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

**Segurança Biológica de Implantes Mamários de Silicone:
inter-relação entre processos esterilizantes e biocompatibilidade**

Janice Campos de Azevedo

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Profa. Titular Terezinha de Jesus Andreoli Pinto

São Paulo
2004

Janice Campos de Azevedo

**Segurança Biológica de Implantes Mamários de Silicone:
inter-relação entre processos esterilizantes e biocompatibilidade**

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Titular Terezinha de Jesus Andreoli Pinto
Orientador/ Presidente

Dra. Áurea Silveira Cruz

Profa. Dra. Célia Hitomi Yamamoto

Prof. Titular Alberto Augusto Gonçalves de Freitas Castro Ribeiro

Profa. Titular Elza Helena Guimarães Lara

São Paulo, 25 de março de 2004.

*A Deus,
por dar sentido à minha existência*

*À minha amada família,
pelo apoio incondicional*

*À Profa Terezinha,
pela compreensão e
dedicada orientação*

Agradecimentos

À Doutora Áurea Silveira Cruz, chefe da Seção de Culturas Celulares do Instituto Adolfo Lutz, pela amizade e valiosa colaboração na execução deste trabalho.

À Rosa, Satiko e Luis Henrique, pela amizade, apoio e incentivo.

Ao Prof. Marcelo Guimarães, pela amizade e preciosa colaboração.

Aos analistas do CONFAR, Cleide, Felipe, Gláucia e Sueli pela colaboração durante estes anos de convívio.

À Bete, Elaine e Jorge pela paciência e atenção.

À empresa SILIMED – Silicone e Instrumental Médico Hospitalar, na pessoa no Sr. Antoine Robert, pelo fornecimento dos implantes mamários de silicone.

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

A todos que colaboraram para que eu concluísse mais esta etapa.

RESUMO

Os implantes mamários de silicone têm sido empregados, tanto nas cirurgias de aumento das mamas, quanto na reconstrução do tecido mamário após mastectomia. A segurança biológica dos implantes de silicone merece estudo relacionado aos processos de esterilização empregados, pois podem constituir-se em fator de comprometimento da estrutura química do polímero e, conseqüentemente, da biocompatibilidade. Este estudo consistiu na avaliação da biocompatibilidade de implantes mamários de silicone após terem sido submetidos aos processos de esterilização por calor seco, radiação gama e óxido de etileno. O parâmetro avaliado foi a viabilidade celular, empregando o método de difusão em agar e de captura do vermelho neutro. As amostras compreenderam implantes de silicone gel lisos, texturizados e revestidos com poliuretano e implantes texturizados pré-cheios com solução salina. Também foi realizado o teste de endotoxinas bacterianas pelo método do LAL e determinação da taxa de migração do gel de silicone (teste de *bleed*). Os três métodos de esterilização mostraram-se igualmente eficientes pela comprovação da condição de esterilidade dos implantes através de metodologia descrita na Farmacopéia Americana 27 edição. Os níveis de endotoxinas bacterianas dos implantes, também atenderam aos requisitos dos compêndios oficiais. Na avaliação da biocompatibilidade todos os implantes, independente dos processos de esterilização utilizados, apresentaram ausência de citotoxicidade. Os resultados do teste de *bleed* mostraram uma maior taxa de migração de gel para os implantes de superfície lisa em comparação com os implantes de superfície texturizada e revestida com poliuretano, quando esterilizados por calor seco. Ao comparar a taxa de migração do gel para os implantes de superfície lisa esterilizados por calor seco e óxido de etileno, obteve-se uma maior taxa de migração para aqueles implantes esterilizados por óxido de etileno. As diferentes avaliações realizadas neste estudo abrangeram aspectos biológicos, químicos e físicos relevantes para garantir um produto de boa qualidade e que, por assegurar a manutenção da característica de biocompatibilidade, resulta na segurança biológica deste tipo de implante.

ABSTRACT

Silicone breast implants have been widely used for mammary augmentation and reconstruction surgery. Biological safety of these implants can be damaged by sterilization methods. This study consisted of the biocompatibility assessment of breast implants through cell viability, employing the agar diffusion test and neutral red uptake. Four silicone breast implants were tested: smooth, textured, polyurethane covered silicone gel breast implant and textured saline-filled breast implant. Sterilization methods comprised dry-heat, ethylene oxide and γ -radiation. Detection of bacterial endotoxins employing LAL test and gel bleed was also performed. The three methods of sterilization revealed equally efficacious, through the sterility confirmation of implants employing methodology described in 27th edition of United States Pharmacopeia. At the same way the levels of bacterial endotoxins of implants accorded with the pharmacopeial requirements. In the evaluation of biocompatibility all the implants, independently of the sterilization process used, showed no cytotoxicity signals. The results of gel bleed revealed a higher migration rate from the smooth implants in comparison with the textured and polyurethane-covered implants sterilized by dry-heat. When was compared the gel migration of smooth implants sterilized by dry-heat and ethylene oxide, was obtained a higher rate of gel bleed of those implants sterilized by ethylene oxide. The different evaluations performed in this study comprised biological, chemical and physical aspects, that are relevant to assure a good quality product and by having maintained the characteristics of biocompatibility, resulted in the biological safety on this kind of implant.

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	14
2 - REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 - Biomateriais	17
2.2 - Polímeros	18
2.2.1 - Silicone	18
2.2.1.1 - Tipos de Silicones	20
2.3 - Implantes de Contorno	22
2.3.1 - Implantes Mamários	22
2.3.2 - Contratura Capsular	24
2.4 - Processos de Esterilização	29
2.4.1 - Calor Seco	31
2.4.2 - Óxido de Etileno	32
2.4.3 - Radiações Ionizantes	33
2.5 - Biocompatibilidade	34
2.6 - Endotoxinas Bacterianas	38
2.7 - Migração do Gel de Silicone (<i>Silicone Gel Bleed</i>)	39
3 - OBJETIVOS	42
4 - MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1 - Materiais	43
4.2 - Métodos	46
4.2.1 - Métodos Microbiológicos	46
4.2.1.1 - Padronização do Inóculo	47
4.2.1.2 - Determinação dos Percentuais de Recuperação da Carga Microbiana dos Implantes	48
4.2.1.3 - Determinação da Biocarga dos Implantes	52
4.2.1.4 - Identificação dos Microrganismos constituintes da Biocarga dos Implantes	53
4.2.1.5 - Verificação da Eficácia dos Processos Esterilizantes	54

4.2.2 - Métodos Biológicos.....	61
4.2.2.1 - Avaliação da Citotoxicidade <i>in vitro</i>	61
4.2.2.2 - Detecção de Endotoxinas Bacterianas.....	65
4.2.3 - Teste de <i>Bleed</i>	67
5 - Resultados	69
5.1 - Métodos Microbiológicos	69
5.1.1 - Percentuais de Recuperação.....	69
5.1.2 - Biocarga dos Implantes	72
5.2 - Métodos Biológicos	78
5.2.1 - Citotoxicidade <i>in vitro</i>	78
5.2.2 - Endotoxinas Bacterianas	83
5.3 - Método Físico.....	83
5.3.1 – Teste de <i>Bleed</i>	83
6 - DISCUSSÃO	86
7 - CONCLUSÕES	97
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASTM	American Society for Testing Materials
ATCC	American Type Culture Collection
ATV	Associação Tripsina 0,20% e Versene 0,02%
FB	Farmacopéia Brasileira
FDA	Food and Drug Administration
IC ₅₀	Índice de Citotoxicidade 50%
ISO	International Organization for Standardization
IZ	Índice de Zona
LAL	Limulus Amebocyte Lysate
MEM	Meio mínimo de Eagle
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol 2-il) – 2,5 difeniltetrazólio
NCTC clone 929	Cultura de células de tecido conjuntivo de camundongo
SAL	Sterility Assurance Level (Nível de Segurança de Esterilidade)
SDR	Standard Distribution Resistences (Distribuição Padrão de Resistências)
SFB	Soro Fetal Bovino
UFC	Unidade Formadora de Colônia

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Redução da sílica a silício elementar	19
Figura 02	Obtenção do dimetildiclorosilano.....	19
Figura 03	Formação do silanol	19
Figura 04	Obtenção das pontes de siloxano	20
Figura 05	Implante de silicone em acondicionamento semi-final	43
Figura 06	Implante de silicone de gel com superfície lisa e corte do implante mostrando o silicone gel.....	44
Figura 07	Implante de silicone gel com superfície texturizada e corte do implante mostrando o silicone gel	44
Figura 08	Implante de silicone gel com superfície revestida com poliuretano e corte do implante mostrando o silicone gel	45
Figura 09	Implante de silicone com superfície texturizada pré-cheio solução salina	45
Figura 10	Teste de <i>bleed</i> : deposição dos implantes de silicone gel de superfície lisa e implantes de silicone com superfície revestida com poliuretano sobre os discos de silicone.....	68
Figura 11	Teste de citotoxicidade por difusão em agar, placas com controle negativo e controle positivo	78
Figura 12	Teste de citotoxicidade por difusão em agar, placas com amostras de implantes de silicone gel e pré-cheio com solução salina, mostrando ausência de citotoxicidade	79

Figura 13	Células NCTC clone 929 coradas pelo vermelho neutro. Fotomicrografia (100x)	80
Figura 14	Teste de citotoxicidade por difusão em agar, zona limítrofe do halo de contraste, células NCTC clone 929. Fotomicrografia (100x)	80
Figura 15	Método de captura do vermelho neutro, implantes de silicone gel com superfície lisa e texturizada esterilizados por calor seco	81
Figura 16	Método de captura do vermelho neutro: implantes de silicone gel com superfície lisa, texturiza e revestida com poliuretano esterilizados por óxido de etileno	81
Figura 17	Método de captura do vermelho neutro: implantes de silicone pré-cheios com solução salina esterilizados por radiação gama	82
Figura 18	Teste de citotoxicidade pelo método de captura do vermelho neutro: placas com 96 poços	82
Figura 19	Teste de <i>bleed</i> : médias e desvios padrão da massa de gel difundida, a cada semana, dos implantes esterilizados por calor seco	85
Figura 20	Teste de <i>bleed</i> : médias e desvios padrão da massa de gel difundida, a cada semana, dos implantes de superfície lisa esterilizados por calor seco e óxido de etileno	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Percentual médio de recuperação da contagem microbiana obtido para os invólucros dos implantes de silicone gel com superfície lisa	69
Tabela 02	Percentual médio de recuperação da contagem microbiana obtido para os invólucros dos implantes de silicone gel com superfície texturizada	69
Tabela 03	Percentual médio de recuperação da contagem microbiana obtido para os invólucros dos implantes de silicone gel com superfície revestida com poliuretano.....	70
Tabela 04	Percentual médio de recuperação da contagem microbiana obtido para as embalagens primárias de policarbonato (blíster)	70
Tabela 05	Percentual médio de recuperação da contagem microbiana do líquido de enchimento obtido para os implantes de silicone pré-cheios com solução salina.....	71
Tabela 06	Percentual médio de recuperação da contagem microbiana da embalagem primária de filme plástico obtido para os implantes de silicone pré-cheios com solução salina.....	71
Tabela 07	Valores da biocarga dos implantes de silicone gel com superfície lisa....	72
Tabela 08	Valores da biocarga dos implantes de silicone gel com superfície texturizada	73
Tabela 09	Valores da biocarga dos implantes de silicone gel com superfície revestida com poliuretano.....	74
Tabela 10	Valores da biocarga dos implantes de silicone pré-cheios com solução salina.....	75

Tabela 11	Determinação da carga microbiana total dos implantes de silicone pré-cheios com solução salina	76
Tabela 12	Identificação dos microrganismos isolados constituintes da biocarga dos implantes não estéreis	76
Tabela 13	Tubos com crescimento microbiano no teste de esterilidade para os implantes de silicone gel submetidos à esterilização por calor seco e óxido de etileno.....	77
Tabela 14	Tubos com crescimento microbiano no teste de esterilidade para os implantes submetidos à esterilização por radiação gama	77
Tabela 15	Valores da massa de gel (mg/cm ² /semana) difundida através do invólucro de silicone para implantes de silicone gel esterilizados por calor seco	83
Tabela 16	Valores da massa de gel (mg/cm ² /semana) difundida através do invólucro de silicone para implantes de silicone gel com superfície lisa esterilizados por calor seco e óxido de etileno	83

1. Introdução

O silicone tem sido aplicado em uma grande variedade de técnicas médicas, farmacêuticas e cosméticas que incluem, respectivamente, cirurgia plástica estética e reparadora, oftalmologia, reconstrução de tecidos; formulações orais; cremes protetores, protetores capilares e outros. As aplicações médicas na forma de implantes, constituídos total ou parcialmente de silicone exigem desenvolvimento de produtos seguros, obtidos a partir de insumos certificados, processos industriais validados e controlados com atendimento a especificações rígidas.

Por ser resultante da polimerização do dimetilsiloxano, o silicone pode se apresentar, em decorrência do comprimento e ramificações das cadeias básicas do polímero, em diferentes formas físicas, isto é, na forma fluida, gel, elastomérica. Quando do uso de implantes em qualquer das formas poliméricas em que o silicone se apresenta, seu uso deve ser precedido da constatação da biocompatibilidade deste material, incluindo provas documentais que podem ser derivadas de estudos pré-clínicos, clínicos ou de histórico de uso, assim como, através de estudos laboratoriais.

A mama é um dos inúmeros tecidos e estruturas que podem ser substituídos por próteses de silicone, em cirurgias de aumento ou reconstrução mamária após mastectomia, sendo sua utilização cercada de grande controvérsia quanto à indução de efeitos adversos.

Visando o estabelecimento de normas e conseqüente orientação de produtores e consumidores, órgãos reguladores, com o envolvimento de universidades, institutos de pesquisa e produtores elaboram e publicam normas nacionais e internacionais que estabelecem condições para a obtenção de próteses seguras quanto aos aspectos físico, químico e biológico.

O atendimento, por parte de produtores éticos e idôneos, ao preconizado por estas normas, permite a obtenção de produtos que compatibilizando materiais, processos de moldagem e processos esterilizantes, podem proporcionar aos cirurgiões plásticos a escolha do implante que melhor atenda às necessidades de cada paciente. Particularmente o processo esterilizante, na dependência de sua natureza, pode constituir-se em fator de comprometimento da estrutura química do polímero, podendo influenciar na característica de biocompatibilidade.

Dentre os métodos tradicionais de esterilização para os referidos materiais tem-se no processo térmico, o emprego do calor seco que faz uso de altas temperaturas. Embora se constitua em processo bastante utilizado pode promover a hidrólise e/ou fusão da matriz do polímero, comprometendo as características do produto. Esta característica induz a adaptações, como o emprego de temperaturas menos agressivas.

A esterilização físico-química gasosa por óxido de etileno oferece a vantagem de um tratamento efetivo a temperaturas relativamente baixas, sendo útil na esterilização de polímeros termoinstáveis. Em contrapartida, resíduos do gás, por serem agentes alquilantes, podem reagir com grupos funcionais da superfície do polímero, conduzindo a alterações das suas propriedades.

A radiação, como processo esterilizante apresenta como vantagem a alta eficiência, sendo um processo físico que emprega radiações de alta energia, emitidas por radioisótopos como ^{60}Co . Em virtude de seu grande poder de penetração é atraente para uso na esterilização de materiais consideravelmente volumosos ou espessos. Contudo, a irradiação de polímeros, devido à formação de radicais livres e ligações subseqüentes, podem levar à degradação e posterior comprometimento da biocompatibilidade do produto.

Em função da agressividade variável dos processos mencionados, idealizou-se situação de estudo para avaliar o comprometimento da segurança

biológica dos implantes de silicone após a esterilização, abrangendo avaliações quanto à citotoxicidade, esterilidade, ausência de endotoxinas bacterianas.

A avaliação da biocompatibilidade foi precedida da determinação qualitativa e quantitativa da biocarga dos implantes e também da confirmação da condição de esterilidade dos mesmos. Foram empregados implantes de silicone constituídos de diferentes materiais e com diferentes características de superfície.

A técnica de cultura celular, por permitir a avaliação *in vitro* da citotoxicidade de diferentes materiais foi empregada para avaliação da biocompatibilidade das amostras. Foi utilizada metodologia analítica descrita em normas internacionais e que apresenta como vantagens: a sensibilidade, facilidade de execução, reprodutibilidade, baixo custo. Além destas vantagens, esta metodologia, juntamente com o método *in vitro* empregado para a detecção de endotoxinas bacterianas também propiciou atendimento ao conceito dos 3Rs (Refinement, Reduction, Replacement), uma vez que se evitou o uso de animais de experimentação.

As diferentes características dos materiais de constituição ou tratamentos de superfície empregados na obtenção dos implantes constituem-se em fatores que podem comprometer a biocompatibilidade dos mesmos durante seu uso clínico, pois podem permitir a migração do gel de silicone para os tecidos circunvizinhos, promovendo o aparecimento de diferentes graus de contratura capsular. Este aspecto foi avaliado através do teste de *Bleed*, o qual permite dimensionar comparativamente as eventuais perdas de conteúdo interno (gel de silicone), para os diferentes tipos de implantes.

2. Revisão da Literatura

2.1 Biomateriais

Os tecidos e órgãos do corpo humano estão sujeitos às doenças e injúrias que, se não tratadas, podem levar à dor, perda da função, restrição dos movimentos podendo acarretar, inclusive, incapacidade. 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 (WILLIAMS, 1985).

O termo biomaterial refere-se a um material natural ou sintético destinado a interagir com sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar ou substituir um órgão, tecido ou função do organismo (WILLIAMS, 1999). Dentre os diferentes biomateriais encontram-se os metais, compósitos, as cerâmicas, vidros e polímeros.

Os biomateriais metálicos compreendem os metais e suas ligas como aço inoxidável, liga de titânio, liga de cobalto-cromo. Estes materiais possuem uma alta força tensil, como também uma alta resistência ao desgaste, sendo empregados em fixação ortopédica e implantes dentários. Os compósitos são compostos constituídos de dois ou mais materiais, caracterizando-se por apresentar propriedades diferentes dos materiais isolados. Alguns exemplos de compósitos são as fibras de carbono-resina termofixa, fosfato de cálcio-colágeno, que apresentam como vantagem a inércia, resistência à corrosão e alta força de tensão, encontrando aplicação na confecção de válvulas cardíacas e implantes de juntas de joelho. As cerâmicas e vidros abrangem a alumina, zircônia, fosfato de cálcio, porcelana e vidros bioativos. Possuem alta resistência à corrosão e à compressão, sendo empregados na substituição de ossos, juntas, dentes, válvulas e tendões (KAWACHI *et al.*, 2000).

A definição da natureza do biomaterial para cada aplicação, depende do tecido, órgão ou função a serem substituídos. Assim, enquanto os materiais mais rígidos com metais são bastante utilizados na substituição de tecidos de sustentação como ossos, alguns materiais poliméricos, como o silicone, são empregados na substituição de tecidos moles (GEBELEIN; KOBLITZ, 1981).

2.2 Polímeros

Um polímero é um material de alto peso molecular obtido pela repetição de uma unidade simples – o monômero. Em algumas situações a repetição é linear, podendo ainda, as cadeias estarem interligadas para formar uma rede tridimensional. Polímeros naturais incluem borracha natural, polissacarídeos, celulose, seda e proteínas. Dentre os polímeros sintéticos têm-se polietileno, poliestireno, policloreto de vinila, poliéster, politetrafluoretileno, policarbonatos, silicone e poliuretanos (LELAH; COOPER, 1986).

Os materiais poliméricos encontram larga aplicação na regeneração da pele, cartilagens, ossos, vasos, nervos e fígado, tendo também grande importância na reconstrução de tecidos, como, por exemplo, o emprego de cimento ósseo de polimetilmetacrilato, suturas degradáveis de ácido poliglicólico, material odontológico de polivinilsiloxano, polihidroxietilmetacrilato empregado na fabricação de lentes de contato gelatinosas, polietileno de ultra alta densidade empregado como biomaterial ortopédico em próteses de joelho, silicone empregado como substituinte de tecidos moles e cartilagens. Estes materiais ao serem empregados devem ser biocompatíveis, suportar a adesão, crescimento e diferenciação celular (SEAL; OTERO; PANITH, 2001).

2.2.1 Silicone

É o nome genérico das substâncias equivalentes aos compostos orgânicos, nos quais o silício substitui o carbono. 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. Os silicones têm uma estrutura química baseada em unidades alternadas de silício e oxigênio.

A primeira etapa de produção do silicone, mostrada na figura 1, é a redução da sílica a silício elementar (GUIDOIN; AWAD; GABRA, 1973):

Figura 1 – Redução da sílica a silício elementar

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

Figura 2 – Obtenção do dimetildiclorosilano

Através de hidrólise o dimetildiclorosilano é convertido em um composto instável, o silanol (Figura 3):

Figura 3 – Formação do silanol

O silanol formado é instável e reage imediatamente com outras moléculas de silanol, formando as pontes de siloxano (Si – O – Si), mostradas na Figura 4:

Figura 4 – Obtenção das pontes de siloxano

Este processo de hidrólise produz polímeros de cadeia curta, cujos comprimentos podem ser aumentados para atingir o peso molecular adequado. A policondensação de pré-polímeros é realizada através de catalisadores e, dependendo do processo utilizado, pode dar origem a óleos, gomas e resinas.

Após este processo inicia-se a preparação de misturas químicas para permitir que o produto adquira as propriedades e texturas desejáveis, e por fim, o processamento final (p.ex. cura, secagem), que ocorre quando o produto é aplicado ou processado .

2.2.1.1 Tipos de Silicones

O silicone pode se apresentar, em decorrência do comprimento e ramificações da cadeia, nas formas fluida, de gel e elastomérica. Os silicones fluidos (óleos) possuem estrutura básica formada de cadeias lineares ou ligeiramente ramificadas de pesos moleculares e tamanhos variados. Seu grau de policondensação, ou seja o número médio de grupos siloxano na cadeia pode variar de algumas unidades a milhares delas. As cadeias formam espirais que

deslizam e se deslocam umas sobre as outras, o que resulta no estado fluido. A substituição de alguns grupos metil por grupos fenil (inertes) ou grupos vinil ou amino (reativos) permite a obtenção de óleos com características específicas, como por exemplo, resistência à temperatura, compatibilidade com solventes orgânicos (SILICONE, 2001).

O silicone gel é constituído de uma rede tridimensional de cadeias de polisiloxano, preenchida com silicone fluido para produzir massa coesa. O silicone fluido não está quimicamente ligado à rede tridimensional, mas retido fisicamente, característica que permite a migração do fluido. O grau de ligações cruzadas e a quantidade de fluido afeta as propriedades físicas do gel e a sua taxa de migração - *gel bleed* (STURROCK *et al.*, 1998).

Os elastômeros de silicone são formados a partir de macromoléculas lineares de altíssimo peso molecular, contendo vários grupos reativos. As mais freqüentemente utilizadas são as parcialmente feniladas, que conferem a característica de manutenção da forma elastomérica a baixas temperaturas ou perfluoradas contendo grupos vinílicos. A presença de grupos vinílicos diminui o tempo de cura do elastômero. Os principais mecanismos de cura do polímero são realizados empregando peróxidos ou catalisadores de platina, sendo a força de tensão e resistência a ruptura aumentadas pela adição de sílica à rede do polímero (SCHWARTZ E GOODMAN, 1982).

Heiner, Stenberg e Person (2003) realizaram estudo onde, após a cura do elastômero empregando o dicumil peróxido e catalisadores de platina, os materiais obtidos foram submetidos a esterilizações sucessivas, verificando-se um aumento da dureza das amostras vulcanizadas empregando o dicumil peróxido, sendo recomendada a utilização de catalisadores de platina, principalmente, para cura de elastômeros que serão esterilizados repetidas vezes.

2.3 Implantes de Contorno

Torna-se difícil interpretar a relação saúde, estética e bem-estar, pois esta interpretação envolve, além de aspectos técnicos-científicos, questões sócio-econômicas, étnicas, religiosas, culturais, os níveis de intensidade ou graus de deformidade ou deficiência, bem como a maturidade do paciente.

Embora muitas vezes a motivação, por razões estéticas, para o desenvolvimento dos implantes de contorno nas suas diferentes aplicações (glúteos, mento, panturrilha, testículos, queixo, mamários, entre outros), possa ser considerada menos nobre, o mesmo não acontece quando da ocorrência de acidentes e patologias seguidas de perda ou remoção extensa de tecidos. Quer seja por razões estéticas ou visando a funcionalidade, a pesquisa na área dos biomateriais visa promover a qualidade de vida do indivíduo, buscando-se a melhoria destes materiais para que possam substituir, a contento, as funções dos tecidos (BELLAMY et al., 2003).

Alguns dos fatores abordados acima são exemplificados ao relatar-se o estudo realizado por Contant *et al.* (2000), onde foram avaliadas as motivações de 103 mulheres mastectomizadas, submetidas à imediata reconstrução mamária empregando implantes de silicone. As pacientes indicaram que questões como o desconforto do uso de próteses externas, a necessidade de recuperar a auto-estima e a função sexual foram as principais razões para a escolha da reconstrução mamária, sendo que 70% das pacientes mostraram-se satisfeitas com os resultados obtidos.

2.3.1 Implantes Mamários

A importância do perfil mamário para o bem estar da mulher é um aspecto fundamental da psique feminina, pois a glândula mamária é símbolo tanto da sexualidade como da maternidade. Com o objetivo de proporcionar um volume e

contorno mamários que se aproximem da normalidade, muitos métodos foram concebidos para aumentar, corrigir ou reconstruir o perfil mamário (EDGERTON; McCLARY, 1958).

Converse e Littler (1964) relataram o procedimento realizado por Gersuny em 1889, onde este introduziu a técnica de injeção de parafina no parênquima mamário, com vistas à reconstrução do tecido. Desde então os mais diferentes materiais têm sido utilizados, como próteses de marfim, enxertos dermogordurosos, esponjas de diferentes composições, o silicone líquido ou gel, ou mesmo os recipientes de silicone elastomérico inflados com diferentes líquidos (PITANGUY *et al.*, 1991).

Em 1962, Cronin e Gerow introduziram a prótese de silicone gel com superfície lisa. Estes implantes foram largamente adotados para aumento e reconstrução de mamas. Na medida em que os resultados obtidos foram melhor avaliados e relatadas as complicações inerentes àquela prótese, como contratura capsular e alterações de forma e consistência, novas próteses foram elaboradas.

Um novo modelo de prótese de silicone foi apresentado em 1965 (ARION, 1965), sendo disponível ainda hoje. Este implante consiste de um invólucro de silicone elastomérico que, após a implantação, pode ser inflado com solução salina ou óleos vegetais. Apresenta como vantagem uma menor incidência de contratura capsular podendo, porém, ocorrer um esvaziamento do implante conforme relatado por Rheingold, Yoo e Courtiss (1994). Neste estudo, foram avaliados 326 implantes inflados com solução salina, sendo que 20 unidades apresentaram esvaziamento após a implantação.

Ainda avaliando a ocorrência de esvaziamento dos implantes cheios com solução salina, Soubirac *et al.* (2002) realizaram estudo onde acompanharam 650 pacientes por período de 5 anos, observando uma taxa de esvaziamento de 15% do total de implantes. Os autores sugerem que os implantes com silicone gel sejam adotados no mercado francês, por não apresentarem esta desvantagem.

Na década de 70 foi desenvolvida uma prótese de silicone gel revestida com espuma de poliuretano, que também evidenciou uma menor incidência de contratura capsular (ASHLEY, 1972).

Trabalhos experimentais de Smahel (1978) e Brand (1984), empregando implantes mamários revestidos com espuma de poliuretano, demonstraram que este revestimento promove uma intensa reação antígeno-anticorpo, caracterizada pela mobilização de macrófagos e células gigantes multinucleadas. O poliuretano sofre microfragmentações e fagocitose. Os fragmentos maiores são circundados pelos macrófagos e células gigantes e mais tarde substituídos pelos fibroblastos e colágeno. A fibrose desenvolve-se lentamente devido ao microencapsulamento dos fragmentos de poliuretano originando um tecido fibrótico, cujas forças de contração encontram-se desunidas e invertidas em numerosas microcápsulas. Estes resultados experimentais podem explicar a ausência de contratura capsular ao redor deste modelo de prótese.

A partir de 1988 começou-se a utilizar, também, o implante de silicone gel com superfície texturizada com pequenos poros de diâmetros variando de 30 a 800 μm . Este tipo de implante apresentou um menor índice de contratura capsular quando comparado com o implante de silicone gel com superfície lisa (HAKELIUS; OHLSEN, 1992; FAGRELL; BERGGREN; TARPILA, 2001).

2.3.2 Contratura Capsular

O implante de qualquer material estranho ao organismo promove algum grau de reação dos tecidos, com o inevitável aparecimento de uma cápsula ou membrana circundante ao implante. A severidade desta reação resulta de dois fatores: o grau de inércia do material implantado e a resposta particular de cada organismo. A contratura capsular resulta da constrição da cápsula fibrosa que se forma em volta da prótese mamária e caracteriza-se, microscopicamente, como uma reação típica a corpo estranho. Os seus componentes básicos são migração

de fibroblastos, fibras colágenas, granulomas de células gigantes (CAIRNS; DE VILLIERS, 1980).

Uma classificação clínica da contratura capsular foi estabelecida por Baker (1979), que caracteriza o grau I como mama normal, não sendo perceptível a mamoplastia. O grau II corresponde a uma contratura mínima, o implante pode ser apalpado mas não é perceptível visivelmente; no grau III a contratura é moderada, porém a paciente já sente alguma rigidez. O Grau IV caracteriza-se por uma contratura severa, perceptível quando da visualização da mama, podendo ser acompanhada de dor e diminuição da temperatura na região.

A migração do silicone gel (*silicone gel bleed*) tem sido apontada como a principal causa da contratura capsular, seguida de infecções clínicas, hematomas, idade da paciente, corpos estranhos como pós lubrificantes das luvas usadas no procedimento cirúrgico e ainda o trauma pós-operatório (BARKER; SCHULTZ, 1980; HAKME, F., 1981; ASPLUND et al., 1996; CHANDLER; KASPER, 2003).

Diversas avaliações clínicas foram realizadas com o objetivo de comparar a contratura capsular promovida pelos implantes de silicone, seja em função da característica da superfície do implante (lisa, texturizada ou revestida com espuma de poliuretano) ou do material utilizado para enchimento (silicone gel, solução salina). Cairns e De Villiers (1980) avaliaram, por nove meses, 43 pacientes que receberam implantes de silicone gel e implantes cheios com solução salina, ambos com superfície lisa. Os resultados encontrados foram, respectivamente, 74,4% e 8,3% de contratura capsular de grau III para os implantes de silicone gel e implantes cheios com solução salina.

Em 1991, Coleman, Foo e Sharpe relataram os resultados obtidos quando da avaliação clínica da contratura capsular empregando implantes de silicone gel de superfície lisa e texturizada. As 50 pacientes foram acompanhadas por 12 meses e apresentaram um menor grau de contratura capsular para os implantes de silicone gel com superfície texturizada. Estudos posteriores, comparando os

mesmos tipos de implantes, ou seja, de superfície lisa e texturizada, também resultaram em uma menor incidência de contratura capsular ao redor dos implantes de silicone com superfície texturizada (HAKELIUS; OLSEN, 1992; ASPLUND et al., 1992; COLLIS et al., 2000).

Ao comparar a contratura capsular promovida por implantes de superfície lisa e texturizada, não mais contendo silicone gel, mas ambos cheios com solução salina, Fagrell, Berggren e Tarpila (2001) observaram não haver diferença significativa na contratura capsular promovida pelos implantes de superfície lisa e texturizada.

Em 1997, Lesesne conduziu estudo onde foram realizadas biópsias em 19 mulheres com grau de contratura capsular I e II, portadoras de implantes texturizados cheios com solução salina. A avaliação histológica da cápsula fibrótica revelou a presença de histiócitos, células gigantes, colágeno e fragmentos de silicone.

Ao realizar a avaliação histológica das cápsulas formadas ao redor de implantes de silicone gel com superfície lisa e texturizada e sua relação com a contratura capsular, Siggelkow *et al.* (2003) concluíram que os achados histológicos diferem em função do tempo de implantação e do tipo de implante (superfície lisa ou texturizada), sendo que os implantes de superfície lisa apresentaram um maior grau de contratura capsular resultante do processo inflamatório e migração de silicone gel.

Além da contratura capsular, outros efeitos adversos foram atribuídos aos implantes de silicone, como as reações imunológicas: produção de anticorpos, geração de linfócitos T e as respostas auto-imunes como artrite reumatóide (YOSHIDA *et al.*, 1995), distúrbios neurológicos e mesmo o câncer (LAMM, 1995). Estes prováveis danos, na maioria das vezes sem comprovação científica criteriosa, deram oportunidade ao surgimento de várias ações legais que quase levaram empresas à falência, além de gerar situação de pânico entre as

portadoras destes implantes, demonstrando a necessidade de estudos científicos criteriosos para a avaliação do silicone (ROSE; POTTER, 1995; PRICE; ROSENBERG, 1998; WARD, 2001).

Em 1997, Tenebaum *et al.* publicaram os resultados de estudo onde concluíram haver relação entre a presença de anticorpos anti-polímeros e a severidade dos sintomas de doenças auto-imunes em pacientes implantadas. Posteriormente Oliver *et al.* (2000) avaliaram 20 mulheres portadoras de implantes, para detecção de anticorpos ao silicone, comparando-as com três grupos controle. Estes grupos constituíram-se de 20 mulheres não portadoras de implantes, 20 mulheres portadoras de doenças auto-imunes e 20 doadores anônimos de ambos os sexos. Não foram encontradas diferenças significativas, dos níveis de anticorpos, entre o grupo de mulheres implantadas e os grupos controle. A inexistência de correlação entre os níveis de anticorpos anti-polímeros e doenças auto-imunes também foi confirmada por De Jong *et al.* (2004), uma vez que os níveis de anticorpos das pacientes implantadas apresentando sintomas de doenças auto-imunes, quando comparados com os do grupo controle de mulheres saudáveis, não apresentaram diferenças significativas.

Quanto à indução de distúrbios neurológicos, Ferguson (1997) relata após avaliação de diversos estudos epidemiológicos, a impossibilidade de se atribuir aos implantes de silicone tal característica, pois a maioria dos estudos careceram de comparação com grupos de indivíduos controle.

McLaughlin (2003), questiona a forma de condução de estudos para avaliação da maior incidência de casos de suicídio entre mulheres portadoras de implantes de silicone, sugerindo que além de variáveis demográficas (situação conjugal, residência rural ou urbana) seja levados em conta a idade e a condição psicológica das pacientes, tentando se evitar, assim, conclusões equivocadas.

Além das patologias relatadas acima, o aparecimento do câncer também foi associado ao uso dos implantes de silicone, porém estudo conduzido por Engel,

Lamm e Lai (1995), onde avaliaram o risco de desenvolvimento de sarcomas de mamas em mulheres implantadas, os autores concluíram não haver evidências de maior risco de ocorrência destes sarcomas em mulheres portadoras de implantes.

Sturrock *et al.* (1998) após avaliação de evidências provenientes de grupos de pacientes, advogados, pesquisadores, médicos, cirurgiões plásticos, produtores e órgãos regulatórios governamentais geraram extenso relatório quanto aos possíveis riscos associados aos implantes de silicone gel. Os pesquisadores concluíram que estes implantes não oferecem riscos maiores que aqueles provenientes de outros tipos de implantes cirúrgicos e que, embora seja reconhecido que existam complicações locais decorrentes dos implantes de silicone, como a contratura capsular, a incidência de doenças entre as mulheres implantadas não é maior que entre a população feminina em geral. Ainda recomendam que informações adequadas sejam fornecidas às pacientes antes do procedimento cirúrgico e que sejam empregados princípios de boas práticas clínicas.

2.4 Processos de Esterilização

A norma ISO 14607:2002 - *Implants for surgery - specific requirements for mammary implants* - no seu 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} , ou seja, a probabilidade de ocorrência de uma unidade não estéril em 1.000.000 de unidades submetidas à esterilização. Esta informação impõe que parâmetros responsáveis pela microbiota do produto, tais como condições ambientais, treinamento e higiene dos operadores sejam controlados.

A condição de esterilidade é fator preponderante não apenas pela qualidade sanitária do produto, mas também para garantir a segurança pós-implante, uma vez que infecções clínicas, dentre outros fatores, são responsáveis pela contratura capsular. Além disto, conforme relatado por Flemming (1998), diversos polímeros, entre eles o poliuretano e o silicone são suscetíveis à degradação por microrganismos, não somente promovendo a deterioração mecânica do material, mas também causando infecção no paciente.

Em se tratando de produto implantável, este deve ser produzido sob condições controladas, caracterizando-se por baixa microbiota. É também esperado que se trabalhe com processos esterilizantes validados, que atendam aos critérios normativos acima apontados e ainda assegurem a ausência de endotoxinas bacterianas conforme orientação da United States Pharmacopeia 27ª edição (UNITED STATES, 2004).

Estudo realizado empregando sete diferentes tipos de silicone (géis de diferentes viscosidades e elastômeros) para avaliação da adesão microbiana empregando *Staphylococcus aureus*, relata que o silicone mostrou-se excelente substrato para esta adesão. Os autores concluíram que esta característica pode explicar o fato de uma pequena contaminação microbiana ser suficiente para

produzir infecção, quando do implante do dispositivo, e conseqüente impossibilidade de tratamento desta infecção com antibióticos sem que antes se remova o implante (ARCIOLA *et al.*, 1995).

Em estudo, também avaliando a capacidade de adesão de uma suspensão microbiana de *Staphylococcus aureus*, desta vez empregando diferentes poliuretanos, Flemming *et al* (2000) constataram a habilidade deste microrganismo em colonizar a superfície dos polímeros, sugerindo a possibilidade da bactéria utilizar o polímero como fonte metabólica.

As infecções clínicas ou subclínicas são de extrema importância, pois constituem um dos fatores responsáveis pela contratura capsular, reação indesejável que pode, inclusive, acarretar a perda do implante. O fornecimento do implante isento de microrganismos viáveis reduz a possibilidade de infecções, embora estas possam ocorrer, em função do procedimento cirúrgico conforme casos relatados por Haiavy e Tobin (2002), onde pacientes apresentaram infecção por *Mycobacterium fortuitum*, após o implante de próteses mamárias de silicone cheias com solução salina.

A ocorrência de infecção não é específica para os implantes mamários, havendo na literatura relatos semelhantes com implantes de outra natureza (MIDANI; RATHORE, 1999; SARAY *et al.*, 2002). Deve-se ressaltar uma maior propensão de infecções em pacientes portadores de implantes, uma vez que os biomateriais juntamente com os microrganismos, por se constituírem em corpos estranhos, interferem com o sistema de defesa do organismo (GRISTINA, 1988-1989).

2.4.1 Calor Seco

O calor é o método mais seguro e amplamente empregado para esterilização. A eficiência na inativação dos microrganismos é dependente da temperatura, tempo de exposição e da presença de água. Na presença de água menores temperaturas e tempo de exposição são requeridos para a destruição dos microrganismos. A inativação microbiana empregando o calor seco se dá em função dos processos oxidativos, os quais requerem altas temperaturas e longo tempo de exposição (SOPER e DAVIES, 1990).

O desenvolvimento do ciclo de esterilização por calor seco, assim como para os demais processos, deve incluir estudo da biocarga e avaliação da preservação das características do produto após submissão ao processo esterilizante. Quando uma população homogênea de microrganismos é exposta ao processo letal, a perda da viabilidade ocorre de uma forma regular. Há que considerar também a velocidade com que esta inativação ocorre, isto é, na dependência dos parâmetros do processo, distintas velocidades de inativação estarão ocorrendo. Ciclos típicos de esterilização por calor seco ocorrem na faixa de 180 °C a 300 °C (PINTO; OHARA; KANEKO, 2003), sendo o *Bacillus subtilis* recomendado pela United States Pharmacopeia 27ª edição, como o indicador biológico a ser utilizado para este processo.

O processo de esterilização pelo calor seco, embora seja um processo relativamente simples requer cuidados como garantir a circulação do ar por toda a câmara a fim de permitir o contato com a carga a ser esterilizada. Além destes cuidados deve-se observar rigorosamente a relação tempo de exposição e temperatura (FB IV, 1998, GRAZIANO; SILVA; BIANCHI, 2000).

Gogolewski e Mainil-Varlet (1996) empregando o calor seco como processo de esterilização para polímeros absorvíveis, observaram não ter ocorrido alteração das propriedades mecânicas das amostras, que comprometessem seu uso clínico. Os autores recomendam este processo de esterilização, sob condições adaptadas

para conciliar características físico-químicas e eficácia, para aqueles polímeros com ponto de fusão superior a 150 °C.

2.4.2 Óxido de Etileno

O óxido de etileno é um gás inflamável, explosivo e carcinogênico que, quando misturado com gás inerte e em condições pré-determinadas de temperatura, umidade e tempo torna-se um método de esterilização bastante eficiente. Seu emprego ocorre, principalmente para produtos que não podem ser submetidos a altas temperaturas, como polímeros instáveis (GRAZIANO; SILVA; BIANCHI, 2000).

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 do gás variando entre 400 a 1600 mg/L. Embora a baixa temperatura e baixa umidade, praticamente não afetem o material a ser esterilizado, resíduos do gás, um potente agente alquilante, podem interagir com grupos funcionais dos polímeros alterando as propriedades biológicas deste tipo de material. Para garantir a remoção destes resíduos, o material esterilizado deve ser desgaseificado por 2 a 5 dias dependendo de sua porosidade (EDLUND *et al.*, 2000).

Em estudo onde avaliaram a influência da esterilização sobre as propriedades mecânicas de diferentes elastômeros, empregando métodos físicos e químicos, Terheyden *et al.* (2000) concluíram ser o processo de esterilização por óxido de etileno, o que promoveu menor alteração de características como força de tensão, resistência à ruptura, em comparação com a esterilização por autoclavação, irradiação, plasma, povidona-iodo e álcool isopropílico.

2.4.3 Radiações Ionizantes

São emissões de alta energia, sob a forma de ondas eletromagnéticas ou partículas que, ao se chocarem com os átomos do material irradiado, alteram sua carga elétrica por deslocamento de elétrons, transformando os átomos irradiados em íons positivos ou negativos. 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. As principais fontes de radiação são: raios alfa, beta, gama e raios X. Os raios gama são radiações de alta energia, emitidas por isótopos radioativos, como o ^{60}Co . Possuem grande poder de penetração sendo úteis na esterilização de materiais volumosos e espessos, além de materiais já acondicionados na embalagem final. Permite, também, a esterilização de materiais termolábeis, uma vez que não ocorre aumento de temperatura e os materiais podem ser utilizados logo após a esterilização pois não há geração de resíduos (PELCZAR; REID; CHAN, 1980; GRAZIANO; SILVA; BIANCHI, 2000).

Apesar de todas as vantagens deste processo de esterilização, quando de sua utilização deve-se levar em conta a susceptibilidade do material a ser esterilizado. Athanasiou, Niederauer e Agrawal (1996) relataram a ocorrência de cisão da cadeia do co-polímero do ácido polilático/ ácido poliglicólico (PLA-PGA) e ainda o decréscimo da força de tensão dos polímeros, após esterilização por radiação gama.

Alterações das propriedades de polímeros esterilizados por radiação gama também foram relatadas por Woo *et al.* (1998). Os autores observaram a diminuição da estabilidade oxidativa dos polímeros em função da depleção dos antioxidantes pela radiação.

O efeito da radiação gama, como agente esterilizante, sobre a estabilidade molecular e propriedades mecânicas de poliuretanos biodegradáveis foi estudado

por Gorna e Gogolewski (2003). Foi observada uma degradação significativa acompanhada de redução da força de tensão dos filmes dos polímeros.

2.5 Biocompatibilidade

De acordo com a norma ISO 10933-1: 1997 *Biological evaluation of medical devices: guidance on selection of tests*, os implantes mamários de silicone enquadram-se nos dispositivos médicos implantáveis, para os quais faz-se a exigência de avaliação da citotoxicidade, visando comprovar a biocompatibilidade do material. Várias metodologias podem ser empregadas na avaliação da toxicidade dos materiais, abrangendo tanto avaliações *in vivo* quanto *in vitro*.

Na United States Pharmacopeia 27ª edição (2004) estão descritos os testes *in vivo* aplicáveis a materiais poliméricos, compreendidos pelo Teste de Injeção Sistêmica, Teste Intracutâneo e Teste de Implante Intramuscular. Estes testes permitem avaliar a toxicidade dos materiais ou seus extratos, porém esforços têm sido feitos com objetivo de substituição dos testes empregando animais (SVENDSEN *et al.*, 1996). Também a norma ISO 10933-1: 1997 *Biological evaluation of medical devices: guidance on selection of tests*, orienta que quando da disponibilidade de testes *in vivo* e testes *in vitro*, para a avaliação biológica, seja dada prioridade à utilização dos testes *in vitro*.

Para a avaliação biológica *in vitro*, a norma ISO 10933-5: 1997 *Biological evaluation of medical devices: Tests for cytotoxicity: in vitro methods* preconiza a avaliação das respostas de células de mamíferos usando parâmetros biológicos apropriados. A norma recomenda o uso tanto de linhagens celulares estabelecidas, como de culturas primárias quando estas contribuírem com uma resposta específica a ser avaliada, o que pode ser exemplificado por estudo onde procedeu-se à avaliação da biocompatibilidade de materiais para implantes ósseos empregando culturas de osteoblastos (CENNI *et al.*, 1999).

A cultura de tecidos teve início no começo do século XX, como método para estudo do comportamento das células animais, livres das variações a que estariam submetidas como constituintes de um ser vivo, seja em decorrência da homeostase ou quando o animal fosse submetido a pressões durante um experimento. Esta técnica foi desenvolvida primeiramente através do cultivo de fragmentos de tecidos, disto resultando o termo genérico cultura de tecidos que abrange a cultura de órgãos - cultura tridimensional de tecidos que mantém algumas ou todas as características do tecido no organismo vivo - e a cultura de células. O termo cultura de células refere-se às culturas derivadas de células dispersas obtidas de um tecido, de uma cultura primária ou de uma linhagem celular através de desagregação enzimática, mecânica ou química (FRESNEY, 1987).

Na década de 40, o desenvolvimento de meios líquidos e a descoberta dos antibióticos, propiciaram os experimentos com as culturas de tecidos. A primeira linhagem celular infinita isolada a partir de tecido cutâneo de camundongo recebeu o nome de linhagem L e por clonagem, ocorreu o isolamento de uma nova linhagem denominada NCTC clone 929, ainda hoje utilizada nos estudos de citotoxicidade (ASTM, 1995; UNITED STATES, 2004).

Em 1947, Earle e colaboradores desenvolveram a técnica de cultivo de células animais em monocamada sobre superfície sólida, usando meio líquido. Este método se aplica tanto a células de linhagem estabelecida quanto às células primárias, com a vantagem de permitir o estudo microscópico minucioso das células que aderem à superfície sólida dos frascos e se multiplicam formando o tapete celular ou camada contínua (RIZZO; TUCHIYA; MARTINEZ, 1983).

A investigação quanto à viabilidade das células fazendo uso de corantes é um dos recursos bastante empregados na avaliação da citotoxicidade. Dentre os corantes mais citados na literatura temos o MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol 2-il) -2,5 difeniltetrazólio) e o vermelho neutro (cloridrato de 3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina). O MTT, na forma oxidada, é um sal solúvel de cor amarela que

ao ser reduzido em reação catalisada pela enzima succinato desidrogenase, presente na mitocôndria, transforma-se em um produto insolúvel de cor azul que pode ser medido em espectrofotômetro. O vermelho neutro é um corante vital que, em pH fisiológico, atravessa passivamente a membrana plasmática, concentra-se nos lisossomos que possuem um pH muito menor que o citoplasma circundante. A perda deste gradiente de pH decorrente da morte da célula ou perda da permeação da membrana inibe a incorporação de tais corantes. (BORENFREUND; PUERNER, 1985; HUGGET *et al.*, 1996; HARBELL *et al.*, 1997).

O fato de ser o vermelho neutro um corante que é seletivamente retido pelos lisossomos de células viáveis, permite a utilização desta propriedade na avaliação da toxicidade de um agente externo, seja pelo método de difusão ou pelo método de captura (BABICH, BORENFREUND, 1990).

Em 1965, Rosenbluth *et al.* propuseram uma metodologia para avaliação *in vitro* da biocompatibilidade de plásticos empregados em artigos médico-hospitalares. Os materiais foram colocados diretamente sobre uma monocamada de células e após 24 horas, fez-se a observação para verificar a presença de algum efeito tóxico. No mesmo ano, Guess *et al.* (1965) descreveram o método de difusão em agar, onde a monocamada celular foi sobreposta por uma camada de agar e as amostras a serem testadas depositadas sobre esta camada, com isto evitou-se os danos mecânicos às células quando da deposição direta sobre a monocamada de células. Este método é preconizado, para avaliação da citotoxicidade, em normas internacionais e compêndios oficiais (ISO 10933-5 1997; ASTM, 1995; UNITED STATES, 2004).

Com o objetivo de avaliar a biocompatibilidade de diferentes biomateriais, trabalhos têm sido desenvolvidos empregando os testes de citotoxicidade *in vitro*. Ikarashi, Tsuchiya e Nakamura (1995) avaliaram a citotoxicidade de dispositivos médicos esterilizados por peróxido de hidrogênio, avaliando a viabilidade de

células fibroblásticas de hamster, expostas aos materiais esterilizados, empregando o corante cristal violeta.

Visando a seleção de metodologias *in vitro* capazes de predizer a resposta obtida *in vivo*, foi realizado estudo empregando diferentes metodologias como ensaio de contato direto e extrato das amostras com culturas de fibroblastos e células endoteliais, estudo de ativação de complemento e ativação celular, em amostras de próteses vasculares sintéticas. Os resultados observados quando da utilização dos ensaios de ativação celular, contato direto empregando células endoteliais e extrato das amostras avaliados frente às células fibroblásticas foram os que melhor reproduziram os obtidos *in vivo* (MAROIS *et al.*, 1996).

Morrison *et al.* (1995) realizaram estudo sobre a biocompatibilidade de implantes ortopédicos empregando cultura de osteoblastos e fibroblastos, sendo a citotoxicidade avaliada através de alterações celulares, quanto ao conteúdo de proteínas, perda da enzima lactato desidrogenase através da membrana celular e ensaio de viabilidade celular empregando o MTT. Este último método, com o emprego de linhagem estabelecida de fibroblastos de camundongos, tem sido também utilizado em outros estudos visando avaliação da biocompatibilidade dos biomateriais (IGNATIUS; CLAES, 1996; CHAUVEL-LEBRET *et al.*, 1999; MARQUES; REIS; HUNT, 2002; FISCHER *et al.*, 2003).

Assim como o MTT, o corante vital vermelho neutro também tem sido bastante empregado nas avaliações da biocompatibilidade de diversos biomateriais. Rogero *et al.* (2000) empregaram a metodologia de difusão em agar, paralelamente ao teste de inibição de colônias, para a avaliação da citotoxicidade de membranas de hidrogel. As membranas sofreram modificação química e em seguida foram tratadas com radiação ionizante para promover a reticulação. As duas metodologias empregadas na avaliação da citotoxicidade, não só demonstraram sensibilidades equivalentes, como também propiciaram relevantes informações sobre a alteração da biocompatibilidade em função das modificações químicas promovidas.

Pariente, Kim e Atala (2001) relataram a avaliação da biocompatibilidade de biomaterias naturais e sintéticos, dentre os quais o silicone, empregados na reconstrução de tecidos urinários. Os autores empregaram a metodologia de captura do vermelho neutro e cultura primária de células uroteliais humanas, concluindo que estas condições mimetizam a interação *in vivo*, além de confirmar os resultados obtidos quando do uso de animais.

Com o objetivo de comprovar, além da hemocompatibilidade e atividade antimicrobiana, a biocompatibilidade de colas cirúrgicas, Montanaro *et al.* (2001) realizaram testes de citotoxicidade pelo método de captura do vermelho neutro empregando a linhagem celular NCTC clone 929, que apresentou maior viabilidade quando da exposição às amostras mais diluídas.

2.6 Endotoxinas Bacterianas

As endotoxinas bacterianas são complexos de alto peso molecular associados à membrana externa de bactérias Gram-negativas e constituem uma importante fonte de pirogênio para a indústria farmacêutica. Embora termoestáveis, as endotoxinas são inativadas por ciclos extensos de calor seco, condições alcalinas ou ácidas. Apesar de inicialmente a endotoxina ter sido reconhecida apenas como causadora de febre, mais recentemente sabe-se de sua ação biológica de amplo espectro. A ação biológica está associada à porção lipídica da molécula, porém porção distinta da endotoxina é responsável em grande parte pela antigenicidade específica das bactérias Gram-negativas, respondendo por milhares de sorotipos. Uma outra porção, a central, é bastante homogênea dentre diferentes espécies e auxilia na dispersão da molécula, portanto fundamental para ação biológica (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003).

Além da promoção do estado febril, outras atividades biológicas são atribuídas às endotoxinas, como ativação do sistema de coagulação, alteração do

metabolismo de lipídios e carboidratos, ativação de complemento, modificações hemodinâmicas, agregação plaquetária, choque e morte (PEARSON, 1985).

A United States Pharmacopeia (2004), em capítulo que trata dos requisitos aplicáveis aos dispositivos médico-hospitalares, dentre os quais, implantes como válvulas cardíacas e enxertos vasculares, oxigenadores, cateteres intravenosos, que entram em contato direto ou indireto com o sistema cardiovascular, sistema linfático ou fluido cerebrospinal, recomenda a observância à condição de esterilidade e ausência de endotoxinas. O limite de 0,5 UE/mL (Unidades de Endotoxina/ mL) é recomendado pela Food and Drug Administration (FDA, 1987).

Para a detecção das endotoxinas bacterianas utiliza-se uma metodologia que se baseia na atividade de uma enzima de alto peso molecular isolada do lisado de amebócitos de *Lymulus polyphemus*, que promove a gelificação de proteínas de baixo peso molecular. Esta enzima é ativada pela endotoxina, em seguida desencadeando uma reação em cascata com a posterior coagulação de uma proteína de baixo peso molecular, denominada de coagulogênio (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003).

Nakagawa *et al.* (2003) após realização de estudo avaliando a contaminação por endotoxina bacteriana de biomateriais constituídos de substâncias naturais como alginato e colágeno, concluíram ser o teste de LAL bastante útil na detecção do nível de endotoxinas neste tipo de amostra. De longa data, esta mesma conclusão tem sido relatada por outros autores após utilização desta metodologia na análise de diferentes dispositivos médico-hospitalares (WEARY; BAKER, 1977; PEARSON, 1979; HAISHIMA *et al.*, 2001),

2.7 Migração do gel de silicone (Silicone gel bleed)

Aos implantes mamários de silicone têm sido atribuídos alguns efeitos adversos em função da possibilidade de ruptura dos implantes ou mesmo da

migração do gel de silicone através dos invólucros de silicone elastomérico, atingindo os tecidos ao redor do implante. Doenças auto-imunes, artrite, problemas neurológicos são algumas das patologias atribuídas ao silicone. O gel de silicone de baixo peso molecular tende a migrar através do invólucro do elastômero de silicone resultando no denominado *gel bleed* (STURROCK *et al.*, 1998). Em função das implicações clínicas abordadas no item 2.3.2, há necessidade de se proceder à quantificação desta taxa de migração.

Estudos têm sido realizados envolvendo a determinação da quantidade de silicone em tecidos adjacentes ao implantes mamários. Garrido e Young (1999) realizaram a quantificação por ressonância magnética nuclear, do silicone em cápsulas fibróticas removidas cirurgicamente de pacientes portadoras de implantes de superfície lisa, concluindo não haver correlação entre a quantidade de silicone presente na cápsula e o tempo de implantação.

Também avaliando o conteúdo de silicone, além do silício e platina no tecido capsular explantado de pacientes portadoras de implantes e tecido mamário de mulheres não portadoras de implantes, empregando espectrometria de massa e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa, Flassbeck *et al* (2003) detectaram a presença de silício, silicone e platina nos tecidos retirados das portadoras de implante, sendo que o grupo controle (não portadoras) não apresentou nenhuma das substâncias pesquisadas.

Contrapondo aos estudos de avaliação dos tecidos adjacentes aos implantes, Yu *et al.* (1996) realizaram estudo *in vitro* com objetivo de avaliar a migração do gel de silicone de explantes e implantes de superfície lisa. Os autores empregaram uma solução com concentração de eletrólitos e pH simuladores do plasma humano, na qual foram imersos os implantes. A quantidade de gel foi determinada pela medida, por espectroscopia, da quantidade de silício presente no líquido de imersão e posterior conversão ao equivalente em polidimetilsiloxano.

Visando avaliação *in vitro*, a American Society for Testing Materials (ASTM, 1996) descreve a metodologia para realização de estudo de difusão do gel de silicone. Esta metodologia permite a quantificação da quantidade de gel e posterior comparação de produtos de diferentes características. O teste é realizado durante período de tempo pré-estabelecido a uma temperatura de cerca de 43 °C, simulando exposição dos implantes à situação de pior caso após implantação (estado febril).

3. Objetivos

O presente trabalho teve como metas:

- comprovar a eficácia dos procedimentos de esterilização dos implantes mamários
- avaliar a relação entre os diferentes processos de esterilização (calor seco, irradiação e óxido de etileno) e possíveis alterações quanto à biocompatibilidade dos diferentes tipos de implantes mamários
- avaliar a influência dos processos de esterilização sobre a migração do gel de silicone (silicone gel *bleed*), através dos invólucros de silicone elastomérico.

4. Materiais e Métodos

4.1 Materiais

Neste estudo foi empregado um total de 1.042 implantes mamários de silicone em estágio semifinal de processamento (Figura 5), isto é, submetidos a todas as etapas de produção até o acondicionamento em filme plástico e/ou blíster de policarbonato, sem contudo terem sido submetidos à esterilização. Os implantes nesta condição, não estéreis, foram empregados na determinação da biocarga e também nas etapas de validação dos processos esterilizantes.

As unidades foram cedidas por produtor nacional que se caracteriza pelo atendimento não apenas às exigências da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), mas também ao órgão correspondente dos Estados Unidos da América, a Food and Drug Administration (FDA). Esta instituição inspeciona, além dos produtores internos, aqueles estrangeiros que solicitem esta inspeção, almejando ou não a exportação para território americano. Este produtor caracteriza-se, também, pela certificação junto à Comunidade Européia sendo detentora da marca CE, decorrente do atendimento aos requisitos normativos observados durante inspeções. Tais características tornam a amostragem adequada ao estudo.

Figura 5 – Implante de silicone em acondicionamento semi-final, não estéril

As amostras empregadas neste estudo estão descritas a seguir:

- **implante de silicone gel com superfície lisa** (Figura 6): foram empregados 348 unidades constituídas de invólucros de silicone elastomérico (vulcanizado) de superfície lisa, cheios com silicone gel, com volumes de 220 mL, 240 mL e 700 mL de forma randomizada.

Figura 6 – Implante de silicone gel com superfície lisa (esquerda.) e corte do implante mostrando o silicone gel (direita)

- **implante de silicone gel com superfície texturizada** (Figura 7): foram empregadas 268 unidades constituídas de invólucros de silicone elastomérico (vulcanizado), submetido a tratamento de forma a ser caracterizado como de superfície texturizada, cheios com silicone gel, com volumes de 220 mL, 240 mL, de forma randomizada.

Figura 7 – Implante de silicone gel com superfície texturizada (esquerda.) e corte do implante mostrando o silicone gel (direita)

- **implante de silicone gel revestido com espuma de poliuretano** (Figura 8): foram empregadas 168 unidades constituídas de invólucros de silicone elastomérico (vulcanizado) sem tratamento prévio (superfície lisa) revestidos com espuma de poliuretano, cheios com silicone gel, com volumes de 220, 240 mL, de forma randomizada.

Figura 8 – Implante de silicone gel com superfície revestida com poliuretano (esquerda.) e corte do implante mostrando o silicone gel (direita)

- **implante de silicone pré-cheio com solução salina** (Figura 9): foram empregadas 258 unidades constituídas de invólucros de silicone elastomérico (vulcanizado) submetido a tratamento de forma a ser caracterizado como superfície texturizada, pré-cheios com solução salina (NaCl 0,9%), com volumes médios de enchimento de 700 mL.

Figura 9 – Implante de silicone com superfície texturizada pré-cheio solução salina

4.2 Métodos

Para realização deste estudo foram aplicados métodos microbiológicos (determinação qualitativa e quantitativa da biocarga dos implantes, validação dos processos esterilizantes empregados e comprovação da esterilidade das amostras submetidas sejam aos processos físicos como calor e irradiação ou físico-químicos como óxido de etileno), biológicos (citotoxicidade e endotoxinas bacterianas) e físico (teste de *bleed*).

4.2.1 Métodos Microbiológicos

A determinação da biocarga dos implantes cheios com silicone gel, previamente à sua esterilização, consistiu na extração e contagem das células microbianas presentes na superfície externa do invólucro de silicone e embalagem primária de polycarbonato. Para os implantes pré-cheios com solução salina, além do invólucro de silicone, foram avaliados a embalagem primária constituída do filme flexível que forma o saco que acondiciona o implante e o líquido de enchimento (solução de cloreto de sódio 0,9%).

A validação dos procedimentos de extração e contagem microbiana envolveu a simulação destes procedimentos, com a contaminação intencional dos implantes empregando suspensões microbianas padronizadas, visando assim determinar os percentuais de recuperação das células inoculadas. Estes percentuais foram posteriormente empregados na correção dos valores encontrados quando da determinação da biocarga dos implantes.

Quanto aos implantes empregados para estes procedimentos, aqueles cheios com silicone gel foram esterilizados por calor seco (121 °C por 16 horas), sendo os pré-cheios com solução salina esterilizados por radiação empregando dose de 25 kGy, sem a preocupação com aspectos de validação dos processos de esterilização. Nesta etapa visou-se unicamente a destruição de quaisquer formas

viáveis que, se presentes nos implantes a serem intencionalmente contaminados, poderiam levar a valores superestimados dos percentuais de recuperação.

A técnica utilizada, contagem microbiana por filtração descrita na Farmacopéia Brasileira (1988), assim como fluidos e meios de cultura foram idênticos tanto na contagem de células microbianas intencionalmente inoculadas (determinação do percentual de recuperação) bem como na contagem experimental da biocarga dos implantes.

Para obtenção das suspensões microbianas foram empregados os microrganismos: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 e *Candida albicans* ATCC 10231, descritos no capítulo <71> da United States Pharmacopeia (2004).

4.2.1.1 Padronização do inóculo

Os microrganismos *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *B. subtilis* foram mantidos em tubos de ensaio contendo meio inclinado de Agar caseína soja estéril Oxoid® e a *C. albicans* em meio inclinado Agar Sabouraud Dextrose estéril Oxoid®. Os repiques de manutenção foram realizados mensalmente, transferindo-se com alça de níquel-cromo parte do crescimento dos tubos contendo os microrganismos para novos tubos contendo os meios de manutenção estéreis. Após a transferência, os novos tubos contendo os repiques de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *B. subtilis* foram incubados por 24 horas a $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ em estufa Nova Ética, modelo 411D e o tubo contendo a *C. albicans* foi incubado durante 48 horas a $22,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ em estufa BOD FANEM, modelo 347 CD.

Para obtenção das suspensões microbianas, procedeu-se ao repique dos microrganismos a partir dos tubos de manutenção. Após o término do período de incubação, a cada tubo contendo os diferentes microrganismos foram

acrescentados 3 mL de solução salina estéril, para obtenção de suspensão microbiana homogênea.

As suspensões assim obtidas foram submetidas ao método de contagem *pour plate* (UNITED STATES, 2004) empregando diluições que variaram de 10^{-6} a 10^{-8} , de forma a permitir sua padronização. Foram empregados inóculos da ordem de 100 Unidades Formadoras de Colônias/mL (UFC/mL) para contaminação das amostras, aplicados em volumes de 1 mL.

4.2.1.2 Determinação dos percentuais de recuperação da carga microbiana dos implantes

Os procedimentos de inoculação e contagem foram realizados em capela de fluxo laminar certificada, marca VECO, modelo Biosafe Tipo A Classe 100, com velocidade de fluxo de ar no filtro de insuflamento de 0,37 m/s. Trabalhou-se com técnica asséptica, tendo sido todos os dispositivos auxiliares previamente esterilizados.

Para a descrição metodológica os materiais foram agrupados em invólucros, embalagem primária de policarboato (blíster), embalagem primária de filme plástico flexível e líquido de enchimento.

a) Invólucros

Foi efetuada a contaminação, em duplicata, do invólucro de silicone (superfície lisa, superfície texturizada e superfície revestida com espuma de poliuretano) empregando, individualmente, cada uma das quatro suspensões microbianas contendo cerca de 100 UFC/mL. A aplicação foi distribuída por uma área de cerca de 9 cm², sendo que após a inoculação os implantes foram

mantidos por cerca de 96 horas à temperatura ambiente (cerca de 25 °C). Durante a secagem, os implantes foram protegidos da sedimentação de partículas, por placas de policarbonato.

Decorrido o tempo e confirmada a secagem do material, procedeu-se ao processo extrativo. Os implantes foram imersos em 500 mL de solução salina estéril contendo 0,1% de Tween 80 Vetec® e submetidos à agitação mecânica em agitador rotativo, marca Superohm, modelo AS, por 30 minutos, em velocidade máxima. Decorrido o tempo de extração, procedeu-se à contagem por método indireto (filtração por membrana). Foram realizadas duas filtrações independentes, de volumes de 250 mL, através de membranas de éster de celulose Millipore® com poros de 0,45 µm.

Para os microrganismos *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *B. subtilis*, as membranas foram, em seguida, depositadas sobre camada de Agar caseína soja estéril Oxoid®, contido em placas de Petri descartáveis, sendo as placas posteriormente incubadas em estufa Nova Ética, modelo 411D, por 96 horas a 32,5 °C ± 2,5 °C. Para a *C. albicans*, as membranas foram depositadas sobre camada de Agar Sabouraud Dextrose estéril Oxoid®, contido em placas de Petri descartáveis, sendo as placas posteriormente incubadas em estufa BOD FANEM, modelo 347 CD, por 7 dias a 22,5 °C ± 2,5 °C. Decorrido o período de incubação, efetuou-se a contagem do número de unidades formadoras de colônias por unidade de implante.

b) Embalagem primária de policarbonato

Foi efetuada a contaminação, em duplicata, da embalagem de policarbonato, individualmente, com cada uma das quatro suspensões microbianas contendo cerca de 100 UFC/mL. A aplicação foi distribuída por uma área de cerca de 9 cm², sendo que após a inoculação as embalagens foram

mantidas por cerca de 96 horas à temperatura ambiente (cerca de 25 °C). Durante a secagem foram protegidas da sedimentação de partículas, por placas de polycarbonato.

Decorrido o tempo e confirmada a secagem do material, procedeu-se ao processo extrativo. Foi adicionada a cada embalagem, 100 mL de solução salina estéril contendo 0,1% de Tween 80 Vetec®. Após a adição, as embalagens foram agitadas por 30 minutos em agitador rotativo, marca Superohm, modelo AS, por 30 minutos, em velocidade baixa. Decorrido o tempo de extração, procedeu-se à contagem por método indireto (filtração por membrana). Foi realizada a filtração dos volumes de 100 mL através de membranas de éster de celulose Millipore® com poros de 0,45 µm.

Para os microrganismos *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *B. subtilis*, as membranas foram, em seguida, depositadas sobre camada de Agar caseína soja estéril Oxoid®, contido em placas de Petri descartáveis, sendo as placas posteriormente incubadas em estufa Nova Ética, modelo 411D, por 96 horas a 32,5 °C ± 2,5 °C. Para a *C. albicans*, as membranas foram depositadas sobre camada de Agar Sabouraud Dextrose estéril Oxoid®, contido em placas de Petri descartáveis, sendo as placas posteriormente incubadas em estufa BOD FANEM, modelo 347 CD, por 7 dias a 22,5 °C ± 2,5 °C. Decorrido o período de incubação, efetuou-se a contagem do número de unidades formadoras de colônias por unidade de embalagem.

c) Líquido de enchimento (solução fisiológica – NaCl 0,9%)

Procedeu-se à inoculação, em duplicata, injetando com seringa de 1 mL, individualmente, cada uma das quatro suspensões microbianas contendo cerca de 100 UFC/mL. As unidades foram mantidas, protegidas por placa de polycarbonato, à temperatura ambiente (cerca de 25 °C) por 96 horas. Decorrido este tempo

procedeu-se à contagem microbiana empregando método indireto através da filtração dos volumes totais dos implantes, através de membrana de éster de celulose Millipore® com poros de 0,45 µm.

Para os microrganismos *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *B. subtilis*, as membranas foram, em seguida, depositadas sobre camada de Agar caseína soja estéril Oxoid®, contido em placas de Petri descartáveis, sendo as placas posteriormente incubadas em estufa Nova Ética qualificada, modelo 411D, por 96 horas a $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para a *C. albicans*, as membranas foram depositadas sobre camada de Agar Sabouraud Dextrose estéril Oxoid®, contido em placas de Petri descartáveis, sendo as placas posteriormente incubadas em estufa BOD FANEM, modelo 347 CD, por 7 dias a $22,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Decorrido o período de incubação, efetuou-se a contagem do número de unidades formadoras de colônias por unidade de implante.

d) Embalagem primária de filme plástico flexível

Duas réplicas das embalagens primárias, assepticamente removidas dos implantes foram, em duplicata, individualmente submetidas à inoculação com cada uma das cepas microbianas indicadas anteriormente, padronizadas em cerca de 100 UFC/mL, em volumes de 1 mL. Após a secagem com o mesmo tempo e condições empregados para o invólucro de silicone, procedeu-se à extração de cada unidade empregando volume de 100 mL de solução salina estéril contendo 0,1% de Tween 80 Vetec®, adicionados às embalagens. As embalagens foram submetidas à agitação manual por 10 minutos. Decorrido o tempo de extração, procedeu-se à contagem por método indireto. Foram filtrados, separadamente, os volumes de 100 mL, através de membranas de éster de celulose Millipore® com poros de 0,45 µm.

Para os microrganismos *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *B. subtilis*, as membranas foram, em seguida, depositadas sobre camada de Agar caseína soja estéril Oxoid®, contido em placas de Petri descartáveis, sendo as placas posteriormente incubadas em estufa Nova Ética, modelo 411D, por 96 horas a $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para a *C. albicans*, as membranas foram depositadas sobre camada de Agar Sabouraud Dextrose Oxoid®, contido em placas de Petri descartáveis, sendo as placas posteriormente incubadas em estufa BOD FANEM, modelo 347 CD, por 7 dias a $22,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Decorrido o período de incubação, efetuou-se a contagem do número de unidades formadoras de colônias por unidade de embalagem.

Paralelamente a estes procedimentos de contagem também foram plaqueados, em duplicata, volumes de 1 mL de cada uma das suspensões microbianas, empregando os meios de cultura e condições de incubação descritos para o invólucro de silicone, embalagem primária de policarbonato, líquido de enchimento e embalagem primária de filme plástico flexível. Efetuou-se a contagem do número de unidades formadoras de colônias por mL de suspensão microbiana.

Após o conhecimento tanto da contagem padronizada para cada uma das espécies microbianas (UFC/mL) assim como das contagens recuperadas para cada um das estruturas (invólucro de silicone, embalagem primária de policarbonato, líquido de enchimento e embalagem primária de filme plástico flexível) conforme descrito no item 4.2.1.2, foi possível o cálculo dos percentuais de recuperação para cada estrutura avaliada.

4.2.1.3 Determinação da biocarga dos implantes

Trinta unidades, não estéreis, de cada tipo de implante em embalagem final foram empregadas na determinação da biocarga, seguindo os

mesmos procedimentos de extração e contagem pelo método indireto, bem como meios de cultura e condições de incubação descritos no item 4.2.1.2. De posse dos valores da carga microbiana encontrada para cada estrutura dos diferentes tipos de implantes, procedeu-se à correção destes valores empregando os percentuais de recuperação definidos em etapa anterior.

Para os implantes constituídos de invólucros de silicone gel com superfície lisa, texturizada ou revestida com espuma de poliuretano cheios com silicone gel, a carga microbiana total consistiu dos valores corrigidos, encontrados para o invólucro de silicone e embalagem primária de policarbonato. Quanto aos implantes de silicone pré-cheios com solução salina a carga microbiana total foi resultante da somatória das cargas microbianas corrigidas do invólucro de silicone, embalagem primária de filme plástico flexível e líquido de enchimento.

4.2.1.4 Identificação dos microrganismos constituintes da biocarga dos implantes

Após a avaliação quantitativa da biocarga dos implantes não estéreis, procedeu-se à avaliação qualitativa selecionando-se de todas as placas com evidência de crescimento microbiano, obtidas no item 4.2.1.3, colônias com características macromorfológicas distintas. Empregando alça de níquel-cromo fez-se a transferência das diferentes colônias para tubos de ensaio contendo meio de cultura inclinado Agar de Caseína Soja estéril Oxoid®. Após a transferência os tubos foram incubados por 48h a $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Decorrido o período de incubação e confirmado o crescimento, os tubos contendo os microrganismos isolados foram enviados, para identificação, ao Setor de Microbiologia do Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

4.2.1.5 Verificação da Eficácia dos Processos Esterilizantes

A determinação qualitativa e quantitativa da biocarga consistiu em etapa fundamental para a validação dos processos esterilizantes. Desta forma, partindo de unidades com biocarga determinada, procedeu-se às etapas da validação dos processos físicos (calor seco e radiação) e físico-químico por óxido de etileno.

a) Esterilização dos Implantes por Calor Seco

Os implantes de silicone com superfície lisa cheios com silicone gel, com volume médio de 700 mL, foram escolhidos como corpos de prova para a realização da etapa de validação do processo de esterilização por calor seco. Estes implantes foram empregados como suporte para o indicador biológico, comercialmente obtido, Spordex® - contendo esporos de *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9732 inoculados em tiras de papel, acondicionadas em embalagem de papel glassine. As tiras do indicador biológico foram colocadas no interior dos implantes, na posição central, sendo estes posteriormente acondicionados na estufa de esterilização marca Grieve, modelo TBH 500.

Foram realizados três ciclos de esterilização a 121°C, empregando tempo de exposição de 16h. Ao término de cada ciclo de esterilização, as dez unidades de implantes contendo os indicadores biológicos foram removidos e transferidos para capela de fluxo laminar instalada em sala limpa. Os indicadores biológicos foram retirados dos implantes e transferidos para tubos de ensaio contendo cerca de 30 mL de meio Caldo caseína soja estéril Oxoid®. Os tubos foram, a seguir, incubados em estufa bacteriológica marca Nova Ética, modelo 411D a 32,5 °C $\pm$ 2,5 °C por 7 dias (UNITED STATES, 2004). Foram realizadas verificações diárias para observação de ocorrência de turvação e/ ou formação de película na superfície do meio líquido, indicativos de crescimento microbiano.

Paralelamente à incubação das tiras contendo os esporos, submetidas ao processo esterilizante, foram incubadas tiras de esporos não esterilizadas para permitir a comprovação da viabilidade do indicador biológico.

A eficácia do meio-ciclo de esterilização foi constatada pela ausência de crescimento microbiano nos tubos de meio de cultura contendo os indicadores biológicos, comprovando-se a letalidade dos meio-ciclos de esterilização sobre os indicadores biológicos. Para a esterilização das unidades de implantes a serem

submetidas às avaliações microbiológicas, biológicas e física foi empregado o dobro do tempo de exposição, ou seja, 32 horas.

b) Esterilização por Radiação Gama - ^{60}Co

Com os valores da biocarga dos implantes de silicone pré-cheios com solução salina procedeu-se à seleção das doses de verificação e esterilização, empregando a norma ISO 11137:1995 – *Sterilization of health care products – Requirements for Validation and routine control – Radiation sterilization* (Anexo B - Tabela 1).

A dose de verificação é a dose de radiação estimada para produzir um Nível de Segurança de Esterilidade (Sterility Assurance Level - SAL) de 10^{-2} e a dose de esterilização constitui-se na dose de radiação estimada para obtenção de um Nível de Segurança de Esterilidade de 10^{-6} .

Conforme a norma adotada, a eficácia do processo esterilizante foi avaliada procedendo-se ao teste de esterilidade em 100 unidades de implantes irradiadas com dose de verificação de 8,3 kGy, processo realizado na empresa EMBRARAD – Empresa Brasileira de Radiação. Após comprovação do atendimento ao Nível de Segurança de Esterilidade de 10^{-2} procedeu-se à irradiação de outras 100 unidades de implantes empregando dose de radiação de 21,7 kGy (dose de esterilização) para posterior realização das avaliações microbiológicas e biológicas.

c) Esterilização por Óxido de Etileno

Os parâmetros para esterilização por óxido de etileno foram definidos empregando o Método C: Método do Meio Ciclo (ISO 11135:1994 *Medical Devices – validation and routine control of ethylene oxide sterilization* – Anexo B).

Os implantes de silicone com superfície lisa, novamente utilizados como corpos de prova foram esterilizados, em três ciclos distintos, segundo os seguintes parâmetros:

- temperatura: 48°C
- concentração de óxido de etileno: 750 mg/L
- umidade relativa: mínimo 55%
- tempo de esterilização (meio ciclo): 150 minutos

Foi utilizado o indicador biológico, comercialmente obtido, Spordex® - *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9732, acondicionado no interior dos implantes de silicone gel (volume de 700 mL). Foram submetidas aos meio-ciclos, 10 unidades dos implantes, que após a esterilização foram avaliadas quanto à esterilidade através da incubação das tiras contendo os esporos. Foram realizados três ciclos de esterilização nas mesmas condições. Os indicadores biológicos foram retirados dos implantes e transferidos para tubos de ensaio contendo cerca de 30 mL de meio Caldo caseína soja estéril Oxoid® e a seguir, incubados em estufa bacteriológica marca Nova Ética, modelo 411D a $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 7 dias (UNITED STATES, 2004).

Foram realizadas verificações diárias para observação de ocorrência de turvação e/ ou formação de película na superfície do meio líquido, indicativos de crescimento microbiano. Decorrido o tempo de incubação não se observou crescimento microbiano nos tubos contendo os esporos bacterianos, comprovando a eficácia do meio ciclo.

Paralelamente à incubação das tiras contendo os esporos bacterianos, submetidas ao processo esterilizante, foram incubadas tiras de esporos não esterilizadas para permitir a comprovação da viabilidade do indicador biológico.

Procedeu-se à esterilização das unidades de implantes a serem submetidas às avaliações microbiológicas, biológicas e física empregando o dobro do tempo

de exposição, isto é, 300 minutos. A esterilização por óxido de etileno foi realizada pela empresa BIOXXI Serviços de Esterilização Ltda.

d) Confirmação da esterilidade dos implantes

Seja nos processos esterilizantes em que a validação consistiu na verificação da perda da viabilidade dos esporos bacterianos (calor seco e óxido de etileno) ou onde se estabeleceu dose de verificação (radiação gama), todas as 100 unidades de cada tipo de implante esterilizadas, foram submetidas à inspeção visual quanto à integridade do produto e embalagem, além da adequação da aparência física (ambos testes não destrutivos), sendo em seguida submetidas ao teste de esterilidade.

A validação do teste de esterilidade abrangeu a comprovação da esterilidade dos meios de cultura empregados bem como confirmação da capacidade promotora de crescimento destes mesmos meios. Também foi comprovada a ausência de atividade bacteriostática e fungistática das amostras de implantes. Estes procedimentos foram realizados conforme descritos na United States Pharmacopeia (2004).

Comprovação da esterilidade dos meios de cultura

Para confirmação da esterilidade dos meios de cultura, após sua preparação, de cada um dos lotes de meio Caldo tioglicolato Oxoid® e meio Caldo caseína soja Oxoid® empregados, foram incubados cinco tubos por período de 14 dias, respectivamente a $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $22,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Capacidade promotora de crescimento dos meios de cultura Caldo Tioglicolato e Caldo caseína soja

Para a verificação da capacidade promotora de crescimento dos meios de cultura, tubos de cada lote de meio de cultura estéril Caldo tioglicolato Oxoid® foram inoculados, em duplicata, com aproximadamente 100 UFC/tubo empregando os microrganismos *Bacillus subtilis* 6633, *Pseudomonas aeruginosa* 9027 e *Bacteroides vulgatus* 8482. Após inoculação os tubos foram incubados por 3 dias à temperatura de $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$.

Tubos do meio de cultura Caldo caseína soja foram inoculados, em duplicata, com aproximadamente 100 UFC/tubo, empregando os microrganismos *Bacillus subtilis* 6633, *Candida albicans* 10231 e *Aspergillus niger* 16404, sendo que, após inoculação os tubos contendo o *B.subtilis* 6633 foram incubados por 3 dias à temperatura de $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ e aqueles contendo a *C.albicans* 10231 e *A.niger* 16404, por 5 dias a $22,5 \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Atividade bacteriostática e fungistática das amostras de implantes

A ausência de atividade bacteriostática e fungistática das amostras foi confirmada empregando-se os mesmos microrganismos descritos para a comprovação da capacidade promotora de crescimento dos meios de cultura.

Volumes de 1 mL das suspensões microbianas contendo cerca de 100 UFC, foram inoculadas juntamente com 2 fragmentos com cerca de 2 cm^2 , dos diferentes tipos de implantes, nos meios de Caldo tioglicolato e Caldo caseína soja e incubados à temperatura de $32,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $22,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente por 14 dias.

Para os implantes pré-cheios com solução salina, volumes de 1 mL do inóculo foram adicionados ao frasco para o qual foram transferidos o líquido interno do implante e os fragmentos do invólucro. Após filtração através de membrana de éster de celulose com porosidade de $0,45\ \mu\text{m}$, a mesma foi dividida ao meio, sendo metade da membrana transferida para o meio de cultura Caldo tioglicolato estéril Oxoid® e a outra metade para o Caldo caseína soja estéril Oxoid®, posteriormente incubados a $32,5\ ^\circ\text{C} \pm 2,5\ ^\circ\text{C}$ e $22,5\ ^\circ\text{C} \pm 2,5\ ^\circ\text{C}$, respectivamente.

Teste de esterilidade empregando amostras de:

- **implantes de silicone gel com superfície lisa e texturizada esterilizados por calor seco**
- **implantes de silicone gel com superfície lisa e texturizada esterilizados por óxido de etileno**
- **implantes de superfície revestida com poliuretano esterilizadas por óxido de etileno**

Os procedimentos descritos a seguir foram realizados em capela de fluxo laminar certificada, marca VECO modelo Biosafe Tipo A Classe 100, com velocidade de fluxo de ar no filtro de insuflamento de $0,37\ \text{m/s}$ instalada em sala limpa. Trabalhou-se com técnica asséptica, tendo sido todos os dispositivos auxiliares previamente esterilizados. Foram empregadas 100 unidades de cada tipo de implante submetidas aos dois processos esterilizantes.

O teste de esterilidade foi realizado pelo método direto, onde depois da retirada do implante da embalagem, foram cortados 2 fragmentos em seguida adicionados aos tubos de ensaio contendo cerca de 80 mL dos meios de cultura Caldo tioglicolato estéril Oxoid® e Caldo caseína soja estéril Oxoid®, posteriormente incubados por 14 dias a $32,5\ ^\circ\text{C} \pm 2,5\ ^\circ\text{C}$ e $22,5\ ^\circ\text{C} \pm 2,5\ ^\circ\text{C}$, respectivamente. Diariamente procedeu-se à observação dos tubos quanto à ocorrência de crescimento microbiano.

Teste de esterilidade empregando amostras de implantes de silicone pré-cheios com solução salina esterilizados por radiação gama

O teste de esterilidade foi realizado transferindo-se o líquido interno do implante para frasco estéril e posterior fragmentação dos invólucros com tesoura, sendo então adicionados ao frasco contendo o líquido interno. Após agitação manual foi realizada a filtração através de membrana de éster de celulose com tamanho de poros de 0,45 μm Millipore®, em seguida dividida ao meio, sendo metade da membrana transferida para o meio de cultura Caldo tioglicolato estéril Oxoid® e a outra metade para o Caldo caseína soja estéril Oxoid®, posteriormente incubados a $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $22,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente. Diariamente procedeu-se à observação dos tubos quanto à ocorrência de crescimento microbiano.

4.2.2 Métodos biológicos

4.2.2.1 Avaliação da citotoxicidade *in vitro*

As avaliações *in vitro* foram feitas pela análise da citotoxicidade em culturas celulares, tomando como parâmetro a viabilidade celular. Os métodos utilizados foram o de Difusão em camada de agar e Captura do vermelho neutro. Foram empregadas 10 unidades de cada tipo de implante.

Método de difusão em camada de agar

Os ensaios foram realizados na Seção de Culturas Celulares do Instituto Adolfo Lutz (IAL). A área para realização dos testes dispunha de capela de fluxo laminar vertical, por sua vez alojado em sala limpa, com sistema de filtro absoluto e pressão positiva. Todo o trabalho foi desenvolvido empregando material

esterilizado e técnicas assépticas. Após a esterilização, os implantes foram cortados em fragmentos de cerca de 0,5 cm x 0,5 cm.

Foi utilizada a linhagem celular NCTC clone 929 (ATCC-CCL1), células de tecido conjuntivo de camundongo. As células foram cultivadas em meio mínimo de Eagle (MEM), suplementado com 0,1 mM de aminoácidos não essenciais, 1,0 mM de piruvato de sódio e 10% de soro fetal bovino (MEM c/ 10% SFB).

A manutenção da linhagem foi feita a 37 °C em garrafas de 250 mL, com repiques a intervalos médios de 72 horas. A dispersão da monocamada celular foi efetuada utilizando uma associação de tripsina 0,20% e versene 0,02% (ATV). Após a dispersão, as células foram novamente suspensas no meio de cultura e distribuídas, tanto nas garrafas destinadas a manutenção como em placas de Petri de 60 mm de diâmetro.

As células foram semeadas em volumes de 5 mL, em triplicata, nas placas de Petri (60x15mm), na concentração de $3,0 \times 10^5$ céls/ mL e incubadas por 48 horas a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após este período, com a monocamada de células já formada, o meio de cultura foi desprezado e adicionado volume de 5 mL de meio em cada placa de Petri. Este meio compunha-se de partes iguais de MEM duas vezes concentrado e agar (BBL-Becton Dickinson) a 1,8% contendo 0,01% de vermelho neutro (Merck), como corante vital. No momento do uso o agar foi fundido e misturado com o MEM, ambos à temperatura de 44 ± 1 °C. As amostras (fragmentos de 0,5 cm x 0,5 cm) foram depositadas sobre a camada de agar, antes de sua completa solidificação. As placas de Petri foram incubadas novamente em estufa com 5% de CO₂ a 37 °C por 24 horas.

Como controles positivos foram utilizados fragmentos de látex e como controles negativos discos de papel de filtro de natureza comprovadamente atóxica, respeitando a dimensão de 0,5 cm de diâmetro para ambos.

As placas foram analisadas macroscopicamente e microscopicamente e a citotoxicidade constatada por halo claro ao redor do material testado. Quando presentes, os diâmetros destes halos foram cuidadosamente medidos empregando paquímetro calibrado.

A graduação da toxicidade foi realizada conforme orientação da United States Pharmacopeia (2004), onde estão descritos os diferentes índices de zona (IZ): IZ=0 corresponde à ausência de efeito sob a amostra, IZ=1 alguma alteração ou degeneração celular sob a amostra, IZ=2 halo claro somente sob a amostra, IZ=3 halo entre 0,5 e 1,0 cm ao redor da amostra, IZ=4 para halo claro maior que 1,0 cm.

Método de Captura do Vermelho Neutro

Para avaliação da citotoxicidade pelo método de captura do vermelho neutro, foram obtidos extratos a partir das amostras de implantes de silicone. As amostras foram cortadas em fragmentos perfazendo uma área de aproximadamente 4 cm², colocados em 2,5 mL de Eagle sem soro a 37 °C por 24 horas. Após obtenção do extrato, este foi diluído a 50%, 25%, 12,5% e 6,25%.

Uma suspensão da linhagem celular NCTC clone 929, na concentração de 2,5x10⁵ células/ mL foi semeada, em volumes de 0,2 mL, nas microplacas de 96 poços de fundo chato. Estas foram então incubadas por 24 horas, a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ para a formação da monocamada celular. Após este período, o meio de cultura foi desprezado e adicionado a cada poço 0,2 mL de meio contendo os extratos e suas diluições das amostras a serem testadas e dos respectivos controles. Os extratos e suas diluições, bem como os controles foram testados em triplicata. As placas foram novamente incubadas em estufa com 5% CO₂ a 37 °C por 24 horas.

Depois do período de incubação o meio contendo as amostras foi desprezado e 0,2 mL de meio de Eagle sem soro, contendo 50 µg de vermelho

neutro/mL foi adicionado a cada poço. Seguiu-se a incubação das microplacas por três horas a 37 °C para permitir a captação do vermelho neutro pelas células vivas. Este meio foi preparado 24 horas antes e mantido em estufa a 37 °C durante a noite, sendo que imediatamente antes do uso foi centrifugado a 1500 rpm durante 15 minutos para eliminar os cristais formados.

Decorrido o tempo de captura o meio foi removido e as células lavadas duas vezes com 0,2 mL de solução fosfatada tamponada pré aquecido a 37 °C. Seguiu-se outra lavagem com 0,2 mL de solução aquosa de formaldeído a 40% e 1% de CaCl_2 , para remover o corante não incorporado. Esta solução foi a seguir descartada e 0,2 mL de solução aquosa de 1% de ácido acético e 50% de etanol foi adicionada para extrair o corante. Após 10 minutos de agitação, a placa foi levada para leitura da densidade óptica num leitor de microplacas da marca Organon Teknika Reader 530 com filtro de 540 nm.

Como controle positivo foi utilizado extrato de fragmentos de látex e como controle negativo extrato de papel de filtro atóxico. Os extratos foram preparados em meio de Eagle com 5% de soro fetal bovino (SFB) na proporção de 0,1g de látex/ mL e 4 cm² de papel de filtro/ mL incubados a 37 °C por 24 horas. Após este período, o extrato do controle positivo foi diluído na proporção de 2:1 e considerado como solução mãe, o extrato do controle negativo foi utilizado diretamente. Os controles foram avaliados nas concentrações de 100%, 50%, 25%, 12,5% e 6,25%. Também foi feito controle das células, onde só foi colocado o meio de Eagle com 5% de SFB.

A porcentagem de viabilidade celular foi obtida com divisão da média da densidade óptica de cada diluição pela média da densidade óptica do controle de células vezes 100. O índice de citotoxicidade IC_{50} foi calculado pela construção de uma curva dose-resposta obtida pela projeção da porcentagem de viabilidade celular em função da concentração da amostra utilizando o programa de computador Microsoft Excel.

4.2.2.2 Detecção de endotoxinas bacterianas

Para a realização do teste de endotoxina bacteriana foram empregadas 10 unidades de cada um dos tipos de implantes, esterilizados pelos diferentes processos. Empregou-se o *kit* de reagentes da Endosafe®, constituído do Limulus Amebocyte Lysate (LAL) com sensibilidade (λ) de 0,125 UE/ mL (Unidades de Endotoxina/mL), Endotoxina Padrão de Controle (*E.coli* O55:B5), água apirogênica e tubos de vidro apirogênicos de 8 x 70 mm. Trabalhou-se com técnica asséptica com auxílio de bico de Bunsen e dispositivos auxiliares previamente despirogenizados em estufa marca Nova Ética modelo 400, à temperatura de 200 °C por 3 horas.

O reagente foi reconstituído conforme orientação do fabricante com 5,2 mL de água apirogênica, sendo a solução obtida transferida em volumes de 0,1 mL para tubos apirogênicos. A endotoxina padrão foi reconstituída com 4 mL de água apirogênica obtendo-se uma concentração de 20 UE/ mL.

As amostras estéreis de implantes de silicone gel, com volume médio de 220 mL, foram cortadas com tesoura em fragmentos perfazendo cerca de ¼ do implante e submetidos à extração empregando 40 mL de água apirogênica, por 1 hora em agitador rotativo marca Superohm, modelo AS (UNITED STATES, 2004).

Para as amostras de implantes de silicone pré-cheios com solução salina, com volume médio de 700 mL, o teste foi realizado após transferência do líquido de enchimento para erlenmeyer apirogênico e posterior transferência dos fragmentos do invólucro para o mesmo frasco, sendo em seguida submetidos à agitação por 1 hora em agitador rotatório marca Superohm, modelo AS.

Imediatamente após a extração, procedeu-se ao teste com o líquido extrator empregando o limite para endotoxina de 0,5 UE/ mL (FDA, 1987). Como controle

negativo foi utilizada a água apirogênica e o controle positivo consistiu de volumes iguais do extrato e da solução de endotoxina padrão contendo 0,5 UE/mL, perfazendo uma concentração final de endotoxina de 2λ (0,25 UE/mL).

Volumes de 0,1 mL da amostra, controle positivo e negativo foram pipetados em duplicata, para tubos contendo 0,1 mL do reagente. Os tubos foram colocados em banho-maria Unique modelo USC-2800A, à temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, por 1 hora. A avaliação foi feita pela inversão dos tubos a 180° , observando-se a formação ou ausência de gel, respectivamente presença ou ausência de endotoxinas.

4.2.3 Teste de *Bleed*

O teste de *bleed* foi realizado segundo norma ASTM 703-96 para avaliar a migração do gel de silicone através do invólucro de silicone, tendo sido realizado em ambiente com temperatura e umidade registradas semanalmente, para atendimento à norma utilizada. Para a realização do teste de *bleed* foram utilizados implantes de silicone de superfície lisa, superfície texturizada e superfície revestida com espuma de poliuretano esterilizados por calor seco e implantes de superfície lisa esterilizados por calor seco e óxido de etileno.

O teste foi realizado empregando discos de silicone com área de $19,635 \text{ cm}^2$, medindo 50 mm de diâmetro, com espessura de $3,125 \text{ mm} \pm 0,025 \text{ mm}$ e com dureza de 70 Shore A, que serviram como suporte para os implantes.

Os discos de silicone foram limpos, por imersão em álcool isopropílico, sendo posteriormente mantidos, por 24 horas, em estufa incubadora marca Nova Ética Modelo 410 D, à temperatura de $43 \pm 2^\circ\text{C}$ para estabilização. Após este período foram pesados em balança analítica marca AND, modelo HA-202M com precisão de 0,00001 g.

Quanto aos implantes de silicone, estes tiveram a superfície limpa com tecido sintético de fibra contínua embebido com álcool isopropílico, sendo posteriormente mantidos, para secagem, à temperatura ambiente de $22^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ com umidade relativa de $68\% \pm 6\%$, por duas horas.

Após a secagem, os implantes foram depositados sobre os discos de silicone já pesados (Figura 10), acondicionados em placas de Petri previamente limpas com álcool isopropílico, sendo os conjuntos implante/discos de silicone suporte e discos-controle transferidos para estufa incubadora marca Nova Ética Modelo 410 D, mantida à temperatura de $43 \pm 2^\circ\text{C}$. Foram empregadas 10 unidades

de cada tipo de implante citados anteriormente, perfazendo um total de 50 discos de silicone suporte e 6 discos controle (sem deposição de implante).

Os conjuntos e os discos-controle foram mantidos na estufa, sendo retirados após 7 dias e mantidos à temperatura ambiente por 1 hora. Decorrido este tempo, os implantes foram removidos e os discos de silicone suporte e controle pesados. Após a pesagem os implantes foram novamente depositados sobre os discos de silicone, retornando-se os conjuntos juntamente com os discos-controle à estufa. Esta operação repetiu-se a intervalos de 7 dias, perfazendo um total de 8 semanas de avaliação.

A diferença entre os valores de pesagem obtidos semanalmente, para os discos-controle e discos-suporte, permitiu o cálculo da massa de gel difundida. O cálculo foi realizado empregando a fórmula descrita na norma ASTM F 703-96, adaptada para obtenção da massa difundida por unidade de implante.

Figura 10 - Teste de *bleed* : deposição dos implantes de silicone gel de superfície lisa (esquerda) e implantes de silicone com superfície revestida com poliuretano (direita) sobre os discos de silicone

5. Resultados

5.1 Métodos Microbiológicos

5.1.1 Percentuais de Recuperação

As Tabelas 1 a 6 apresentam os resultados dos percentuais médios de recuperação para cada tipo de implante, calculados empregando os percentuais de recuperação para cada microrganismo.

Tabela 1 – Percentual médio de recuperação da contagem microbiana obtido para os invólucros dos implantes de silicone gel com superfície lisa

	Percentual de Recuperação (%)	
	Por Microrganismo	Médio
<i>S.aureus</i> 6538	80	76
<i>P.aeruginosa</i> 9027	73	
<i>B.subtilis</i> 6633	74	
<i>C.albicans</i> 10231	77	

Tabela 2 – Percentual médio de recuperação da contagem microbiana obtido para os invólucros dos implantes de silicone gel com superfície texturizada

	Percentual de Recuperação (%)	
	Por Microrganismo	Médio
<i>S.aureus</i> 6538	77	73
<i>P.aeruginosa</i> 9027	67	
<i>B.subtilis</i> 6633	69	
<i>C.albicans</i> 10231	80	

Tabela 3 – Percentual médio de recuperação da contagem microbiana obtido para os invólucros dos implantes de silicone gel com superfície revestida com poliuretano

	Percentual de Recuperação (%)	
	Por Microrganismo	Médio
<i>S.aureus</i> 6538	78	73
<i>P.aeruginosa</i> 9027	67	
<i>B.subtilis</i> 6633	67	
<i>C.albicans</i> 10231	79	

Tabela 4 – Percentual médio de recuperação da contagem microbiana obtido para as embalagens primárias de policarbonato (blíster)

	Percentual de Recuperação (%)	
	Por Microrganismo	Médio
<i>S.aureus</i> 6538	87	96
<i>P.aeruginosa</i> 9027	98	
<i>B.subtilis</i> 6633	99	
<i>C.albicans</i> 10231	98	

Tabela 5 – Percentual médio de recuperação da contagem microbiana do líquido de enchimento obtido para os implantes de silicone pré-cheios com solução salina

	Percentual de Recuperação (%)	
	Por Microrganismo	Médio
<i>S.aureus</i> 6538	100	100
<i>P.aeruginosa</i> 9027	99	
<i>B.subtilis</i> 6633	100	
<i>C.albicans</i> 10231	100	

Tabela 6 – Percentual médio de recuperação da contagem microbiana da embalagem primária de filme plástico obtido para os implantes de silicone pré-cheios com solução salina

	Percentual de Recuperação (%)	
	Por Microrganismo	Médio
<i>S.aureus</i> 6538	91	94
<i>P.aeruginosa</i> 9027	95	
<i>B.subtilis</i> 6633	94	
<i>C.albicans</i> 10231	96	

5.1.2 Biocarga dos implantes

As Tabelas 7, 8, 9, e 10 apresentam os resultados da biocarga dos implantes não estéreis.

Tabela 7 – Valores da biocarga dos implantes de silicone gel com superfície lisa

Implantes	UFC		
	Invólucro	Embalagem de Policarbonato	Total
1	ND	ND	ND
2	02	ND	02
3	ND	ND	ND
4	16	02	18
5	ND	ND	ND
6	ND	ND	ND
7	06	ND	06
8	03	ND	03
9	19	ND	19
10	14	03	17
11	14	ND	14
12	02	ND	02
13	03	ND	03
14	02	ND	02
15	ND	ND	ND
16	27	ND	27
17	ND	ND	ND
18	02	ND	02
19	11	ND	11
20	18	08	26
21	ND	ND	ND
22	ND	ND	ND
23	02	ND	02
24	04	ND	04
25	02	ND	02
26	07	ND	07
27	03	ND	03
28	ND	ND	ND
29	ND	ND	ND
30	11	ND	11

ND – Não detectado

Tabela 8 – Valores da biocarga dos implantes de silicone gel com superfície texturizada

Implantes	UFC		Total
	Invólucro	Embalagem de Policarbonato	
1	04	02	06
2	ND	ND	ND
3	04	ND	04
4	27	ND	27
5	06	ND	06
6	15	ND	15
7	08	ND	08
8	02	ND	02
9	20	04	24
10	07	ND	07
11	42	ND	42
12	06	05	11
13	02	ND	02
14	06	08	14
15	03	ND	03
16	04	02	06
17	10	ND	10
18	06	ND	06
19	102	10	112
20	ND	ND	ND
21	03	ND	03
22	04	ND	04
23	ND	ND	ND
24	07	ND	07
25	02	ND	02
26	04	ND	04
27	07	05	12
28	ND	ND	ND
29	06	ND	ND
30	11	10	21

ND – Não detectado

Tabela 9 – Valores da biocarga dos implantes de silicone gel com superfície revestida com espuma de poliuretano

Implantes	UFC		
	Invólucro	Embalagem Policarbonato	Total
1	ND	04	04
2	59	ND	59
3	22	ND	22
4	ND	ND	ND
5	ND	04	04
6	03	ND	03
7	03	ND	03
8	03	ND	03
9	08	ND	08
10	12	ND	12
11	30	ND	30
12	05	10	05
13	07	ND	07
14	31	ND	31
15	03	ND	03
16	07	06	13
17	26	ND	26
18	06	ND	06
19	03	06	09
20	03	ND	03
21	04	ND	04
22	03	ND	03
23	03	ND	02
24	03	ND	03
25	17	ND	17
26	03	ND	03
27	03	08	11
28	03	ND	03
29	03	ND	03
30	18	03	21

ND – Não detectado

Tabela 10 – Valores da biocarga dos implantes de silicone pré-cheios com solução salina

Implantes	UFC		
	Líquido de enchimento	Invólucro de silicone	Embalagem primária de filme plástico
1	ND	04	ND
2	ND	ND	ND
3	ND	ND	ND
4	ND	ND	02
5	ND	09	05
6	ND	01	ND
7	ND	02	ND
8	ND	02	ND
9	ND	ND	ND
10	ND	ND	ND
11	ND	03	03
12	ND	10	08
13	ND	04	03
14	ND	ND	ND
15	ND	05	17
16	ND	ND	ND
17	ND	N	01
18	ND	01	ND
19	ND	04	08
20	ND	ND	04
21	ND	04	04
22	ND	01	ND
23	ND	27	ND
24	ND	ND	ND
25	ND	15	11
26	ND	01	01
27	ND	02	01
28	ND	29	01
29	ND	ND	01
30	ND	01	ND
Valor médio	ND	4,17	2,33

ND – Não detectado

Os valores médios obtidos da Tabela 10 foram corrigidos empregando os percentuais de recuperação para o líquido de enchimento (Tabela 5), invólucro de silicone texturizado (Tabela 2) e embalagem plástica (Tabela 6), resultando nos valores apresentados na Tabela 11. O valor da carga microbiana total foi utilizada para a determinação das dose de verificação e esterilização, para a radiação gama.

Tabela 11 - Determinação da carga microbiana total dos implantes de silicone pré-cheios com solução salina

	Carga Microbiana (UFC)
Líquido de Enchimento	0,00
Invólucro de Silicone	111,12
Embalagem Interna	12,39
Total	123,51

Tabela 12 – Identificação dos microrganismos isolados constituintes da biocarga dos implantes não estéreis

	Coloração de Gram
<i>Moraxella</i> sp	(-)
<i>Micrococcus luteus</i>	(+)
<i>Bacillus cereus</i>	(+)
<i>Staphylococcus auricularis</i>	(+)
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	(+)
Levedura	NA
NA – não aplicável	

Na validação do teste de esterilidade confirmou-se a ausência de atividade bacteriostática e/ou fungistática para diferentes tipos de implantes.

Tabela 13 – Tubos com crescimento microbiano no teste de esterilidade para os implantes de silicone submetidos à esterilização por calor seco e óxido de etileno

Implante de Silicone	Calor Seco		Óxido de Etileno	
	Caseína soja	Tioglicolato	Caseína soja	Tioglicolato
Superfície Lisa	0/100	0/100	0/100	0/100
Superfície Texturizada	0/100	0/100	0/100	0/100
Revestido com Poliuretano	NA	NA	0/100	0/100
NA – Não Aplicável				

Tabela 14 – Tubos com crescimento microbiano no teste de esterilidade para os implantes de silicone submetidos à esterilização por radiação gama

	Dose de Verificação (SAL 10^{-2})		Dose de Esterilização (SAL 10^{-6})	
	Caseína soja	Tioglicolato	Caseína soja	Tioglicolato
Implante de Silicone pré-cheio com solução salina	2/100	0/100	0/100	0/100

O resultado do teste de esterilidade para os implantes pré-cheios com solução salina, quando empregada dose de verificação, apresentou 2 tubos com crescimento microbiano, estando dentro do critério de aceitação do teste, segundo

a norma ISO 11137: 1995 – *Sterilization of health care products – Requirements for Validation and routine control – Radiation sterilization* (Método 1), sendo a eficácia da dose de esterilização confirmada posteriormente (Tabela 14).

5.2 Métodos Biológicos

5.2.1 Citotoxicidade *in vitro*

Método de Difusão

Todas as amostras, abrangendo os 4 tipos de implantes, esterilizadas pelos diferentes processos, mostraram-se não irritantes com IZ = 0, ou seja, ausência de efeito citotóxico sob a amostra.

Figura 11 - Teste de citotoxicidade por difusão em agar, placas com controle negativo (esquerda) e controle positivo (direita)

Figura 12 – Teste de citotoxicidade por difusão em agar, placas com amostras de implantes de silicone gel e pré-cheio com solução salina, mostrando ausência de toxicidade

Figura 13 - Células NCTC clone 929 coradas pelo vermelho neutro. Fotomicrografia (100x)

Figura 14 – Teste de citotoxicidade por difusão em agar, zona limítrofe do halo de contraste, células NCTC clone 929. Fotomicrografia (100x)

Método de Captura do Vermelho Neutro

Os gráficos mostrados nas Figuras 15 a 17 apresentam as porcentagens de viabilidade das células NCTC clone 929. Os implantes foram agrupados em função dos processos de esterilização.

Figura 15 - Método de captura do vermelho neutro: implantes de silicone gel com superfície lisa e texturizada esterilizados por calor seco

Figura 16 - Método de captura do vermelho neutro: implantes de silicone gel com superfície lisa e texturizada e revestida com poliuretano esterilizados por óxido de etileno

Figura 17 - Método de captura do vermelho neutro: implantes de silicone pré-cheios com solução salina esterilizados por radiação gama

Figura 18 - Teste de citotoxicidade pelo método de captura do vermelho neutro: placas com 96 poços: (A) amostra, (CC) controle de células, (-) controle negativo, (+) controle positivo

5.2.2 Endotoxinas Bacterianas

Para o teste de endotoxina bacteriana, não ocorreu gelificação nos tubos contendo as amostras e o reagente LAL, o que garante a ausência de endotoxinas para o limite especificado.

5.3 Método Físico

5.3.1 Teste de *bleed*

Tabela 15 – Valores da massa de gel ($\text{mg}/\text{cm}^2/\text{semana}$) difundida através do invólucro de silicone para implantes de silicone gel esterilizados por calor seco

Implante	Esterilização por calor seco		
	Massa de gel difundida ($\text{mg}/\text{cm}^2/\text{semana}$)		
	Superfície Lisa	Superfície Texturizada	Superfície Revestida c/ Poliuretano
1	0,84887	0,16310	0,03139
2	0,77916	0,18723	0,03571
3	0,82461	0,18144	0,02979
4	0,81876	0,17133	0,03113
5	0,88426	0,17539	0,03349
6	0,60020	0,17399	0,02731
7	0,91883	0,17876	0,03514
8	0,91406	0,24083	0,03489
9	0,68774	0,24892	0,03145
10	0,74096	0,27330	0,03215
Valor Médio	0,80175	0,19943	0,03225

Tabela 16 – Valores da massa de gel ($\text{mg}/\text{cm}^2/\text{semana}$) difundida através do invólucro de silicone para implantes de silicone gel com superfície lisa esterilizados por calor seco e óxido de etileno

Implante	Implantes de Silicone de Superfície Lisa pré-cheios com silicone gel	
	Massa de gel difundida ($\text{mg}/\text{cm}^2/\text{semana}$)	
	Calor Seco	Óxido de Etileno
1	0,64303	1,25819
2	1,04671	1,15009
3	1,07784	1,16957
4	1,01182	1,32892
5	1,17467	1,33178
6	1,18078	1,34942
7	0,76952	1,13743
8	0,86693	1,14239
9	0,96204	1,00125
10	0,71630	0,986801
Valor Médio	0,94496	1,18558

Figura 19 - Teste de *bleed*: médias e desvios padrão da massa de gel difundida, a cada semana, dos implantes esterilizados por calor seco

Figura 20 - Teste de *bleed*: médias e desvios padrão da massa de gel difundida, a cada semana, dos implantes de superfície lisa esterilizados por calor seco e óxido de etileno.

6. Discussão

Garantir a segurança do paciente receptor de um implante é fundamental, e esta preocupação deve se iniciar quando da concepção ou estudo de desenvolvimento do material ou biomaterial a ser empregado, passando pelo desenvolvimento dos processos que incluem moldagem, limpeza e esterilização. Estabelecidas as diretrizes do desenvolvimento, iniciam-se as produções piloto, os ensaios analíticos e registro do produto.

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.

Ao se considerar a questão da segurança, não apenas em função da qualidade do produto, mas com foco no paciente, surgem aspectos inerentes ao procedimento cirúrgico, tais como ambiente da sala cirúrgica, treinamento e qualificação de profissionais de saúde envolvidos, condições de anti-sepsia, comprovação da esterilidade dos materiais auxiliares empregados ou ainda a reutilização de materiais invasivos. Esta última se constitui em prática comum, inclusive em hospitais de elevado padrão, mas indefensável sob a ótica da segurança do paciente. Infelizmente, no geral é extremamente difícil caracterizar a causa de uma infecção de sítio cirúrgico. Outrossim, sabe-se que, em se tratando de pacientes portadores de implantes, existe o risco de colonização do biomaterial, com a possível evolução do quadro infeccioso e em casos extremos causando a morte. Por vezes cateteres, “shunts”, implantes ortopédicos e de contorno, entre outros, têm que ser explantados e muitos dos relatos atribuem esta ocorrência a infecções nosocomiais (ABLAZA; LA TRENTA, 1998; FECURI Jr, 2000).

Esperando que a qualidade nos estabelecimentos de saúde torne-se inquestionável e que as práticas de reutilização que ocorrem, muitas vezes por

motivos escusos, sejam banidas, deve-se também exigir dos produtores dos materiais, entre os quais os implantes, atendimento aos aspectos relativos à qualidade dos produtos que disponibilizam para o consumidor.

Assim no aspecto microbiológico, para qualquer processo esterilizante aplicável a materiais de diversas naturezas, é importante que se trabalhe de forma a manter controlados os níveis de biocarga. Tais níveis por sua vez estarão na dependência do ambiente de trabalho com *layout* adequado, provido de filtros absolutos, pressão positiva; operadores qualificados, treinados e motivados; sistema de suprimento de água de qualidade controlada; matérias-primas com padrão sanitário adequado; fatores específicos planejados, processos de limpeza, produção, esterilização e ensaios analíticos validados. Porém, antes da seleção de um processo de esterilização é importante considerar o efeito que o mesmo terá sobre a estabilidade do material a ser submetido ao processo esterilizante (GOGOLEWSKI; MAINIL-VARLET, 1996).

Quanto à validação dos ensaios analíticos utilizados neste estudo, as Tabelas 1 a 6 mostram os valores dos percentuais de recuperação determinados com vistas à quantificação da biocarga dos implantes. Esta quantificação se constitui em etapa de extrema importância, uma vez, que em função das diferentes superfícies a serem avaliadas, seja quanto à textura, conformação, área, torna-se imprescindível utilização de metodologia que permita a remoção das células aderidas (PINTO, 1995). Um recurso bastante útil é o emprego do Tween 80, acrescido ao líquido extrator com o objetivo de favorecer o descolamento das células microbianas aderidas às superfícies.

Os menores percentuais de recuperação encontrados para os invólucros de silicone dos três diferentes tipos, variando de 73% a 76%, quando comparados com as embalagens primárias (94% e 96%), podem ser resultantes tanto da irregularidade das superfícies, quanto do favorecimento da adesão microbiana pelo silicone e poliuretanos (ARCIOLA *et al.*, 1995; FLEMMING *et al.*, 2000). A

escolha dos microrganismos empregados na determinação dos percentuais de recuperação teve como objetivo a abrangência de características distintas, quando então se trabalhou com uma bactéria Gram-negativa (*P.aeruginosa*) e Gram-positiva (*S.aureus*), um microrganismo formador de esporos (*B. Subtilis*) e uma levedura (*C.albicans*).

O conhecimento da biocarga dos implantes de silicone gel (Tabelas 7 a 9), embora não tenham sido utilizados na determinação dos parâmetros dos processos de esterilização empregados (calor seco e óxido de etileno), constituiu-se em fator crucial para a eficácia da esterilização, uma vez que, para uma população microbiana exposta a um processo letal, a perda da viabilidade ocorre de maneira regular, ou seja, uma proporção constante da população sobrevivente é inativada a cada incremento de exposição ao agente letal (PINTO; KANEKO; OHARA, 2000) e sendo esta carga microbiana baixa, há maior probabilidade desta exposição resultar na destruição da população de microrganismos, atingindo a condição de esterilidade.

Além disto, o conhecimento da biocarga do produto pode ser empregado como instrumento do programa de monitoração ambiental, na avaliação da eficiência dos processos de limpeza para remoção de microrganismos, bem como no controle dos processos de produção de produtos estéreis (ISO 11737-1,1995). Consiste, ainda, em recurso interessante no treinamento e motivação do pessoal envolvido nas etapas industriais correspondentes (BEER, 1995, JONES, 1997).

Quanto aos implantes pré-cheios com solução salina, os valores da biocarga mostrados na Tabela 10 foram utilizados para a determinação das doses de verificação e esterilização de acordo com as diretrizes para validação e controle da esterilização por radiação (ISO 11137:1195). Utilizou-se o Método 1 descrito nesta norma, onde a determinação das duas doses foi realizada empregando a Distribuição Padrão de Resistências (SDR) levando em conta o valor da biocarga obtida para os implantes (Tabela 11). Este método tem sofrido

questionamentos, pois sendo a dose de radiação estabelecida em função da resistência de uma população padrão, esta pode não corresponder à resistência dos microrganismos constituintes da biocarga do produto.

A resistência da biocarga de dispositivos médicos foi avaliada por Takehisa *et al.* (1998) com o objetivo de determinar a dose de radiação para esterilização em função do valor D_{10} . Avaliando os resultados, os autores concluíram que para biocargas abaixo de 10 UFC/ dispositivo, torna-se interessante a determinação da resistência da biocarga presente no produto, pois esta pode ser maior que a resistência de uma população padrão. Contrapondo ao relatado por estes autores, estudo onde também foi determinada a resistência da biocarga de amostras constituídas de gaze de algodão demonstrou que a resistência da biocarga determinada experimentalmente foi menor que a Distribuição Padrão de Resistências da norma ISO 11137 (YAN *et al.*, 2002).

Estes relatos conduzem à reflexão quanto à aplicação do Método 1 da norma ISO 11137, pois se torna importante garantir a correta quantificação da carga microbiana, já que em caso de estabelecimento de valores quantitativos e qualitativos subestimados da biocarga, será determinada uma dose de verificação ineficaz comprometendo a validação do processo de esterilização.

Além da quantificação da biocarga, é extremamente importante a identificação dos microrganismos que a constituem. Esta informação permite avaliar a origem da contaminação (pessoal, insumos e matérias-primas e/ou do processo de produção), bem como proporciona o conhecimento da patogenicidade destes contaminantes.

Os microrganismos isolados das amostras dos implantes (Tabela 1) caracterizam-se por serem oriundos, em sua maioria, da microbiota do corpo humano. A *Moraxella spp* constitui parte da microbiota normal de superfícies mucosas, sendo considerada de baixo potencial patogênico, é também o único

microrganismo Gram-negativo isolado das amostras. Por sua vez, o *Micrococcus luteus* faz parte da microbiota transitória da pele aparecendo como contaminante de espécimes clínicos. O *Staphylococcus auricularis* é encontrado no conduto auditivo e é rara sua implicação em infecções, o mesmo não ocorrendo com o *Staphylococcus saprophyticus* que é encontrado, com frequência, associado a quadros infecciosos. As leveduras são consideradas como microbiota normal da orofaringe e trato gastrointestinal (KONEMAN *et al.*, 2001). O *Bacillus cereus* é uma bactéria considerada inofensiva, comumente encontrada no solo e na vegetação e se presente em um produto farmacêutico é indicativo de contaminação por poeira (HUGO, 1990).

Outro aspecto, inerente à segurança biológica, também atrelado à contaminação microbiana é a presença de endotoxinas bacterianas que, dependendo do nível de contaminação podem desencadear uma reação pirogênica. Coincidentemente, o primeiro grupo de produtos para os quais o FDA liberou o teste *in vitro* para detecção de endotoxinas bacterianas, em substituição ao método convencional em coelhos foram os *medical devices*, ou correlatos de medicamentos (prefere-se esta nomenclatura, respaldada na Lei 6.360/76 e Decreto 79.034/77 ao termo “produto para saúde” adotado nas RDC e RE).

Os resultados obtidos para todos os tipos de implantes, caracterizando a ausência de endotoxinas bacterianas, são coerentes ao se considerar a contaminação microbiana relativamente baixa (Tabelas 7 a 10), assim como os microrganismos contaminantes (Tabela 12), pois tem-se prevalência de espécies Gram positivas que se caracterizam por não possuírem o lipopolissacarídeo.

A eficácia dos processos de esterilização por calor seco, óxido de etileno e radiação gama pode ser comprovada empregando o teste de esterilidade (Tabelas 13 e 14). Quando da submissão a um processo esterilizante deve se levar em conta as possíveis alterações físicas a que estão sujeitos os diferentes materiais. Na Tabela 13 observa-se o emprego do óxido de etileno na esterilização dos três

tipos de implantes de silicone gel. O mesmo não ocorre quando da utilização do calor seco, uma vez que este processo, em função da alta temperatura, promove alteração da cor do revestimento de poliuretano, alterando as características estéticas do implante. Não se justifica o emprego da radiação gama, como agente esterilizante para os implantes de silicone gel, pois este processo acarretaria a alteração do gel de silicone, impossibilitando o uso deste tipo de implante (GOGOLEWSKI; MAINIL-VARLET, 1996, ZHANG *et al.*, 1996).

Neste estudo justifica-se, para a esterilização por calor seco, a definição da temperatura de 121 °C por se constituir em condição usualmente especificada. Embora esta temperatura seja empregada para o calor úmido, ao se aliar um maior tempo de exposição ao empregar o calor seco (36 horas), teve-se energia de ativação que propiciou a inativação microbiana e garantiu a preservação das características físicas do material esterilizado.

Em adição à questão da segurança do paciente há que se considerar a ausência de fatores tóxicos, presentes ou liberados pelo material implantado, que possam comprometer os tecidos ou células vizinhas ao implante. Em se tratando o silicone de material com amplo emprego clínico com vários relatos de avaliações clínicas (SMAHEL, 1978; COLEMAN; FOO; SHARPE 1991; HAKELIUS; OLSEN, 1992; SIGGELKOW *et al.*, 2003), não se procedeu a ensaios de implantes empregando animais de laboratório. Tal decisão, consoante com a tendência da ética em experimentação animal, também é respaldada por experiência prévia relatada por Caffee (1990). O autor, empregando coelhos, avaliou as reações promovidas por implantes de silicone, que não permitiram conclusões quanto à reprodução dos resultados em humanos.

A disposição de não se trabalhar com animais teria sido alterada caso qualquer dos resultados da avaliação da citotoxicidade *in vitro*, empregando culturas celulares, evidenciasse resultados positivos. Mesmo empregando o método por difusão em agar ou de captura de vermelho neutro, em nenhum dos casos ou amostras obteve-se resultados comprometedores.

As figuras 11 e 12 mostram, respectivamente, a avaliação macroscópica dos controles positivo e negativo e a avaliação das amostras de implantes de silicone gel e pré-cheios com solução salina, pelo método de difusão em camada de agar empregando a linhagem celular estabelecida NCTC clone 929 (Figura 13). A figura 14 mostra a zona limítrofe do halo formado pelo controle positivo, ausente para todas as amostras de implantes.

A linhagem NCTC clone 929 foi escolhida por ser a preconizada em bibliografia oficial (ASTM, 1995, UNITED STATES, 2004) e também, por se tratar, de uma linhagem celular estabelecida caracterizando-se por garantir a reprodutibilidade de resultados intralaboratoriais e permitir a comparação em estudos interlaboratoriais (PIZZOFERRATO *et al.*, 1994). O uso de células com origem e características bem definidas aumenta o potencial em prever a toxicidade do material a ser avaliado (FRESHNEY, 1987, EISENBRAND *et al.*, 2002).

A comprovação da manutenção da biocompatibilidade, pelos implantes de silicone após esterilização, visa atender ao exigido por normas internacionais (ISO 10933-1: 1997, ISO 14607: 2002), sendo que inúmeras metodologias *in vitro* têm sido empregadas na avaliação da biocompatibilidade de biomateriais (WOEDTKE *et al.*, 2003; PARIENTE, KIM e ATALA, 2001; IGNATUS e CLAES, 1996).

Entre as metodologias para avaliação da biocompatibilidade, o método de difusão em camada de agar, por ser de fácil execução e ter boa reprodutibilidade foi adotado pela American Society for Testing Materials (ASTM). Também a United States Pharmacopeia (2004) preconiza o uso do método de difusão em agar para avaliação da biocompatibilidade de dispositivos médicos, implantes, material de acondicionamento de medicamentos e material de embalagem elastomérico.

Trabalhos mais recentes têm valorizado o método de captura do vermelho neutro, seja na avaliação da biocompatibilidade de correlatos (MONTANARO *et al.*, 2001;

PARIENTE; KIM; ATALA, 2001), como também em estudos abrangendo cosméticos e suas matérias-primas (LEE *et al.*, 2000, JONES *et al.*, 2003). Os resultados obtidos por Cruz (2003), ao avaliar a citotoxicidade *in vitro* de diferentes cosméticos, empregando o método de difusão e o de captura do vermelho neutro, paralelamente ao método *in vivo*, demonstraram haver correlação significativa entre os dois métodos e que o método de difusão quando comparado com o método de captura demonstra maior praticidade e menor custo, tornando vantajosa sua adoção.

No método de captura do vermelho neutro, ao se trabalhar com diferentes concentrações dos extratos obtidos com as amostras, é possível o cálculo do IC₅₀, ou seja, a concentração que promove a perda de 50% da viabilidade celular. Neste estudo, para todas as concentrações testadas as viabilidades celulares obtidas foram superiores a 50%, conforme mostrado nas figuras 15, 16 e 17. Estes resultados somam-se aos obtidos para o método de difusão em camada de agar, garantindo a segurança quanto à ausência de toxicidade dos implantes avaliados.

Embora no método de captura do vermelho neutro, as medidas da toxicidade sejam resultantes da leitura de densidade óptica das amostras e controles realizada em equipamento, a figura 18 permite visualizar os resultados dos extratos das amostras de implantes, com imperceptível diferença de coloração entre os poços contendo as amostras, os controles negativo e de células.

O emprego de implantes de contorno, principalmente os mamários, foi sempre alvo de comentários expressos pela mídia, mesclando por vezes abordagens científicas de pouca credibilidade e algumas situações preconceituosas ou até mesmo maldosas. A questão da segurança dos implantes de silicone resultou em processos litigiosos, onde evidências com falho embasamento científico, influenciaram decisões judiciais com prejuízos financeiros para as empresas, gerando ainda informações distorcidas para pacientes portadoras de implantes de silicone (PRICE; ROSENBERG, 1998).

Ocorre que, há anos, em países de diferentes continentes (CAIRNS; DE VILLIERS, 1980, COLEMAN; 2001, SOUBIRAC; 2002, DREVER, 2003), grupos distintos têm feito uso destes implantes. Entenda-se por grupos distintos aqueles constituídos de mulheres submetidas a processos mutilantes, outras buscando o aperfeiçoamento da silhueta, homens idosos com perda de massa muscular e transexuais com desejo de adquirirem a estética feminina. Particularmente neste último grupo, nem sempre o usuário recorre a profissionais de saúde idôneos, assim como aceita a implantação de silicone de segurança questionável (não grau médico).

Estas situações, embora por vezes grotescas, promoveram a associação dos implantes de silicone a doenças como fibromialgia e lupus, culminando com a proibição, pelo FDA em 1992, do uso dos implantes de silicone gel, exceto em estudos clínicos monitorados. Esta proibição permanece até a presente data, pois este órgão regulador aguarda a finalização de estudos que permitam a aprovação irrestrita do produto (AULT, 2003).

Um dos receios reside na possibilidade de migração do gel de silicone através da cápsula, atingindo o tecido e ocasionando reações do tipo inflamatória, entre outras, com possível risco para o paciente. Para tal comprovação pode ser aplicada norma que avalia a coesão do gel (ISO 14607:2002), assim como estudo que quantifica a migração do gel (*gel bleed*) através do invólucro. O teste de *bleed* foi desenvolvido recentemente e carece de especificações, pois embora não seja citado na literatura, permite o estudo comparativo entre diferentes tipos de implantes (ASTM, 1995).

Os resultados obtidos, quando da comparação dos implantes de silicone gel de superfície lisa, texturizada e revestida com poliuretano, esterilizados por calor seco demonstraram maior taxa de migração do gel para os implantes de superfície lisa (Tabela 15), que mantiveram este comportamento ao longo das oito semanas (Figura 19). A análise estatística empregando o Teste de Tukey mostrou haver

diferença significativa entre as massas de silicone gel difundido através dos invólucros de silicone liso, texturizado e revestido com poliuretano.

Sendo a migração do gel uma das principais causas da contratura capsular, esta diferença encontrada explicaria os relatos de autores que avaliaram clinicamente a contratura capsular em pacientes que receberam implantes de silicone gel com diferentes tipos de superfície.

Hakelius e Ohlsen (1992), em estudo onde as pacientes receberam os dois tipos de implantes de silicone gel, de superfície lisa e texturizada, concluíram que o grau de contratura capsular, após 52 semanas, foi significativamente maior ao redor dos implantes de superfície lisa. O mesmo tipo de resultado foi encontrado por Asplund *et al.* (1996), que avaliaram, após 12 meses, a contratura capsular ao redor dos implantes de superfície lisa e texturizada, implantados em dois grupos distintos de pacientes.

Por se tratar de uma reação que pode levar à perda do implante e suas desagradáveis consequências, a contratura capsular tem sido estudada, visando também a comparação dos diferentes tipos de superfícies dos implantes. Apesar de vários estudos (COLLIS *et al.*, 2000; PITANGUY *et al.*, 1990; HESTER *et al.*, 1988), relatarem a ocorrência de um menor índice de contratura capsular quando do implante de próteses com superfícies texturizada e revestida com poliuretano, não se pode considerar que apenas o tipo de superfície do implante é responsável pelo maior ou menor índice de contratura capsular. Fagrell, Bergren e Tarpila (2001) concluíram, após longo estudo, não haver diferenças significativas entre a contratura capsular promovida ao redor de implantes de superfície lisa e texturizada pré-cheios com solução salina.

Ao realizar o teste de *bleed* visando comparar a migração do gel de silicone de implantes de superfície lisa submetidos à esterilização por calor seco e óxido de etileno obteve-se os resultados mostrados na Tabela 16. A análise estatística,

empregando o teste *t*, demonstrou haver diferença significativa ($p = 0,004$) entre os valores de silicone gel difundido através dos implantes para os dois processos esterilizantes empregados, com maior taxa de migração para aqueles esterilizados por óxido de etileno. Este comportamento se manteve pelas oito semanas de realização do ensaio (Figura 20).

Esta diferença torna-se interessante, pois, a avaliação da esterilidade dos implantes submetidos aos processos de esterilização por calor seco e óxido de etileno resultou na constatação da eficiência dos dois processos, uma vez que não se observou crescimento microbiano nos tubos de meio de cultura contendo as amostras (Tabela 13). Também, os resultados biológicos evidenciaram resultados plenamente satisfatórios para peças submetidas aos diferentes processos esterilizantes.

Por ser o calor seco um processo clássico e bastante eficiente de esterilização, 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), os resultados demonstrados na Tabela 16 conduzem à reflexão sobre a grande vantagem da utilização, em maior escala, deste processo. Esta vantagem, entretanto, favorece o produtor, permanecendo indiferente para o usuário final, o paciente, que acima de qualquer outra entidade deve ser priorizado.

7. Conclusões

- ✓ Os processos de esterilização por calor seco aplicado aos implantes de silicone gel de superfície lisa e texturizada; óxido de etileno empregado na esterilização dos implantes de silicone gel de superfície lisa, superfície texturizada e com revestimento de poliuretano; e por radiação gama usado na esterilização dos implantes pré-cheios com solução salina, se mostraram igualmente eficientes.
- ✓ A baixa carga microbiana dos diferentes tipos de implantes não estéreis empregados neste estudo e a natureza dos contaminantes permitiram o atendimento ao limite de endotoxinas bacterianas especificado para os implantes mamários.
- ✓ Os processos de esterilização por calor seco, óxido de etileno e radiação gama não promoveram alteração da biocompatibilidade dos implantes.
- ✓ Após a esterilização, por calor seco, dos três tipos de implantes de silicone gel, o implante de superfície lisa apresentou a maior taxa de migração do gel quando comparado com os demais implantes (superfície texturizada e superfície revestida com poliuretano).
- ✓ Os implantes de superfície lisa esterilizados por óxido de etileno apresentaram valor de massa de gel difundida maior que quando submetidos ao processo de esterilização por calor seco.

8. Referências Bibliográficas

ABLAZA, V.J.; LA TRENTA, G.S. Late infection of breast prosthesis with *Enterococcus avium*. **Plast. Reconstr. Surg.**, Baltimore, v.102, p.227-230, 1998.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING MATERIALS. Standard test method for agar diffusion cell culture screening for cytotoxicity: designation: F 895-84. Philadelphia: ASTM, 1995, p.276-279.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING MATERIALS. Standard specifications for implantable breast prosthesis: F 703-96. Philadelphia: ASTM, 1996, p.178-185.

ARCIOLA, C.R., CENNI, E., CARAMAZZA, R., PIZZOFEERRATO, A. Seven surgical silicones retain *Staphylococcus aureus* differently *in vitro*. **Biomaterials**, Amsterdam, v.16, n.9, p.681-684, 1995.

ARION, H.G. Présentation d'une prothèse retro-mammaire. J. Soc. Franc. Gynecol, 1965, 35:427 Apud: RHEINGOLD, L.M., YOO, R.P., COURTIS, E.H. Experience with 326 inflatable breast implants. **Plast. Reconstr. Surg.**, Baltimore, v.93, n.1, p.118-122, 1994.

ASHLEY, F.L. Further studies on the Natural-Y breast prosthesis. **Plast. Reconstr. Surg.**, Baltimore, v.49, p.414-419, 1972.

ASPLUND, O., GYLBERT, L., JURELL, G., WARD, C.B.S. Textured or smooth implants for submuscular breast augmentation: a controlled study. **Plast. Reconstr. Surg.**, Baltimore, v.97, n.6, p.1200-1206, 1996.

ATHANASIOU, K.A., NIEDERAUER, G.G., AGRAWAL, C.M. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. **Biomaterials**, Amsterdam, v.17, n.2, p.93-102, 1996.

AULT, A. Silicone breast implants may be close to US approval. **Lancet**, London, v.362, p. 1384, 2003.

BABICH, H.; BORENFREUND, E. Applications of the neutral red cytotoxicity assay to *in vitro* toxicology. **ATLA Altern. Lab. Anim.**, Nottingham, v.18, p.129-144, 1990.

BAKER, J.L. Augmentation mammoplasty. In: GRABS, W.C.; SMITH, J.W., eds. **Plastic surgery**. 3.ed. Boston: Little, Brown. , 1979, 951p.

*De acordo com a NBR 6023/2002 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).
As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 2004*

BARKER, D.E.; SCHULTZ, S.L. The theory of natural capsular contraction around breast implants and how to prevent it. **Aesthetic Plast. Surg.**, New York, v.4, p. 357-361, 1980.

BEER, C.L. Gowning training: use of video recording with microbial assessment. **J.Par. Sci. Technol.**, Philadelphia, v.45, p.128-131, 1995.

BELLAMY, K.; LIMBERT, G.; WATERS, M.G.; MIDDLETON, J. An elastomeric material for facial prostheses: synthesis, experimental and numerical testing aspects. **Biomaterials**, Amsterdam, v.24, p.5061-5066, 2003.

BORENFREUND, E., PUERNER, J.A. Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. **Toxicol. Lett.**, Amsterdam, v.24, p.119-124, 1985. Apud: **Chem. Abstr.**, Columbus, v.102, n.abstr. 180295f, 1985

BRAND, K.G. Polyurethane-coated silicone implants and the question of capsular contracture. **Plast. Reconstr. Surg.**, Baltimore, v.73, p.498, 1984.

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].

BRASIL. Leis, decretos, etc. Lei nº 6360 de 23 de setembro de 1976. **Diário Oficial da União**, Brasília, 4 set. 1976. [O Ministério da Saúde dispõe sobre a vigilância a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos dá outras providências].

CAFFEE, H.H. Textured silicone and capsule contracture. **Ann. Plast. Surg.**, Boston, v.24, p.197-199, 1990.

CAIRNS, T.S.; DE VILLIERS, W. Capsular contracture after breast augmentation – a comparison between gel – and saline-filled prostheses. **S. Afr. Med. J.**, Johannesburg, v.57, p.951-953, 1980.

CENNI, E., CIAPETTI, G., GRANCHI, D., ARCIOLA, C.R., SAVARINO, L., STEA, S., MONTANARO, L., PIZZOFERRATO, A. Established cell lines and primary cultures in testing medical devices *in vitro*. **Toxicol. in Vitro**, Oxford, v.13, p. 801-810, 1999.

CHANDLER, P.J., KASPER, C.S. Frequency and distribution of talc contamination in patients with silicone gel-filled breast implants. **Ann.Plast. Surg.**, Boston, v.51, p.358-360, 2003.

CHAUVEL-LEBRET, D.J.; PELLEN-MUSSI, P.; AUROY, P.; BONNAURE-MALLET, M. Evaluation of the *in vitro* biocompatibility of various elastomers. **Biomaterials**, Amsterdam, v.20, p.291-299, 1999.

COLEMAN, D.J.; FOO, I.T.H.; SHARPE, D.T. Textured or smooth implants for breast augmentation? A prospective controlled trial. **Br. J. Plast. Surg.** Edinburg, v.44, p.444-448, 1991.

COLEMAN, S.R. Injectable silicone returns to the United States. **Aesthetic Surg. J.**, St Louis, v. 21, p. 576-578, 2001.

COLLIS, N., COLEMAN, D., FOO, I., SHARPE, D.T. Ten-year review of a prospective randomized controlled trial of textured versus smooth suglandular silicone gel breast implants. **Plast. Reconstr. Surg.**, Baltimore, v.106, n.4, p.786-791, 2000.

CONTANT, C.M.E., WERSCH, A.M.E.A. van, WIGGERS, T., WAI, R.T.J., GEEL, A.N. van . Motivations, satisfaction, and information of immediate breast reconstruction following mastectomy. **Patient Educ. Couns.**, Princeton, v.40, p.201-208, 2000.

CONVERSE, J.M; LITTLER, J.W., eds. **Reconstructive plastic surgery**. 2.ed. Philadelphia: Saunders, 1977, p.3970.

CRONIN, T.D.; GEROW, F.J. Augmentation mammoplasty: a new "natural feel" prosthesis. **Excerpta Medica**, Amsterdam, p.41-49, 1964.

CRUZ, A.S. **Teste de citotoxicidade in vitro como alternativa ao teste in vivo de Draize na avaliação de produtos cosméticos**. São Paulo, 2003. 107p. (Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo)

DE JONG, W.H.; KALLEWAARD, M.; GOLDHOORN, C.A.; VERHOEF, C.M.; BIJLSMA, W.J.; SCHOUTEN, J.S.A.G.; VAN LOVEREN, H. Long-term exposure to silicone breast implants does not induce antipolymer antibodies. **Biomaterials**, Amsterdam, v.25, p.1095-1103, 2004.

DREVER, J.M. Cohesive gel implants for breast augmentation. **Aesthetic Surg. J.**, St Louis, v. 23, p. 405-409, 2003.

EDGERTON, M.T.; McCLARY, A.R. Augmentation mammaplasty: psychiatric implications and surgical indications. **Plast. Reconstr. Surg.**, Baltimore, v.21, p.279-305, 1958.

EDLUND, U., ALBERTSSON, A.-C., SINGH, S.K., FOGELBERG, I., LUNDGREN, B.O. Sterilization, storage stability and *in vivo* biocompatibility of poly(trimethylene carbonate)/ poly(adipic anhydride) blends. **Biomaterials**, Amsterdam, v.21, p.945-955, 2000.

EISENBRAND, G., POOL-ZOBEL, B., BAKER, V., BALLS, M., BLAAUBOER, B.J., BOOBIS, A., CARERE, A., KEVEKORDES, S., LHUGUENOT, J.-C., PIETERS, R., KLEINER, J. Methods of *in vitro* toxicology. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.40, p.193-236, 2002.

ENGEL, A.; LAMM, S.H.; LAI, S.H. Human breast sarcoma and human breast implantation: a time trend analysis based on SEER data (1973-1990). **J. Clin. Epidemiol.** Oxford, v.48, p.539-544, 1995.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 1998. pt1

FAGRELL, D., BERGGREN, A., TARPILA, E. Capsular contracture around saline-filled textured and smooth mammary implants: a prospective 7.5-year follow-up. **Plast. Reconstr. Surg.**, Baltimore, v.108, n.7, p.2108-2112, 2001.

FECURI Jr, R. Infecção em implantes e próteses. In: FERNANDES, A.T., FERNANDES, M.O.V., RIBEIRO FILHO, N. **Infecção hospitalar e suas interfaces na área da saúde**. São Paulo: Atheneu, 2000, p.702-719.

FERGUSON, J.H. Silicone breast implants and neurologic disorders: report of the practice committee of the american academy of neurology. **Neurology**, Minneapolis, v.48, n.6, p.1504-1507, 1997.

FISCHER, D.; LI, Y.; AHLEMEYER, B.; KRIEGLSTEIN, J.; KISSEL, T. *In vitro* cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. **Biomaterials**, Amsteden, v.24, p.1121-1131, 2003.

FLASSBECK, D.; PFLEIDER, B.; KLEMENS, P.; HEUMANN, K.G.; ELTZE, E.; HIRNER, A.V. Determination of siloxanes, silicon, and platinum in tissues of women with silicone gel-filled implants. **Anal. Bioanal. Chem.**, Heidelberg, v.375, p. 356-362, 2003.

FLEMMING, H.C. Relevance of biofilms for the biodeterioration of surfaces of polymeric materials. **Polym. Degrad. Stab.**, Oxford, v.59, p.309-315, 1998.

FLEMMING, R.G., CAPELLI, C.C., COOPER, S.L., PROCTOR, R.A. Bacterial colonization of functionalized polyurethanes. **Biomaterials**, Amsterdam, v.21, p.273-281, 2000.

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

FRESHNEY, R.I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique**. 2.ed. New York: Wiley-Liss, 1987. 397p.

GARRIDO, L. YOUNG, L. Analysis of periprosthetic capsular tissue from women with silicone breast implants by magic-angle spinning NMR. **Magn. Reson. Med.**, San Diego, v.42, p.436-441, 1999.

GEBELEIN, C.G.; KOBLITZ, F.F. **Biomedical and dental applications of polymers**. New York: Plenum Press, 1981, 492p.

GOGOLEWSKI, S., MAINIL-VARLET, P. The effect of thermal treatment on sterility, molecular and mechanical properties of various polylactides. **Biomaterials**, Amsterdam, v.17, n.5, p.523-528, 1996.

GORNA, K., GOGOLEWSKI, S. The effect of gamma radiation on molecular stability and mechanical properties of new biodegradable polyurethanes for medical applications. **Polym. Degrad. Stab.**, Oxford, v.79, p.465-474, 2003.

GRAZIANO, K.U., SILVA, A., BIANCHI, E.R.F. Limpeza, desinfecção, esterilização de artigos e anti-sepsia. In: FERNANDES, A.T., FERNANDES, M.O.V., RIBEIRO FILHO, N. Infecção hospitalar e suas interfaces na área da saúde. São Paulo: Atheneu, 2000, p.266-305.

GRISTINA, A.G.; NAYLOR, P.; MYRVIK, Q. Infections from biomaterials and implants: a race for the surface. **Med. Prog. Technol.**, Berlin, v. 14, p.205-224, 1988-1989.

GUESS, W.L.; ROSENBLUTH, S.A.; SCHMIDT, B.; AUTIAN, J. Agar diffusion method for toxicity screening of plastics on cultured cell monolayers. **J. Pharm. Sci.**, New York, v.54, p.1545-1547, 1965.

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

GUNNIGLE, R.G., RENNER, ROMANO, S.J., ABODEELY, R.A. Residual ethylene oxide: levels in medical grade tubing and effects on an *in vitro* biologic system. **J.Biomed. Mater. Res.**, New York, v.9, p.273-283, 1975.

HAAVY, J.; TOBIN, H. *Mycobacterium fortuitum* infection in prosthetic breast implants. **Plast. Reconstr. Surg.**, Baltimore, v.109, p.2124-2128, 2002.

HAISHIMA, Y.; TOSHIME, M.; NAKAGAWA, Y.; HIRATA, M., YAGAMI, T.; NAKAMURA, A. Chemical and biological evaluation of endotoxin contamination on natural rubber latex products. **J.Biomed. Mater. Res.**, New York, v.55, p.424-432, 2001.

HAKELIUS, L., OHLSEN, L. A clinical comparison of the tendency to capsular contracture between smooth and textured gel-filled silicone mammary implants. **Plast. Reconstr. Surg.**, Baltimore, v.90, p.247-254, 1992.

HAKME, F. Contratura capsular – complicação da capsulotomia fechada pós-implante de silicone nas hipomastias. **Folha Med.**, Rio de Janeiro, v.82, n.5, 1981.

HARBELL, J.W.; KOONTZ, S.W.; LEWIS, R.W.; LOVELL, D.; ACOSTA, D. Cell cytotoxicity assays. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.35, p.79-126, 1997.

HEINER, J.; STENBERG, B.; PERSSON, M. Crosslinking of siloxane elastomers. **Polym. Test.**, Oxford, v.22, p.253-257, 2003.

HESTER, T.R., NAHAI, F., BOSTWICK, J., CUKIC, J. A 5-year experience with polyurethane-covered mammary prostheses for treatment of capsular contracture, primary augmentation mammoplasty, and breast reconstruction. **Clin. Plast. Surg.**, Philadelphia, v.15, n.4, p.569-585, 1988.

HUGO, W.B. Introduction to microbiology In: DENYER, S.P., BAIRD, R.M. **Guide to microbiological control in pharmaceuticals**. London: Ellis Horwood Limited, 1990. cap.1, p.9-28.

HUGGETT, A.C., SCHILTER, B., ROBERFROID, M., ANTIGNAC, E., KOEMAN, J.H. Comparative methods of toxicity testing. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.34, p. 183-192, 1996.

IGNATIUS, A.A., CLAES, L.E. *In vitro* biocompatibility of bioresorbable polymers: poly (L, DL lactide) and poly (L-lactide-glycolide). **Biomaterials**, Amsterdam, v.17, n.8, p.831-839, 1996.

IKARASHI, Y., TSUCHIYA, T., NAKAMURA, A. Cytotoxicity of medical materials sterilized with vapour-phase hydrogen peroxide. **Biomaterials**, Amsterdam, v.16, n.3, p.177-183, 1995.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 11135**: Medical Devices – Validation and routine control of ethylene oxide sterilization. Geneva: ISO, 1994. 24p

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 11737-1**: Sterilization of medical devices – microbiological methods. Part 1. Geneva: ISO, 1995. 19p.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 11137**: Sterilization of health care products – Requirements for validation and routine control – Radiation sterilization. Geneva: ISO, 1995. 66p.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 14630**: Non-active surgical implants – General requirements. Geneva: ISO, 1997. 14p.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 10993-1**: Biological evaluation of medical devices. Part 1. Guidance on selections tests. Geneve: ISO, 1997. 10p.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 10993-5**: Biological evaluation of medical devices. Part 5. Tests for cytotoxicity: *in vitro* methods. Geneva: ISO, 1997. 7p.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 14607**: Implants for surgery - specific requirements for mammary implants. Geneva: ISO, 2002. 16p

JONES, R. Áreas limpas: conceito, limpeza, manutenção e certificação. **Rev. Farm. Bioquim. Univ. São Paulo**, São Paulo, v.3, p. 27-32, 1997.

JONES, P.A.; KING, A.V.; EARL, E.K.; LAWRENCE, R.S. An assessment of the phototoxic hazard of a personal product ingredient using *in vitro* assays. **Toxicol. in Vitro**, Oxford, v.17, p.471-480, 2003.

KAWACHI, E.Y., BERTRAN, C.A., REIS, R.R., ALVES, O.L. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Quím. Nova**, São Paulo, v.23, n.4, p. 518-522, 2000.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C; WINN Jr, W.C. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001. 1465p.

LAMM, S.H. Silicone breast implants and long-term health effects: when are data adequate? **J. Clin. Epidemiol.** Oxford, v.48, p.507-511, 1995.

LEE, J.K.; KIM, B.B.; KIM, I.I.; KIM, P.Y. *In vitro* cytotoxicity tests on cultured human skin fibroblasts to predict skin irritation potencial of surfactants. **Toxicol. in Vitro**, Oxford, v.14, p.345-349, 2000.

LELAH, M.D.; COOPER, S.L. **Polyurethanes in medicine**. Boca Raton: CRC Press Inc., 1986. 225p.

LESESNNE, C.B. Textured surface silicone breast implants: histology in the human. **Aesth. Plast. Surg.**, New York, v. 21, p. 93-96, 1997.

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.**, New York, 66B p.548-552, 2003.

MAROIS, Y., GUIDOIN, R., ROY, R., VIDOVSKY, T., JAKUBIEC, B., SIGOT-LUIZARD, M.-F.S., BRAYBROOK, J., MEHRI, Y., LAROCHE, G., KING, M. Selecting valid *in vitro* biocompatibility tests that predict the *in vivo* healing response of synthetic vascular prostheses. **Biomaterials**, Amsterdam, v.17, n.19, p.1835-1842, 1996.

MARQUES, A.P.; REIS, R.L.; HUNT, J.A. The biocompatibility of novel starch-based polymers and composites: *in vitro* studies. **Biomaterials**, Amsterdam, v.23, p.1471-1478, 2002.

McLAUGHLIN, J.K. Do cosmetic breast implant cause suicide? **Plast. Reconstr. Surg.**, Baltimore, v.112, p.1721-1723, 2003.

MIDANI, S.; RATHORE, M.H. *Mycobacterium fortuitum* infection of ventriculoperitoneal shunt. **South. Med. J.**, Birmingham, v.92, p.705-707, 1999.

MONTANARO, L.; ARCIOLA, C.R.; CENNI, E.; CIAPETTI, G.; SVIOLI, F.; FILIPPINI, F.; BARSANTI, L.A. Cytotoxicity, blood compatibility and antimicrobial activity of two cyanoacrylate glues for surgical use. **Biomaterials**, Amsterdam, v.22, p.59-66, 2001.

MORRISON, C., MACNAIR, R., MacDONALD, C., WYKMAN, A., GOLDIE, I., GRANT, M.H. *In vitro* biocompatibility testing of polymers for orthopaedic implants using cultured fibroblasts and osteoblasts. **Biomaterials**, Amsterdam, v.16, n.13, p.987-992, 1995.

NAKAGAWA, Y.; MURAI, T.; HASEGAWA, C.; HIRATA, M.; TSUCHIYA, T.; YAGAMI, T.; HAISHIMA, Y. Endotoxin contamination in wound dressings made of natural biomaterials. **J. Biomed. Mater. Res.**, New York, 66B, p.347-355, 2003.

OLIVER, D.W.; WALKER, M.S.; WALTERS, A.E.; CHATRATH, P.; LAMBERTY, B.G.H. Anti-silicone antibodies and silicone containing breast implants. **Br. J. Plast. Surg.**, Edinburg, v.53, p.410-414, 2000.

PARIENTE, J. -I.; KIM, B.-S.; ATALA, A. *In vitro* biocompatibility assessment of naturally derived and syntetic biomaterials using normal human urothelial cells. **J. Biomed. Mat. Res.**, New York, v.55, p.33-39, 2001.

PEARSON, F.C. **Pyrogens: endotoxins, LAL testing and depyrogenation**. New York: Marcel Dekker, 1985. 272p.

PEARSON, F.C. The limulus lysate endotoxin assay: current status. **Am. J. Med. Technol.**, Houston, v. 45, p. 704-709, 1979.

PELCZAR, M., REID, R., CHAN, E.C.S. **Microbiologia**. São Paulo: McGraw-Hill, 1980. v.1, 566p.

PINTO, T.J.A. Validação de técnica de recuperação de “bioburden” em cateteres intravenosos. **Rev. Bras. Farm.** Rio de Janeiro, v.76, p.26-28, 1995.

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. 325p.

PITANGUY, I., BRENTANO, J., RAMALHO, M.C., PORTO, M.J. Implante de Silicone gel com revestimento de poliuretano. **Rev. Bras. Cir.**, Rio de Janeiro, v.80, n.2, p.119-130, 1990.

PITANGUY, I., SALGADO, F., RADWANSKI, H.N., STERSA, R.M. Estágio atual dos implantes mamários. **Rev. Bras. Cir.**, Rio de Janeiro, v.81, n.6, p.291-299, 1991.

PIZZOFERRATO, CIAPETTI, G.; STEA, S.; CENNI, E.; ARCIOLA, C.; GRANCHI, D.; SAVARION, L. Cell culture methods for testing biocompatibility. **Clin. Mater.** London, v.15, p.173-190, 1994.

PRICE, J.M.; ROSENBERG, E.S. The war against junk science: the use of expert panels in complex medical-legal scientific litigation. **Biomaterials**, Amsterdam, v.19, p.1425-1432, 1998.

RHEINGOLD, L.M., YOO, R.P., COURTIS, E.H. Experience with 326 inflatable breast implants. **Plast. Reconstr. Surg.**, Baltimore, v.93, n.1, p.118-122, 1994.

RIZZO, E.; TUCHIYA, H.N.; MARTINEZ, C.H. **Técnicas básicas de cultura celular.** 4.ed. São Paulo: Instituto Butantan, 1983. 123p.

ROGERO, S.O.; SOUZA-BAZZI, A.; IKEDA, T.I.; CRUZ, A.S.; FERNANDES, K.C.; HIGA, O.Z. Citotoxicidade *in vitro* das membranas de hidrogel reticuladas por radiação ionizante. **Rev. Inst. Adolfo Lutz.** São Paulo, v.59, p.1-5, 2000.

ROSE, N.R.; POTTER, M. The silicone controversy: towards a resolution. **Immunol. Today**, Oxford, v.16, n.10, p.459-460, 1995.

ROSENBLUTH, S.A.; WEDDINGTON, G.R.; GUESS, W.L.; AUTIAN, J. Tissue culture method for screening toxicity of plastic materials to be used in medical practice. **J. Pharm. Sci.**, New York, v.54, p.156-159, 1965.

SARAY, A.; KAYGUSUZ, S.; KISA, U.; KILIC, D. Candida colonisation within a silicone tissue expander. **Br. J. Plast. Surg.**, Edinburg, v.55, p.259, 2002

SCHWARTZ, S.S., GOODMAN, S.H. **Plastic materials and process.** New York: Van Nostrand Reinhold Company, 1982. p. 403-416.

SEAL, B.L.; OTERO, T.C.; PANITCH, A. Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. **Mat. Sci. Eng.**, Oxford, R 34, p.147-230, 2001.

SIGGELKOW, W., FARIDI, A., SPIRITUS, K., KLINGE, U., RATH, W., KLOSTERHALFEN, B. Histological analysis of silicone breast implant capsules and correlation with capsular contracture. **Biomaterials**, Amsterdam, v.24, p.1101-1109, 2003.

SILICONE: mil e uma aplicações. **Cosméticos e Perfumes**, São Paulo, n.15, out/nov. 2001.

SMAHEL, J. Tissue reactions to breast implant coated with polyurethane. **Plast. Reconstr. Surg.**, Baltimore, v.61, p.8085, 1978.

SOPER, C.J., DAVIES, D.J.G. Principles of sterilization. In: DENYER, S.P., BAIRD, R.M. **Guide to microbiological control in pharmaceuticals**. London: Ellis Horwood Limited, 1990. cap.7, p.157-181.

SOUBIRAC, L.; JOUGLA, E.; HEZARD, L.; GROLLEAU, J.L.; CHAVOIN, J.P. Dégonflement des prothèses mammaires pré-remplies de serum physiologique ou d'hydrogel. Resultats et analyse d'une série de 650 patientes opérées. **Ann. Chir. Plast. Esthet.** Paris, n.47, p.273-279, 2003.

STURROCK, R.D.; BATCHELOR, J.R., HARPWOOD, V.; LONDON, D.R.; MILWARD, T.; RAYNER, C.; SILMAN, A.J.; WALKER, R.A. **Silicone gel breast implants: the report of the independent review group**. London: Crown Copyright, 1998.

SVENDSEN, O.; GARTHOFF, B.; SPIELMAN, H.; HENSTEN-PETTERSEN, .; JENSEN, J.C.; KUIJPERS, M.R.; LEIMGRUBER, R.; LIEBSCH, M.; MULLER-LIERHEIM, W.G.K.; RYDOG, G.; SAUER, U.G.; SCHMALZ, G.; SIM, B.; STEA, S. Alternatives to the animal testing of medical devices. The report and recommendations of ECVAM Workshop, **ATLA Altern. Lab. Anim.**, Nottingham, v.17, p.659-669, 1996.

TAKEHISA, M., SHINTANI, H., SEKIGUCHI, M., KOSHIKAWA, T., OONISHI, T., TSUGE, M., SOU, K., YAMASE, Y., KINOSHITA, S., TSUKAMOTO, H., ENDO, T., YASHIMA, K., NAGAI, M., ISHIGAKI, K., SATO, Y., WHITBY, J.L. The radiation resistance of the bioburden from medical devices. **Radiat. Phys. Chem.**, Oxford, v.52, n.1-6, p.21-27, 1998.

TENENBAUM, S.A.; RICE, J.C; ESPINOZA, L.R.; CUELLAR, M.L.; PLYMALE, D.R.; SANDER, D.M.; WILLIAMSON, L.L.; HAISLIP, A.M.; GLUCK, O.S.; TESSER, J.R.P.; NOGY, L.; STRIBRNY, K.M.; BEVAN, J.A.; GARRY, R.F. Use of antipolymer antibody assay in recipients of silicone breast implants. **Lancet**, London, v.349, p.449-454, 1997.

TERHEYDEN, H.; LEE, U.; LUDWIG, K.; KREUSCH, T.; HEDDERICH, J. Sterilization of elastic ligatures for intraoperative mandibulomaxillary immobilization **Br. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.38, p.299-304, 2000.

UNITED States pharmacopeia. 27.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2004. p. 1697 –1703.

WARD, C.M. The breast-implant controversy: a medico-moral critique. **Br. J. Plast. Surg.** Edinburg, v.54, p.352-357, 2001.

WEARY, M.; NAKER, B. Utilization of the limulus amebocyte lysate test for pyrogen testing large parenterals, administration sets, and medical devices. **Bull. Parenter. Drug Assoc.**, Philadelphia, v.31, p.127-133, 1977.

WHITBY, J.L. Comments on the Japanese study of the radiation resistance of the bioburden of medical devices. **Radiat. Phys. Chem.**, Oxford, v.52, n.1-6, p.29-34, 1998.

WILLIAMS, D.F., ed. **Biocompatibility of tissue analogs**. Boca Raton: CRC Press, 1985. 166p.

WILLIAMS, D.F. **Dictionary of biomaterials**. Liverpool: Liverpool University Press, 1999. p.42.

WOEDTKE, T., SCHLÜTER, B., HARTMANN, V., URBAN, G., ABEL, P.U., WILHELM, L., JÜLICH, W.F., SCHLOSSER, M. The influence of sterilization treatments on the cytocompatibility of polyurethane biosensor membranes. In: ANNUAL MEETING AND EXPOSITION, 29, Reno, 2003. **Abstracts**. Minneapolis: Society for Biomaterials, 2003.

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

YAN, A., WANG, A., ZHAI, Y., CHEN, B., LIM, B. Setting the sterilization dose for a cotton-based product family using a knowledge of the distribution of radiation resistances. **Radiat. Phys. Chem.**, Oxford, v.63, p.669-671, 2002.

YOSHIDA, S.H., SWAN, S., TEUBER, S.S., GERSHWIN, M.E., Silicone breast implants: immunotoxic and epidemiologic issues. **Life Sci.**, Oxford, v.56, n.16, p.1299-1310, 1995.

YU, L.T.; LATORRE, G.; MARTOTA, J.; BATICH, C.; HARDT, N.S. *In vitro* measurement of silicone bleed from breast implants. **Plast. Reconstr. Surg.**, Baltimore, v.97, p.756-764, 1996.

ZHANG, Y.Z., BJURSTEN, L.M., LARSSON, C.F., KOBER, M., WESSLÉN, B. Tissue response to commercial silicone and polyurethane elastomers after different sterilization procedures. **Biomaterials**, Amsterdam, v.17, n.23, p.2263-2272, 1996.