devices*. Boca Raton: CRC Press, 2007.
- HÉDEN, P., NAVA, M.B., VAN TETERING, J.P.B., MAGALON, G. FOURIE, L.R., BRENNER, R.J., LINDSEY, L.E., MURPHY, D.K., WALKER, P.S. Prevalence of Rupture in Inamed Silicone Breast Implants. *Plast. Reconstr. Surg.* 2006, 118:303-308.
- HELMUS, M.N., TWEDEN, K. *Materials Selection*, In: Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering, Part A, vol 1, 1995, 27-59.
- HENCH, L.L., ERTHRIDGE, E.C. *Biomaterials – An Interfacial Approach*, Vol.4, A. Noordergraaf, Ed. New York: Academic Press, 1982.
- INSTITUTO NACIONAL DA FARMÁCIA E DO MEDICAMENTO / MINISTÉRIO DA SAÚDE – INFARMED. *Implantes Mamários*. Lisboa: INFARMED, 2004.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. *ISO 14607: Implants–specific requirements for mammary implants*. Geneva: ISO, 2002.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. *ISO 10993-7: Biological evaluation of medical devices — Part 7: Ethylene oxide sterilization residuals*. Geneva: ISO, 2008.
- IWUAGWU, F. C., FRAME, J. D. Silicone breast implants: complications. *British Journal of Plastic Surgery* 1997; 50: 632-636.
- JACOBS, G.P. Validation of the Radiation Sterilization of Pharmaceuticals. In: AGALLOCO, J., CARLETON, F.J. *Validation of Pharmaceutical Process*, 3rd Edition. New York: Informa Healthcare, 2007.
- KERELUK, K., GAUGHRAN, E.R.L. *Sterilization of Medical Products*. New Jersey: Johnson & Johnson, 1977. p. 31-66.
- KIPPING, F.S. Organic derivate of silicon. Preparation of alkylsilicon chlorides. *Proc. Chem. Soc.* 1904, 20:15.

- LENOVICH, M. Survival and death of microorganisms as influenced by water activity. In ROCKLAND, L.B., BEUCHAT, L.R. *Water Activity: Theory and Applications to Food*. New York: Marcel Dekker, 1987. pp. 119-136.
- LUCAS, A.D., MERRITT, K., HITCHINS, V.M.; WOODS, T.O.; McNAMEE, S.G. LYLE, D.B., BROWN, S.A. Residual ethylene oxide in medical devices and device material. *J. Biomed. Mater. Res.* 2003; 66B: 548-552.
- McLAUGHLIN, J.K., LIPWORTH, L., MURPHY, D.K, WALKER, P.S. The Safety of Silicone Gel-Filled Breast Implants: A Review of the Epidemiologic Evidence. *Ann Plast Surg* 2007, 59:569-580.
- NOGAROTO, S.L., PENHA, T.C.V. *Desinfecção e Esterilização*. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo, 2006.
- NOLL, W. *Chemistry and Technology of Silicones*. New York: Academic Press, 1968.
- NOONE, R.B. A Review of the Possible Health Implications of Silicone Breast Implants. *Cancer* 1997, 79:1747-56.
- PAJKOS, A.B., DEVA, A.K., VICKERY, K., COPE, C., CHANG, L., COSSART, Y. Detection of Subclinical Infection in Significant Breast Implant Capsules. *Plastic and Reconstructive Surgery* 2003, 111(5): 1605-1611.
- PALSULE, A.S., CLARSON, S.J., WIDENHOUSE, C.W. Gamma Irradiation of Silicones. *J. Inorg. Organomet. Polym.* 2008, 18:207-221.
- PARK, J.B., LAKES, R.S. *Biomaterials: an introduction*. 3rd. ed. New York: Springer, 2007.
- PAULSON, D.S. *Calculating D-Values for Steam Sterilization Processes*. Medical Device & Diagnostic Industry. 1995, 17(5): 198-204.

- PEDERSEN, M.R., HANSEN, E.W. Inactivation of B. Subtilis Spores and E. Coli Endotoxin by Ethylene Oxide. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*. 1989, 14(5): 373-380.
- PETERS, W. The evolution of breast implants. *Can. J. Plast. Surg.* 2002, 10(5): 223-236.
- PINTO, T.J.A., KANEKO, T.M., OHARA, M.T. *Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos*. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo, 2003.
- PINTO, T.J.A. *Aspectos Fundamentais na Validação do Monitor Biológico para a Esterilização por Óxido de Etileno*. São Paulo, 1991. (Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo)
- PITTET, B., MONTANDON, D., PITTET, D. Infection in breast implants. *The Lancet Infectious Diseases* 2005; 5(2): 94-106.
- RATNER, B.D., HOFFMAN, A.S., SCHOEN, F.J., LEMONS, J.E., *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. 2. ed. Boston: Elsevier, 2004.
- RIMONDINI, L., FINI, M., GIARDINO, R. The microbial infection of biomaterials: A challenge for clinicians and reserachers. A short review. *Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics* 2005, 3(1): 1-10.
- ROBERTSON, J.H., GLEASON, D., TSUJI, K. Dry-Heat Destruction of Lipopolysaccharide: Design and Construction of Dry-Heat Destruction Apparatus. *Appl. Envirom. Microbiol.* 1978, 36(5): 705-709.
- ROGERO, S.O., MALMONGE, S.M., LUGÃO, A.B., IKEDA, T.I., MIYAMARU, L., CRUZ, A.S. Biocompatibility Study of Polymeric Biomaterials. *Artificial Organs*. 2003, 27(5): 424-427.
- ROGERS, W. *Sterilisation of Polymer Healthcare Products*. Shrewsbury: Rapra Technology Limited, 2005.

- RUSSELL, A.D., HUGO, W.B., AYLIFFE, G.A.J. *Principles and Practice of Desinfection, Preservation and Sterilisation*. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1982.
- SCHAIN, W.S. Breast Reconstruction: Update of Psychosocial and Pragmatic Concerns. *Cancer* 1991, 68 (S5): 1170-1175.
- SHIRTZ, J. F, D, and z Values. In: AGALLOCO, J., CARLETON, F.J. *Validation of Pharmaceutical Process*, 3rd Edition. New York: Informa Healthcare, 2007.
- SILVA, R.A.B. da, LEONARDO, M.R., FACCIOLI, L.H., MEDEIROS, A.I., FILHO, P.N. *Effect of Different Methods of Sterilization on the Inactivation of Bacterial Endotoxin (LPS) in Endodontic Files*. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2007, 38: 270-272.
- SWARBRICK, J. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. Vol. 4, 3rd. ed. New York: Informa Heathcare, 2007.
- VIRDEN, C.P., DOBKE, M.K., STEIN, P., PARSONS, C.L. FRANK, D.H. Subclinical infection of the silicone breast implant surface as a possible cause of capsular contracture. *Aesthetic Plastic Surgery* 1992, 16(2): 173-179.
- UNITED States Pharmacopeia. 31.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2008.
- WILLIAMS, D.F. *Definition in biomaterials*. In: *Progress in Biomedical Engineering*. Amsterdam: Elsevier, 1987. p. 67
- WILLIAMS, D.F. *Biocompatibility od Clinical Implant Materials. Vol III*. Florida: CRC Press, 2000.
- WILLIAMS, D.F. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* 2008, 29:2941-2953.
- WILLIAMS, K.L. *Endotoxins: Pyrogens, LAL Testing and Depyrogenation*. 3rd Ed. New York: CRC Press, 2007.

WNEK, G.E., BOWLIN, G.L. *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*, Vol. 2, 2nd Ed. New York: Informa Healthcare, 2008.

WONG, J.Y., BRONZINO, J.D. *Biomaterials*. Boca Raton: CRC Press, 2007.

WOO, L., LING, M.T.K., DING, S.Y., WESTPHAL, S.P. Effect of ionizing radiation on the thermal oxidative stability of medical polymers. *Thermochimica Acta* 1998, 324:179-185.

ZHANG, Y.-Z., BJURSTEN, L.M., FREIJ-LARSSON, C., KOBER, M., WESSLÉN, B. Tissue response to commercial silicone and polyurethane elastomers after different sterilization procedures. *Biomaterials* 1996, 17: 2265-2272.

