

**Curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos,  
Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária**

**ÉVLIN HONORATO MAIA MILAN**

**ESTUDOS PRELIMINARES DE PADRONIZAÇÃO DE MATERIAL PARA  
ACONDICIONAMENTO DE ENXERTO ÓSSEO HUMANO UTILIZADO EM  
TRANSPLANTE**

**PPGVS / INCQS**

**FIOCRUZ**

**2010**

**ESTUDOS PRELIMINARES DE PADRONIZAÇÃO DE MATERIAL PARA  
ACONDICIONAMENTO DE ENXERTO ÓSSEO HUMANO UTILIZADO EM  
TRANSPLANTE**

**Évlin Honorato Maia Milan**

Curso de Especialização em Controle da  
Qualidade de Produtos, Ambientes e  
Serviços Vinculados à Vigilância  
Sanitária

Instituto Nacional de Controle de  
Qualidade em Saúde

Fundação Oswaldo Cruz

Orientadores: Shirley de Mello Pereira Abrantes  
Mirian Noemi Pinto Vidal

Rio de Janeiro  
2010

**ESTUDOS PRELIMINARES DE PADRONIZAÇÃO DE MATERIAL PARA  
ACONDICIONAMENTO DE ENXERTO ÓSSEO HUMANO UTILIZADO EM  
TRANSPLANTE**

Évlin Honorato Maia Milan

Monografia submetida à Comissão Examinadora composta pelos professores e tecnologistas do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professor convidado de outra instituição, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Especialista em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços vinculados à Vigilância Sanitária.

Aprovado:

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Helena Pereira da Silva Zamith – INCQS / FIOCRUZ

---

Prof. Ma. Rafael Augusto Dantas Prinz – DITMT / INTO

---

Prof<sup>a</sup>. Ma. Joana Angélica Barbosa Ferreira – INCQS / FIOCRUZ

Suplente:

---

Prof. Ma. André Vicente Plastino Silva – INCQS / FIOCRUZ

Orientadores:

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Shirley de Mello Pereira Abrantes – INCQS / FIOCRUZ

---

Prof<sup>a</sup>. Ma. Mirian Noemi Pinto Vidal – INCQS / FIOCRUZ

## FICHA CATALOGRÁFICA

Milan, Évlin Honorato Maia

Estudos preliminares de padronização de material para acondicionamento de enxerto ósseo humano utilizado em transplante / Évlin Honorato Maia  
Milan – Rio de Janeiro, 2010.

xvi, 44p. il., tab.

Trabalho de conclusão de curso (Especialização em Vigilância Sanitária) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Vigilância Sanitária, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2010.

1. Transplante ósseo humano. 2. Embalagem plástica. 3. Ensaio preliminares

**“Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais inteligente, mas o que melhor se adapta às mudanças.”**

**Charles Darwin**

“Osso duro de roer.”

**Ditado popular**

## AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde por ter aberto as portas para profissionais de outras instituições e acreditado em seus projetos, possibilitando a especialização destes profissionais e a melhoria da qualidade dos seus serviços.

Ao Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia em nome do Dr. Rafael Prinz por me liberar em alguns momentos do serviço, possibilitando a continuidade da minha formação.

Á Dra. Shirley Abrantes, minha orientadora, por ter me recebido e abraçado um trabalho tão multidisciplinar, me orientando e conduzindo com tanta propriedade e conhecimento. Pelos ensinamentos e conselhos dados e a paciência em lidar com um profissional inexperiente na vida acadêmica, me conduzindo com muita atenção e carinho.

Á mestre e orientadora Mírian Vidal por ter passado seus conhecimentos, utilizado sua experiência e técnica na realização de ensaios, tão despretensiosamente, com tanto bom humor e disponibilidade.

Ao Departamento de Toxicologia no nome da profissional Sheila Albertino colega de curso, realizando testes com o meu material de forma tão atenciosa.

Ao Departamento de Química, especialmente a colega de turma Renata e a professora Michele Feitosa por terem aberto as portas do laboratório e me ajudarem na realização do ensaio.

Á técnica Rosângela do Laboratório de Substâncias Químicas de Referência por ter realizado a identificação dos materiais.

Aos colegas e professores da especialização que tiveram a paciência de ouvir várias vezes sobre “a embalagem do osso duro de roer”.

Aos colegas de trabalho que tiveram paciência e resolveram todos os problemas nos momentos em que me ausentei.

Ao meu porto seguro, que é minha família (meus pais), pelo amor, encorajamento, paciência e compreensão.

Ao meu querido e amado Alessandro, por mais uma vez ser meu companheiro e meu mestre, pela espera por dias melhores e acreditar sempre que eu seria capaz.

Ao meu filhote Giovani, por ter esperado várias vezes por minha atenção e ao bebê por ter se estressado e ficado ansioso junto comigo.

Á Deus por me conduzir como sua filha e me pegando no colo nos momentos mais difíceis.

## RESUMO

A prática do transplante ósseo na medicina vem acontecendo há muitos anos e, com base científica, desde o século XIX. O transplante ósseo não é essencial à vida, ele é realizado com intuito de melhorar a qualidade de vida do paciente. Principalmente por este motivo temos que nos preocupar muito com a qualidade deste enxerto que está sendo transplantado.

Essa preocupação com a qualidade é demonstrada com várias legislações publicadas a partir do ano 2000 com, regras, normas e recomendações a serem seguidas pelos órgãos de saúde, com a preocupação de disponibilizar produtos de qualidade.

A embalagem utilizada para armazenar este produto é de suma importância, pois dela depende a manutenção e proteção do enxerto ósseo a ser transplantado. Cabe aos bancos de tecidos músculo-esqueléticos adquirir e garantir embalagens que tenham essa qualidade pretendida.

As legislações atuais não descrevem claramente quais devem ser as características, testes e parâmetros adequados das embalagens para garantir que não tragam riscos aos enxertos e conseqüentemente ao paciente que irá recebê-lo.

O presente estudo teve por finalidade conhecer os possíveis polímeros a serem utilizados nestas embalagens e realizar alguns testes para verificar as condições das embalagens utilizadas no banco de tecidos músculo-esqueléticos do Instituto Nacional de Traumatologia (INTO) – Ministério da Saúde.

Com isso temos o objetivo de iniciar o trabalho de uma possível Norma Técnica de parâmetros mínimos aceitáveis para garantir a qualidade da embalagem para enxerto ósseo humano.

## **ABSTRACT**

The practice of bone transplant medicine has been going on for many years and, based on science, since the nineteenth century. The bone transplant is not essential to life, so when performed does not involve risk of death to it.

Mainly for this reason we have to worry too much about the quality of the graft being transplanted.

This concern with quality is demonstrated with various laws published since 2000 with rules, standards and recommendations to be followed by health institutions, with the aim of providing quality products.

The packaging used to store the product is of paramount importance, because it determines the maintenance and protection of the bone graft to be transplanted. It is up to the banks of musculoskeletal tissues acquire packaging and ensure they have this desired quality.

The current law does not clearly describe what characteristics, testing and packaging of appropriate parameters to ensure they do not bear the risk grafts and therefore the patient who will receive it.

This study aimed to learn about the possible plastics for use in the packages and do some tests to check the conditions used in the packaging of musculoskeletal tissues at the National Institute of Traumatology.

With this we aim to start work on possible Technical Standard minimum acceptable parameters to ensure the quality of packaging for human bone graft.

## LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

µL – Microlitro

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BTME – Banco de Tecidos Músculo-Esqueléticos

CLE – Concentração limite de endotoxina

cm – Centímetro

CNCDO – Central de Notificação, Captação e Doação de Órgãos e Tecidos

EU – Unidade de endotoxina

GM – Gabinete Ministerial

INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

INTO – Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia

ISO – *International Standard Organization*

LAL – Lisado de amebócitos de *Límulus*

LPS - Lipopolissacarídeo

mL – Mililitro

MS – Ministério da Saúde

MDV – Máxima diluição válida

NBR – Norma Brasileira

PBS - *Phosphate buffered saline* – tampão fosfato salino

PE - Polietileno

PEAD – Polietileno de alta densidade

PEBD – Polietileno de baixa densidade

PELBD – Polietileno linear de baixa densidade

PEMD – Polietileno de média densidade

POP – Procedimento operacional padrão

PP – Polipropileno

PS – Poliestireno

PVC – Policloreto de vinila

RDC – Resolução de Diretoria Colegiada

SFB – Soro fetal bovino

SNT – Sistema Nacional de Transplante

SUS – Sistema Único de Saúde

Tf – Temperatura de amolecimento

Tg – Temperatura de transição vítrea

Tm – Temperatura de fusão

USP – *United States Pharmacopoeia* – Farmacopéia dos Estados Unidos

VCM – Monômero de cloreto de vinila

## LISTA DE FIGURAS

- **Figura 1.** Esquema da parede celular de bactéria Gram-negativa.....13
- **Figura 2.** Fotomicrografia de células clone L929 – Aumento de 400X.....15
- **Figura 3.** Representação da porcentagem de material plástico utilizado em embalagens nos BTMEs, no Brasil.....28
- **Figura 4.** Espectro de transmissão no infravermelho do plástico adquirido em 2009.....29
- **Figura 5.** Espectro de transmissão no infravermelho do plástico usado desde 2000.....30
- **Figura 6.** Espectro de transmissão no infravermelho de referência do PEBD.....31
- **Figura 7 –** Ensaio de citotoxicidade *in vitro* em células L929 – método de difusão em Agar. Reatividade biológica 24 h após aplicação em duplicata de materiais.....34
- **Figura 8 –** Ensaio de citotoxicidade *in vitro* em células L929 – método de difusão em Agar. Reatividade biológica 24 h após aplicação de controle positivo.....35
- **Figura 9 –** Ensaio de citotoxicidade *in vitro* em células L929 – método de difusão em Agar. Reatividade biológica 24 h após aplicação de controle negativo.....35
- **Figura 10 –** Ensaio de citotoxicidade *in vitro* em células L929 – método de difusão em Agar. Reatividade biológica 24 h após aplicação da amostra de plástico utilizada pelo BTME-INTO do ano 2000 á 2010 ....36

- **Figura 11** – Ensaio de citotoxicidade *in vitro* em células L929 – método de difusão em Agar. Reatividade biológica 24 h após aplicação da amostra de plástico adquirida pelo BTME-INTO no ano 2009.....36

## LISTA DE TABELAS

- **Quadro 1.** Classes de limpeza do ar para partículas em suspensão, selecionadas para salas e zonas limpas.....4
- **Quadro 2.** Nome e estrutura química de polímeros utilizados em embalagens plásticas.....9
- **Quadro 3.** Temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), temperatura de fusão cristalina ( $T_m$ ) ou temperatura de amolecimento ( $T_f$ ) de alguns polímeros.....12
- **Quadro 4.** Graus de citotoxicidade.....24
- **Quadro 5.** Tipos de plásticos utilizados, testes realizados e problemas identificados por cinco BTMEs no Brasil.....27
- **Quadro 6:** Espectro de absorção no infravermelho de material plástico adquirido em 2009.....30
- **Quadro 7:** Espectro de absorção no infravermelho de material plástico adquirido em 2000.....31
- **Quadro 8:** Espectro de absorção no infravermelho de material de referência polietileno de baixa densidade.....32
- **Quadro 9:** Ensaio de permeabilidade ao vapor d'água para embalagem plástica de PEBD utilizada pelo BTME-INTO no período de 2000 á 2009 e embalagem plástica de PEBD adquirida pelo BTME-INTO em 2009.....37

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1. Banco de tecidos músculo-esqueléticos	1
1.2. Legislações em banco de tecidos músculo-esqueléticos	5
1.3. Embalagens	7
1.4. Polímeros	8
1.5 Tipos de plásticos	8
1.6. Recipiente de material plástico	12
1.7. Pirogênio	12
1.8. Citotoxicidade	14
1.9. Impermeabilidade	15
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	<b>17</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>18</b>
3.1. Objetivo geral	18
3.2. Objetivos específicos	18
<b>4. METODOLOGIA</b>	<b>19</b>
4.1. Levantamento do material utilizado pelos BTME no Brasil	19
4.2. Identificação dos plásticos	19
4.3. Ensaio para endotoxina bacteriana	19
4.4. Ensaio de citotoxicidade “In vitro”	22
4.5. Permeabilidade ao vapor d’água	25
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>27</b>
5.1. Levantamento do material utilizado pelos BTME no Brasil	27
5.2. Identificação dos plásticos pelo espectrofotômetro no infravermelho	29
5.3. Ensaio para endotoxina bacteriana	32
5.4. Ensaio de Citotoxicidade “In Vitro” pelo Método de Difusão em Agar	33
5.5. Ensaio de Permeabilidade ao vapor d’água	37
<b>6. DISCUSSÃO</b>	<b>38</b>
<b>7. CONCLUSÃO</b>	<b>39</b>
<b>8. REFERÊNCIAS</b>	<b>40</b>

## 1- INTRODUÇÃO

### 1.1- Banco de tecidos músculo-esqueléticos

A utilização de enxerto ósseo em cirurgias ortopédicas vem acontecendo há muitos anos. A base científica do transplante ósseo foi estabelecida em meados do século XIX, com as observações sobre as propriedades osteogênicas do osso e nos anos de 1942 e 1947 foram publicados estudos descrevendo o uso de osso preservado em cirurgias ortopédicas (MOZELA *et al.*, 2005). Mais recentemente, com a evolução da implantodontia na última década, além da sua aplicação na área ortopédica também vem crescendo a utilização de enxerto ósseo na área odontológica (DEL VALLE *et al.*, 2006).

A propriedade osteogênica corresponde à capacidade do enxerto em produzir tecido ósseo a partir de suas próprias células ou células do hospedeiro. Outras propriedades do enxerto são a de osteoindução que é a capacidade do enxerto em induzir a diferenciação de células mesenquimais do tecido hospedeiro em células osteogênicas e a de osteocondução que é a capacidade que o enxerto tem de servir de estrutura, ou molde, para a formação de novo tecido ósseo com células do hospedeiro (FRIEDLAENDER; MANKIN; GOLDBERG, 2006).

O enxerto ósseo é utilizado em situações de perda óssea e podem ser diferenciados quanto à sua origem em: autólogo, quando proveniente do próprio indivíduo; homólogo, doador da mesma espécie, porém geneticamente distinto (proveniente de outro indivíduo); ou heterólogo, quando proveniente de outra espécie (CANALE *et al.*, 1998).

O enxerto autólogo é o ideal, pois tem capacidade osteogênica, osteoindutora e osteocondutora fazendo com que a osteointegração seja mais rápida e eficaz (MOZELA *et al.*, 2005). A propriedade osteogênica é exclusiva do enxerto autólogo porque precisa de células viáveis no próprio enxerto e a propriedade osteoindutora também, pois precisa de fatores de crescimento presentes no enxerto para que ela faça a indução. Esse enxerto não oferece risco de transmissão de doenças infecto-contagiosas mas tem como desvantagem a quantidade menor de enxerto, que poderá ser retirada da área doadora e, a submissão muitas vezes do paciente a duas cirurgias (uma para

retirada do osso doador e a outra para realização do transplante), podendo acontecer complicações na área doadora como infecções, dor residual, deformidade estética entre outras.

O enxerto homólogo poderá ser usado em cirurgias, que necessitem maior quantidade de tecido; em pacientes idosos, crianças ou pacientes, que não apresentam quantidade suficiente de área doadora de osso. Poderá ser utilizado para preencher cavidades, segmentares com formatos e dimensões específicas ou como sustentação. Esse enxerto só apresenta capacidade osteocondutora.

Dentre as indicações mais comuns para utilização de enxertos homólogos estão as pseudoartroses, cirurgias de coluna vertebral, revisões de artroplastias totais, cirurgias de tumores ósseos e construção articular para tratamento de lesões ligamentares (AMATUZZI et al., 2000). Recentemente utilizado também em cirurgias de implantes dentários para aumento do rebordo ósseo maxilar.

Atualmente existem no Brasil sete bancos de tecidos músculo-esqueléticos (BTME) cadastrados e autorizados pelo Sistema Nacional de Transplante (SNT) a captar, processar, armazenar e distribuir enxerto ósseo humano para transplante. Infelizmente a distribuição retrata mais uma vez a desigualdade do país com a má distribuição destes BTME. Temos a concentração nos estados do Sudeste e Sul, com localização de dois bancos de tecidos músculo-esqueléticos no Estado do Rio de Janeiro; três no Estado de São Paulo; um no Paraná e um no Estado do Rio Grande do Sul (PORTAL SAÚDE, 2010).

O BTME instalado no Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia (INTO) é referência neste assunto para o Ministério da Saúde. Desde 1987 vem sendo captado e utilizado enxerto ósseo homólogo (doador vivo e cadáver) proveniente deste banco de tecidos (RONDINELLI et al., 1994).

Em 2000 foi inaugurado o BTME com a atual estrutura física estabelecido no terceiro andar do hospital, sendo separado do centro-cirúrgico e se tornando um novo setor no INTO.

Estes bancos de tecidos têm legislações e normatizações próprias para BTME e também legislações sobre doação e transplante em geral a serem seguidas. As legislações específicas dispõem de normas gerais, normas técnicas de captação, armazenamento e qualidade destes tecidos.

O tecido ósseo é captado, embalado, armazenado em ultra-congeladores (a - 80°C), processado, embalado, armazenado e distribuído para médicos ou dentistas cadastrados no Sistema Nacional de Transplante.

O tecido ósseo pode ser proveniente de doador vivo (enxerto autólogo ou indivíduos provenientes de cirurgia de artroplastia total de quadril, onde é retirada a cabeça do fêmur para colocação de uma prótese) ou doador cadáver (morte encefálica ou parada cardíaca).

A captação do tecido ósseo a partir de doadores vivos é precedida de uma autorização prévia do doador e de triagens: epidemiológica, clínica, sorológica e radiológica. Após a retirada da cabeça femoral, com técnicas assépticas no centro cirúrgico, são feitos também exames bacteriológicos e este enxerto é armazenado em ultra-congeladores a temperaturas de - 80°C.

Já a captação do tecido ósseo em doadores cadáveres tem que ser realizada através das Centrais de Notificação, Captação e Doação de Órgãos e Tecidos (CNCDO), as quais viabilizam a retirada de órgãos e tecidos, obtendo previamente autorização da doação com familiar mais próximo do paciente falecido. Também são realizadas triagens: epidemiológica, clínica, sorológica e microbiológica para realização da captação, que será realizada no centro cirúrgico com técnicas assépticas.

Após a retirada cirúrgica do tecido ósseo, este é embalado e armazenado no banco de tecidos aguardando o resultado dos exames realizados.

Havendo a liberação, com resultados satisfatórios destes testes estes tecidos serão processados em salas classificadas (de acordo com número de partículas suspensas no ar) como International Standard Organization - ISO classe 5 segundo recomendação da RDC 220 de 2006 (BRASIL, 2006). Conforme definição apresentada em norma da Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT NBR ISO 14644-1: 2005 (ABNT, 2005) considera-se sala limpa “uma sala, na qual a concentração de partículas em suspensão no ar é controlada; é constituída e utilizada de maneira a minimizar a introdução, geração e retenção de partículas dentro da sala, na qual outros parâmetros relevantes, como temperatura, umidade e pressão, são controlados conforme necessário.” A classificação ISO classe 5 segue o limite máximo de concentração de partículas conforme descrito na Quadro 1 abaixo.

**Quadro 1** – Classes de limpeza do ar para partículas em suspensão, selecionadas para salas e zonas limpas.

Classificação ISSO	Limites máximos de concentração de partículas/m <sup>3</sup> de ar conforme tamanho da partícula					
	0,1µm	0,2 µm	0,3 µm	0,5 µm	1 µm	5 µm
ISO Classe 1	10	2				
ISO Classe 2	100	24	10	4		
ISO Classe 3	1000	237	102	35	8	
ISO Classe 4	10000	2370	1020	352	83	
<b>ISO Classe 5</b>	<b>100000</b>	<b>23700</b>	<b>10200</b>	<b>3520</b>	<b>832</b>	<b>29</b>
ISO Classe 6	1000000	237000	102000	35200	8320	293
ISO Classe 7				35200	83200	2930
ISO Classe 8				3520000	832000	29300
ISO Classe 9				35200000	8320000	293000

(ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2005)

Após o processamento, esses tecidos são embalados ainda na sala ISO classe 5 e armazenados novamente em ultra congeladores aguardando resultado dos testes (microbiológicos e histopatológico) realizados no processamento. Após a verificação e liberação de toda documentação pelo responsável técnico do banco de tecidos, estes tecidos são liberados para uso em transplante humano.

A legislação é bem estruturada e clara quanto à triagem sorológica e epidemiológica dos doadores; quanto à área de armazenamento; equipamentos, mas não é detalhada o suficiente em relação às especificações da embalagem a ser utilizada.

## **1.2- Legislações em banco de tecidos músculo-esqueléticos**

- a) Portaria GM número 904 de 16 de agosto de 2000 - Cria, no âmbito do Sistema Único de Saúde - SUS, os Bancos de Tecidos Ósteo-Fáscio-Condroligamentosos de procedência humana para fins terapêuticos ou científicos (BRASIL, 2000).

Esta Portaria começa a determinar e controlar as condições mínimas que o estabelecimento deve ter para que seja liberado para funcionar como Banco de Tecidos Ósteo-Fáscio-Condroligamentosos e já descreve que o banco deve apresentar garantia de qualidade de seus enxertos, mas não relata sobre como esse enxerto deverá ser embalado após a sua retirada e na disponibilização para transplante.

- b) Portaria GM/MS número 1686 de 20 de setembro de 2002 – revoga a Portaria GM número 904 de 16/08/2000. Aprova as Normas para Autorização de Funcionamento e Cadastramento de Bancos de Tecidos Musculoesqueléticos pelo Sistema Único de Saúde (BRASIL, 2002).

Esta Portaria já faz alguma menção sobre a embalagem a ser utilizada. Em seu Anexo I, item 3.3-j, relata –“ Materiais específicos: embalagens homologadas capazes de suportar os processos a eles submetidos (ultracongelamento, esterilização, etc.) e garantam a qualidade física e a esterilidade dos materiais, e que sejam registradas ou autorizadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA...”

Em seu Anexo II, item 3 - Empacotamento Pós-Ablação, diz: “As peças a serem congeladas devem ser acondicionadas imediatamente em embalagens plásticas triplas, seladas uma a uma, que suportem ultracongelamento e esterilização e que sejam registrados ou autorizados pela ANVISA.”

- c) Resolução da Diretoria Colegiada- RDC Nº. 220, de 27 de dezembro de 2006. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o Funcionamento de Bancos de Tecidos Musculoesqueléticos e de Bancos de Pele de origem humana (BRASIL, 2006).

É a Resolução com mais detalhes técnicos que regulamentam um BTME, inclusive fornecendo um pouco mais de detalhes sobre as exigências das embalagens para acondicionar o tecido ósseo para transplante como descrito no Anexo, item F- Operacionalização, sub-item 13-Embalagem pós-retirada e sub-ítem 18- Embalagem pós-processamento, como descrito abaixo:

“13.1. As peças ósseas a serem congeladas devem ser acondicionadas imediatamente em embalagem plástica tripla impermeável, que não ofereça risco de citotoxicidade ou liberação de pirogênicos para o produto, que suporte congelamento, hermeticamente fechadas uma a uma. As embalagens primárias e secundárias devem ser estéreis.

18.5. As peças devem ser acondicionadas em embalagens que assegurem a integridade e a esterilidade de seu conteúdo e que não ofereçam risco de liberação de substâncias citotóxicas ou pirogênicas do material da embalagem para o produto.

18.6. As peças ósseas devem ser acondicionadas em embalagens plásticas, triplas, estéreis, adequadas para o armazenamento dos tecidos até seu uso, ou embalagem primária de vidro estéril e secundária de plástico estéril, ou única, de vidro estéril lacrado.”

d) Portaria número 2600 de 21 de outubro de 2009 - Aprova o Regulamento Técnico do Sistema Nacional de Transplantes (BRASIL, 2009).

É a legislação mais recente que regulamenta todos os tipos de transplantes, inclusive o de tecido músculo-esquelético, em seu anexo XIII. Onde entre outras regulamentações também é descrito sobre a embalagem para acondicionamento do enxerto ósseo conforme descrito abaixo:

“4.5.Embalagem Pós-Retirada:

4.5.1. Os tecidos devem ser acondicionados imediatamente em embalagem plástica tripla, impermeável, que não ofereça risco de citotoxicidade ou liberação de pirogênicos para o produto, hermeticamente seladas uma a uma, que suportem ultracongelamento e esterilização e que sejam registrados ou autorizados pela ANVISA.

4.12.Embalagem Pós-Processamento:

4.12.4. As peças devem ser acondicionadas em embalagens plásticas e/ou de vidro, triplas, estéreis, seladas uma a uma, que suportem ultracongelamento e esterilização quando indicado pelo produto.

Essa embalagem deve assegurar a integridade e manter a esterilidade de seu conteúdo até o uso do material dentro de seu prazo de validade e ser registrada ou autorizada pela ANVISA.”

### 1.3- Embalagens

Segundo a descrição da Farmacopéia Brasileira, compreende-se por material de acondicionamento e embalagem o “recipiente, envoltório, invólucro ou qualquer outra forma de proteção, removível ou não, destinado a envasar, proteger, manter, cobrir ou empacotar, especificamente ou não, matérias-primas, reagentes e medicamentos” (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

Dentre as áreas de atuação da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), o enxerto ósseo fica sob a supervisão e orientação da área de Sangue, Tecidos e Órgãos e a embalagem plástica a ser utilizada para o seu armazenamento está sob a responsabilidade da área de Produtos para Saúde.

Conforme a RDC número 185 de 2001 (BRASIL, 2001), os produtos médicos, estão enquadrados segundo o potencial de risco que representam à saúde do consumidor, paciente, operador ou terceiros envolvidos, nas Classes I, II, III ou IV.

Segundo seu Anexo I em Definições, é definido produto médico como: produto para a saúde, tal como equipamento, aparelho, material, artigo ou sistema de uso ou aplicação médica, odontológica ou laboratorial, destinado à prevenção, diagnóstico, tratamento, reabilitação ou anticoncepção e que não utiliza meio farmacológico, imunológico ou metabólico para realizar sua principal função em seres humanos, podendo, entretanto ser auxiliado em suas funções por tais meios.

É descrito no Anexo II, item II a determinação das regras de registro dos produtos: Regra 2 .

“Todos os produtos médicos não-invasivos destinados ao armazenamento ou condução de sangue, fluidos ou tecidos corporais, líquidos ou gases destinados a perfusão, administração ou introdução no corpo, estão na Classe II:

- a) se puderem ser conectados a um produto médico ativo da Classe II ou de uma Classe superior;
- b) se forem destinados a condução, armazenamento ou transporte de sangue ou de outros fluidos corporais ou armazenamento de órgãos, partes de órgãos ou tecidos do corpo; em todos outros casos pertencem à Classe I.”

Podemos considerar que a embalagem utilizada para armazenamento

de tecido ósseo para transplante é considerada pela ANVISA como produto para saúde, artigo médico classificado como de risco II.

Na escolha da embalagem para um produto deve ser levada em conta certas propriedades como: custo, permeabilidade ao vapor d'água, permeabilidade aos gases, resistência, permeabilidade a luz, termossoldabilidade, faixa de temperatura de armazenamento, toxicidade e compatibilidade com o produto a ser armazenado.

#### **1.4- Polímeros**

O termo polímero tem etimologia grega e significa “muitas partes”. Polímeros são moléculas relativamente grandes, de pesos moleculares da ordem de  $10^3$  a  $10^6$ , em cuja estrutura, se encontra repetidas unidades químicas simples conhecidas como meros (MANO, 1985).

Podemos dividir os polímeros em três grupos de acordo com seu comportamento mecânico: borrachas ou elastômeros, plásticos e fibras.

O plástico, interesse do nosso estudo, tem etimologia grega e significa “adequando à moldagem”. É um material composto principalmente por um polímero orgânico sintético e tem como característica serem sólidos em temperatura ambiente em seu estado final, mas em algum momento do seu processo tornam-se fluidos passíveis de moldagem por ação isolada ou conjunta de temperatura e pressão.

#### **1.5- Tipos de plásticos**

Existem no mercado vários tipos de polímeros que podem ser utilizados para fabricação de embalagens plásticas.

Como exemplo, temos no Quadro 2 abaixo o nome e a unidade química estrutural de alguns plásticos.

**Quadro 2:** Nome e estrutura química de polímeros utilizados em embalagens plásticas.

PLÁSTICO	UNIDADE ESTRUTURAL QUÍMICA
Polietileno	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -
Polipropileno	-CHCH <sub>3</sub> - CH <sub>2</sub> -
Poliestireno	-CHC <sub>6</sub> H <sub>5</sub> - CH <sub>2</sub> -
Nylon-6,6	-CO-( CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -CO-NH--( CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -NH-
Policloreto de vinila	-CHCl-CH <sub>2</sub> -

(Casarett and Doull's, 1980)

Cada polímero apresenta suas características e suas transições físicas. Polímeros e regiões amorfas são caracterizados pela temperatura de transição vítrea – T<sub>g</sub>. Polímeros e regiões cristalinas também são caracterizados pela temperatura de fusão cristalina –T<sub>m</sub> (também chamada de T<sub>f</sub>- temperatura de amolecimento). Abaixo da T<sub>g</sub> a forma amorfa se vitrifica, tornando-se um sólido quebradiço e frágil.

a) Polietileno (PE) – formado por adição de vários monômeros de etileno. A estrutura do polietileno apresenta ramificações, ou cadeias laterais, em maior ou menor quantidade. Seu grau de ramificação e o comprimento das cadeias laterais exercem influência sobre as características do material, uma vez que são obstáculos a formação de cristais. Quanto menor o grau de ramificação das cadeias poliméricas, maior a cristalinidade e conseqüentemente maior a densidade. A fração cristalina apresenta maior densidade e é responsável pela resistência do material, já a parte amorfa contribui para a elasticidade, maciez e flexibilidade do material (CLAIRE, 2002).

As aplicações dos polietilenos são inúmeras, tanto em filmes simples como multicamadas, especialmente devido à barreira que oferece ao vapor d'água, às suas propriedades de selagem e ao bom equilíbrio em propriedades mecânicas e baixo custo. Entretanto os polietilenos não apresentam boa barreira a gases como oxigênio, nitrogênio e gás carbônico e são permeáveis a óleos e gorduras (CLAIRE, 2002).

Existem quatro tipos principais de polietilenos, diferindo na estrutura e propriedades, assim como no processo de fabricação, são eles: polietileno de baixa densidade (PEBD), polietileno de média densidade (PEMD), polietileno

de alta densidade (PEAD) e polietileno linear de baixa densidade (PELBD) (FERRUA, 2008).

O PEBD é o polietileno mais largamente empregado. Contém cadeias curtas e ramificações grandes emergindo da cadeia principal. Têm menor cristalinidade e densidade variando entre 0,910 a 0,940 g/cm<sup>3</sup>. Apresenta alta resistência ao impacto e perfuração. Sua faixa de fusão é de 105 a 115°C. Logo suas características são: quimicamente inerte, termosselável, não possui odor e retrai por aquecimento, impermeável ao vapor d'água, porém bastante permeável aos gases (FERRUA, 2008).

O PEMD apresenta densidade entre 0,925 a 0,940 g/cm<sup>3</sup>. Sua faixa de fusão é de 115 a 125°C. É mais resistente, mais rígido e menos permeável que o PEBD (FERRUA, 2008).

O PEAD é basicamente linear com poucas ramificações apresentando densidade entre 0,940 a 0,965 g/cm<sup>3</sup>. Sua fusão ocorre na faixa de 128 a 138°C. São os mais rígidos e os mais firmes dos polietilenos e, por causa do seu elevado grau de cristalinidade apresenta-se menos transparentes do que os outros (aparência opaca). Suas características são: quimicamente muito resistentes, mais resistentes mecanicamente, mais espessos, menos flexíveis e mais quebradiços, porém é mais impermeável à vapores d'água e gases. Seu custo é mais alto que o PEBD (FERRUA, 2008).

O PELBD é um copolímero de etileno com uma pequena quantidade de buteno, hexano ou octano. É significativamente mais firme que o PEBD e tem melhores propriedades de termosselagem. Apresenta menor cristalinidade que o PEAD, melhor resistência ao fissuramento sob tensão e maior resistência ao impacto. A característica de barreira ao vapor d'água situa-se entre o PEBD e o PEAD (FERRUA, 2008). Apresenta densidade entre 0,916 a 0,940 g/cm<sup>3</sup> (CLAIRE, 2002).

b) Polipropileno (PP) – na área de embalagens é muito utilizado para filmes, para rafia e filamentos. Na aplicação como embalagem rígida é empregado na fabricação de frascos e garrafas soprados, de tampas e caixas injetadas e de chapas para termotransformação de potes e bandejas. Apresenta densidade específica da ordem de 0,9 g/cm<sup>3</sup>, ponto de fusão em torno de 140 a 150 °C, boa barreira ao vapor d'água, média barreira a gases, boa resistência a abrasão, boa estabilidade térmica e não é susceptível ao fissuramento sob tensão. É sensível à degradação oxidativa a altas

temperaturas, é degradado pela ação da luz ultravioleta e por agentes ionizantes, e ao ser irradiado. Sua temperatura de transição vítrea é de +10 a -20<sup>0</sup>C, sendo quebradiço a temperatura de congelamento (CLAIRE, 2002).

c) Poliestireno (PS) – Apresenta tg de 90 a 100<sup>0</sup>C e densidade na ordem de 1,04 a 1,11 g/cm<sup>3</sup>. É bastante transparente e usado principalmente para artigos moldados por injeção (exemplo são os copos descartáveis rígidos e perfeitamente transparentes). É um material rígido e com baixa resistência ao impacto e à flexão, sendo muito frágil. Apresentam permeabilidade moderada a gases e alta permeabilidade ao vapor d'água (CLAIRE et al, 2002 a).

d) Nylon (poliamidas) – quando uma diamina reage com um diácido, o resultado é uma poliamida, popularmente conhecida como nylon. O produto é designado por algarismos pareados, onde o primeiro algarismo significa o número de átomos de carbono na diamina e o segundo o do diácido. Possui propriedades mecânicas boas (alta resistência) numa ampla faixa de temperatura (- 60 a 200<sup>0</sup>C), porém é caro. Seu grau de permeabilidade depende da umidade relativa ambiental e sua temperatura de termosselagem é elevada. Sua permeabilidade ao oxigênio, nitrogênio, dióxido de carbono e aromas é baixa, mas sua taxa de transmissão de vapor d'água é alta. Em embalagens são utilizados como filme laminado com PE, agindo o PE como barreira ao vapor d'água e fornecendo a termossoldabilidade. Devido a temperaturas de fusão elevadas, alimentos podem ser esterilizados por calor e cozidos dentro destas (FERRUA, 2008).

e) Policloreto de vinila (PVC) - devido à polaridade da ligação carbonocloro, apresenta elevada atração molecular, sendo um polímero rígido e duro à temperatura ambiente. Apresenta transição vítrea de 82<sup>0</sup>C e densidade na ordem de 1,4 g/cm<sup>3</sup>. Apresenta barreira ao vapor d'água inferior ao das poliolefinas, porém sua permeabilidade á gases quando não plastificado é melhor, no entanto, quando plastificado apresenta-se com alta permeabilidade a gases. No segmento de embalagens, é utilizado em filmes plastificados esticáveis, envoltório de produtos “in natura” e para filmes termoencolhíveis para lacres, rótulos ou envoltório de outras embalagens (CLAIRE, 2002).

A constatação da migração de plastificantes do PVC a partir de dispositivos biomédicos e de materiais de embalagem de alimentos levou diversos pesquisadores à investigação dos possíveis efeitos toxicológicos deste aditivo. O uso do PVC em embalagem de alimentos foi inibido

consideravelmente pela descoberta de que o monômero cloreto de vinila (VCM) é carcinogênico (FERRUA, 2008).

O Quadro 3 mostra as temperaturas de transição vítrea e de amolecimento de alguns polímeros.

**Quadro 3** - Temperatura de transição vítrea (Tg), temperatura de fusão cristalina Tm ou temperatura de amolecimento – (Tf) de alguns polímeros.

<b>Polímero</b>	<b>Tg (°C)</b>	<b>Tm ou Tf (°C)</b>
Polietileno de alta densidade - PEAD	- 125	137
Polietileno de baixa densidade – PEBD	-25	98
Polipropileno – PP	-18	176
Poliestireno – OS	100	240
Nylon 6.6	50	265
Policloreto de vinila – PVC	87	212

(CLAIRE, 2002)

### **1.6- Recipiente de material plástico**

A definição da Farmacopéia Brasileira é de que: “os materiais constituintes dos recipientes plásticos para uso farmacêutico são constituídos de um ou mais polímeros e, eventualmente, de certos aditivos. Esses materiais não devem apresentar, em sua composição, substâncias que podem ser extraídas pelo conteúdo do recipiente em proporções que levem à alteração de sua eficácia ou da sua estabilidade, ou o aumento da sua toxicidade (Farmacopéia Brasileira, 1988).

### **1.7- Pirogênio**

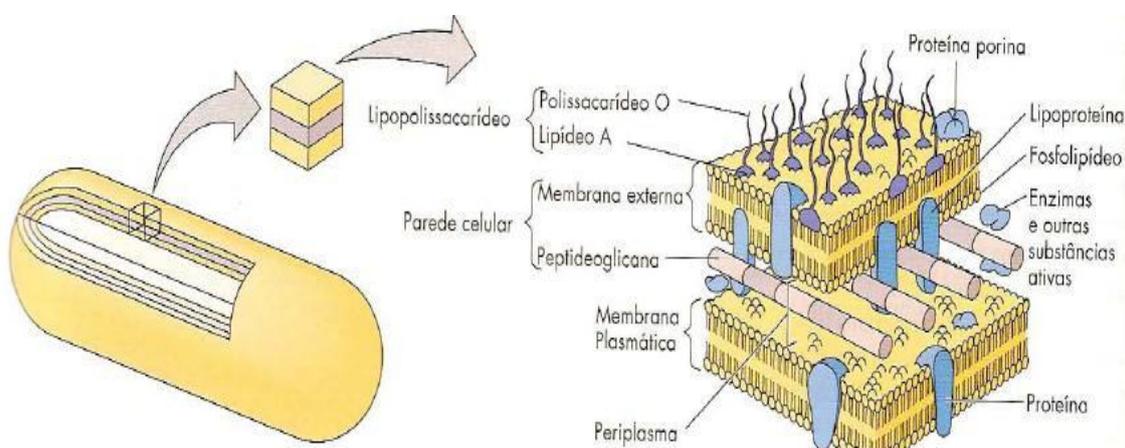
A palavra pirogênio é relacionada à palavra grega “pyro”, que significa queima ou fogo, uma descrição apropriada para substâncias que produzem elevação da temperatura corporal (PEARSON, 1985).

Os pirogênios podem ser classificados de acordo com sua origem em dois tipos: exógeno e endógeno. Os pirogênios exógenos são aqueles originados extracorporeamente e quando injetados sob condições específicas

causam elevação de temperatura corpórea. Podem provenientes de bactérias, fungos, vírus, fármacos entre outros (PEARSON, 1985).

A substância pirogênica mais importante no âmbito da indústria farmacêutica na produção de medicamentos e produtos para saúde é a endotoxina bacteriana. A endotoxina bacteriana é considerada um complexo de alto peso molecular presente na membrana externa das bactérias Gram – negativas, a atividade biológica da endotoxina está associada ao LPS – lipopolissacarídeos (FUKOMORI, 2008).

A Figura 1 mostra a constituição da parede celular de bactéria Gram-negativa.



**Figura 1** – Esquema da parede celular de bactéria Gram-negativa. (UNI-RIO)

Os LPS apresentam grande número de atividades biológicas, com importante papel em manifestações clínicas como: inflamação, febre, coagulação intravascular e choque (TRABULSI et al, 1999).

Um dos métodos “*in vitro*” de detecção de endotoxina bacteriana (presente na membrana externa da parede celular de bactérias Gram-negativas) é baseado na gelificação do lisado de amebócitos extraídos de caranguejo ferradura. A adição de uma solução contendo endotoxina a uma solução deste lisado produz uma gelificação (INTERNATIONAL PHARMACOPOEIA, 2006).

O caranguejo ferradura, cujo nome científico é *Limulus polyphemus*, habita em alguns locais na costa do Oceano Atlântico, dos Estados Unidos até o Golfo do México. Os amebócitos, que são células sanguíneas da hemolinfa dessa espécie de caranguejo, possuem enzimas de coagulação que são

ativadas pela endotoxina bacteriana. A reação entre a endotoxina e o lisado dos amebócitos do *Limulus* promove uma coagulação, visualizada pela formação de um gel sólido (FUKUMORI, 2008).

O teste “*in vitro*” de detecção de endotoxina bacteriana pelo método de gelificação utiliza o reagente LAL (lisado de amebócitos de *Limulus*) que é um extrato aquoso obtido após lise de células sanguíneas do caranguejo ferradura, colocado na presença da amostra a ser testada quanto a presença de endotoxina bacteriana.

A formação do gel acontece quando a endotoxina catalisa a ativação de uma proenzima presente no reagente LAL. A enzima ativada (coagulase) age na proteína coagulável (coagulogênio) também presente no reagente LAL. Este coagulogênio é ligado através de pontes de dissulfeto para formar o gel de reação (ALBERTINO, 2010).

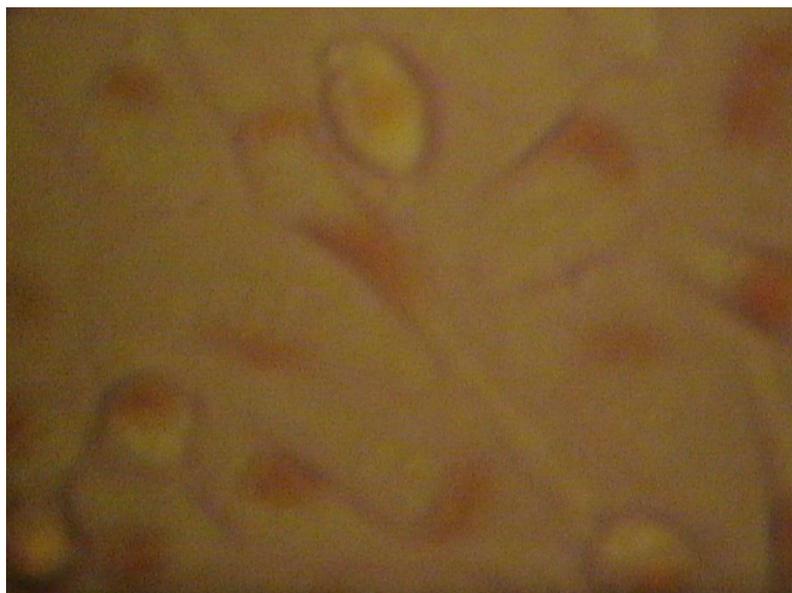
### **1.8- Citotoxicidade**

Segundo a Norma Brasileira / International Standard Organization - NBR / ISO 10993-1: 2003, o uso de técnicas de cultura de células, pode avaliar a lise celular, a inibição do crescimento e de outros efeitos em células provocadas por produtos para saúde, materiais e/ou seus extratos.

O ensaio de Citotoxicidade “In Vitro” - Método de Difusão em Agar é importante na avaliação de segurança de materiais plásticos empregados na fabricação de artigos ou dispositivos de plásticos de uso médico-hospitalar em contato direto ou indireto com o tecido humano.(INCQS, 2009)

O princípio do método se baseia na possibilidade da migração de substâncias químicas tóxicas presentes nas amostras de plásticos implantadas na camada de agar sobre as células L929 de fibroblasto de camundongo. As substâncias tóxicas ao migrarem através do agar penetram na camada celular, levando ao aparecimento de um halo claro (anel) sob e ao redor da amostra. Esta reação citotóxica, ou de toxicidade celular, ocorre devido ao processo de necrose celular (morte). O corante vital vermelho neutro, adicionado ao agar, é captado rapidamente pelas células vivas e armazenado nos lisossomos, corando as células em vermelho. Durante o processo de necrose, as células coradas liberam o corante produzindo regiões com células mortas (que se apresentam descoradas) (VIDAL, 2005).

A Figura 2 apresenta a microfotografia de células clone L929.



**Figura 2** – Fotomicrografia de células clone L929 – Aumento de 400X

O ensaio de citotoxicidade se enquadra perfeitamente na regra dos 3Rs que preconiza o Refinamento (*Refinement*), a Redução (*Reduction*) e a provável Substituição (*Replacement*) de testes “*in vivo*” por ensaios “*in vitro*” em culturas de células de rápida execução, alta reprodutividade, baixo custo, e que apresentam alta sensibilidade, reproduzindo ao máximo às condições fisiológicas “*in vivo*” (VIDAL, 2005).

### **1.9- Impermeabilidade**

A definição da palavra impermeável na língua portuguesa é de corpos que não se deixam atravessar pela água (LAROUSSE, 2004).

Essa definição pode ser estendida para outros tipos de substâncias e seus estados físicos, como: vapor d’água, vapores orgânicos, gases e luz. O material impermeável é aquele que impede totalmente a passagem de alguma dessas substâncias.

Quando se trata de embalagem, uma das suas funções é de formar barreira, impedindo parcialmente ou totalmente a passagem de determinadas substâncias. O que vai determinar o grau de permeabilidade permitido é o produto ao qual essa embalagem está armazenando. Alguns produtos necessitam de certa permeabilidade ao oxigênio, outros precisam de

impermeabilidade ao vapor d'água, impermeabilidade à luz entre outros.

As características de barreira de uma embalagem estão intimamente relacionadas à estabilidade química, física, microbiológica e biológica do produto.

A permeabilidade da embalagem depende das características moleculares do polímero e espessura do plástico, e também da presença de microfuros e fraturas na embalagem e no local da soldagem.

## 2- JUSTIFICATIVA

Visando a qualidade de serviços prestados à população, é essencial garantir a qualidade dos produtos a serem utilizados na disponibilização do enxerto ósseo para transplante.

Desta forma é necessária a padronização de requisitos mínimos na escolha e aceitação de embalagens, assegurando a integridade do enxerto ósseo, garantido a qualidade do produto disponibilizado e assegurando a sua proteção e acondicionamento.

Apesar da legislação em vigor citar que as embalagens utilizadas em banco de tecidos devam ter registro ou autorização da ANVISA, não existe até o momento nenhuma embalagem autorizada nem registrada nesta Agência. Além disso, não existe norma estabelecendo os testes e parâmetros aos quais essas embalagens devam preencher, como na Portaria número 950, de 26 de novembro de 1998 que Aprova o Regulamento Técnico sobre Bolsas Plásticas para coleta e acondicionamento de sangue humano e seus componentes (BRASIL, 1998).

Tornam-se necessários estudos sobre embalagens plásticas e a proposição de testes aos quais as mesmas devam ser submetidas para assegurar que estejam dentro de um rigor de qualidade que a complexidade do produto requer.

Estudos para a padronização dos requisitos mínimos de qualidade para aceitação do material de embalagem são necessários para: assegurar que a qualidade do tecido ósseo seja mantida a melhor possível, possibilitando a coleta e seu armazenamento de forma eficiente e segura reduzindo ao máximo os riscos de contaminação (principalmente microbiológica), interação entre a embalagem e o enxerto e possibilitar o máximo de resistência à ruptura e à deterioração da embalagem durante o seu período de armazenamento.

O uso indiscriminado de materiais plásticos para embalagens pode comprometer a qualidade do produto embalado, como também a saúde do consumidor.

### **3- OBJETIVOS**

#### **3.1- Objetivo geral**

Estabelecimento, identificação e controle da qualidade de embalagens plásticas para acondicionamento de enxerto ósseo humano utilizado em transplante baseado nas legislações brasileiras vigentes.

#### **3.2- Objetivos específicos**

Pesquisar o tipo de material de embalagem plástica usado pelos BTMEs no Brasil e os testes empregados no controle da sua qualidade.

Identificar por espectroscopia no infravermelho os materiais de embalagem plástica empregados no BTME-INTO no período de 2000 a 2010 e o adquirido recentemente.

Realizar testes biológicos “*in vitro*” para análise de endotoxina bacteriana e de citotoxicidade dessas duas embalagens.

Testar a permeabilidade ao vapor d'água das duas embalagens.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1- Levantamento do material utilizado pelos BTME no Brasil**

Material:

- Questionário.

Método:

- Realização de questionário e submissão a cinco BTMEs no Brasil, autorizados pelo SNT. Esse questionário foi aplicado durante o I Fórum Nacional de Banco de Tecidos Músculo-esqueléticos, realizado no INTO em outubro de 2009 e respondido pelos representantes dos respectivos serviços.

### **4.2- Identificação dos plásticos**

Equipamento:

- Espectrofotômetro no infravermelho modelo FTIR 8400, fabricante Shimadzu.

Método:

- Espectrofotometria no infravermelho, realizada segundo Procedimento de Uso número PU 3110.008 (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2008).

### **4.3- Ensaio para endotoxina bacteriana**

Material:

- Reagente do LAL, lisado liofilizado de amebócitos de *Límulus polyphemus* (Cambrex Bio Science Walkersville, Inc.);
- Endotoxina padrão de *Escherichia coli*;

- Água apirogênica;
- Tubos de ensaio de vidro (borosilicato) de 10 x 75 mm, com fundo redondo;
- Tubos de ensaio de vidro (borosilicato) de 12 x 100 mm;
- Estufa para despirogenização que atinja temperatura na faixa de 200 a 250<sup>0</sup>C;
- Banho-maria sem agitação, mantido à temperatura de 37 ± 1<sup>0</sup>C;
- Béquer de 250 mL despirogenizado;
- Tesoura despirogenizada;
- Agitador de tubos do tipo *Vortex*;
- Pipeta de 10 mL apirogênica, descartável;
- Micropipetas;
- Ponteiros estéreis, apirogênicos e descartáveis;
- *Parafilm*;
- pHmetro ou papel indicador de pH;
- Cronômetro;
- Estante para tubos de ensaio.
- Amostras das embalagens plásticas a serem testadas.

Método:

- Ensaio para endotoxina bacteriana pelo método *GEL-CLOT* (gelificação), realizado segundo POP de número 65.3330.006 (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2008).

Segundo a Farmacopéia Americana de 2009, para preparação das amostras a serem testadas devemos escolher de 3 a 10 dispositivos. Esses

deverão ser lavados ou rinsados com água do reagente do LAL. (THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2009)

Cada embalagem a ser testada foi cortada em três fragmentos que coubesse em um bécker de 250 mL e totalmente imersos em 240 mL de água do reagente do LAL. Os 3 fragmentos das amostras colocados no béquer, foram mantidos em banho-maria à 37°C por uma hora para que fosse feita a extração de possível endotoxina.

A concentração limite de endotoxina (CLE) da solução de lavagem é calculado pela fórmula:

$$\text{CLE} = (K \times N) / V, \text{ onde:} \quad \text{Equação 1}$$

K é igual ao montante de endotoxina permitida por dispositivo. (que é determinado pela Farmacopéia Americana de 2009 para artigos médicos um limite não superior á 20,0 unidades de endotoxina - UE);

N é igual ao número de amostras testadas, que foi igual a três e,

V é igual ao volume da água apirogênica utilizada, de 240 mL.

Usando a fórmula  $\text{CLE} = [K(\text{EU}) \times N] / V(\text{mL})$ ;  $\text{CLE} = (20\text{EU} \times 3) / 240\text{mL}$ , chegamos ao valor de 0,25 EU/mL para o limite aceitável de endotoxina na solução de lavagem, usada na preparação das amostras.

Após a retirada do banho-maria, as amostras foram agitadas por um minuto no *Vórtex*, com objetivo de extrair e homogenizar toda endotoxina possível presente nas amostras para a água apirogênica. Esta solução a ser testada deve ter pH em torno de 6 a 8.

Depois de calculada a CLE calculamos a Máxima Diluição Válida (MDV), que é a diluição máxima permitida da amostra em que o limite da endotoxina pode ser determinado.

A fórmula utilizada para este cálculo é:  $\text{MDV} = \text{CLE}(\text{EU/mL}) / \lambda(\text{EU/mL})$ .  
Equação 2

Onde  $\lambda$  é o valor da sensibilidade do reagente LAL (é específico para cada kit e declarado no frasco do reagente pelo produtor, neste caso o valor é de 0,125 EU/mL).

Logo  $\text{MDV} = (0,25\text{EU/mL}) / 0,125\text{EU/mL}$ , então  $\text{MDV} = 2$ .

Ao ensaio realizado foram incluídos controles positivo (com sobrecarga de endotoxina padrão) e negativo (utilizado água apirogênica). As amostras e os controles foram testados em duplicata.

O ensaio consistiu em adicionar 100  $\mu\text{L}$  da amostra da solução

proveniente da extração e nas diluições de trabalho de 1:2 e 1:4, ao tubo de reação. A seguir adicionou-se 10 µL de endotoxina padrão na concentração de  $2 \lambda = 0,25$  EU/mL (conforme descrito na Farmacopéia Americana,2009), aos tubos do controle positivo. Para os tubos de controle negativos são colocados 100 µL de água apirogênica utilizada nas diluições das amostras.

Após o preparo de todos os tubos foi adicionado 100 µL do reagente LAL em cada um deles, assegurando-se que o tempo de distribuição do reativo não exceda 2 minutos para todos os tubos.

Os tubos são incubados em banho-maria á  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 1 hora  $\pm$  2 minutos. Esses devem ficar imersos cerca de 3 cm na água do banho.

Após 1 hora de incubação os tubos são retirados cuidadosamente e invertidos lentamente um a um até formar um ângulo de  $180^{\circ}$ .

Os resultados do teste são avaliados sendo considerado positivo se um gel firme é formado no fundo do tubo, porém se ao inverter o tubo, o fundo apresentar um aspecto mole ou um pouco fluido o ensaio é considerado negativo para presença de endotoxina.

#### **4.4- Ensaio de citotoxicidade “*In vitro*”**

Material:

- Células clone L929 – fibroblasto de camundongo (ATCC – American Type Culture Colletion, Rockville, MD, EUA);
- Meio de cultura Eagle MEM (Minimum Essencial Medium) ;
- Soro fetal bovino (Gibco, E.U.A);
- Penicilina (10000 UI/mL) e estreptomicina (10000 µg/mL);
- Garrafa para cultivo celular;
- Solução de tripsina (Difco) 0,125% em PBS;
- Capela de fluxo laminar;
- Microscópio óptico invertido, marca Nikon e modelo Eclipse TS100;

- Pipetas volumétricas de 1, 5 e 10 mL;
- Câmara de Neubauer;
- Estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>;
- Placa plástica (3,5 cm de diâmetro) para cultivo celular;
- Agar, 1% Bacto-Agar, Difco, Brasil.
- Corante Vermelho neutro a 0,01% em PBS;
- Banho Maria a 37 e 44°C;
- Controle negativo – material padrão de referência da Farmacopéia Americana (USP) – lote G8, cat. N°. 54500.
- Controle positivo –látex para garrote, fabricante Lengruher T200;
- Solução tampão de fosfato - PBS;
- Papel alumínio;
- Régua milimetrada ou paquímetro.
- Amostras das embalagens plásticas a serem testadas.

#### Método:

- Ensaio de Citotoxicidade In Vitro Método de Difusão em Agar, realizado segundo POP de número 65.3330.010 (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2009).

Amostras plásticas de embalagem com área aproximadamente de 0,25 cm<sup>2</sup> (0,5cm x 0,5 cm), 0,5 cm do tubo de látex (controle positivo) e 0,5 cm do controle negativo de referência USP, foram colocados em contato com a superfície solidificada do Agar sobre as culturas de células L929 em duplicata mantidas em placa de 3,5cm de diâmetro.

Células de fibroblasto de camundongo (Clone L929) foram cultivadas em frasco de cultura celular com o meio de cultura MEM, com 5% de

soro fetal bovino, com uma densidade de cerca de  $10^5$  células/mL. As culturas foram novamente incubadas a  $37 \pm 1$  °C, em uma incubadora umidificada, até 24 horas, em uma atmosfera de dióxido de carbono a  $5 \pm 1\%$  e uma monocamada celular próxima à confluência, ou seja, superior a 80% foi obtida em placas de 3,5 cm de diâmetro.

Após a incubação, a camada de Agar e o meio de cultura suplementado com soro, na presença do corante vital vermelho neutro foram adicionados substituindo o meio de cultura. As camadas de agar atuam como uma almofada para proteger as células de danos mecânicos e ao mesmo tempo permite a difusão de produtos químicos a partir das espécimes poliméricas. A coloração é capaz de caracterizar células viáveis pela presença vermelha no seu citoplasma.

Vinte e quatro horas após a aplicação das amostras avaliou-se o grau de citotoxicidade através da observação microscópica da morfologia e da coloração das células sob e ao redor da amostra-teste e dos controles. A extensão da área descorada (células mortas) a partir das amostras foi quantificada numa escala de 0 a 4 de acordo com o descrito no Quadro 4 a baixo. O halo foi medido com régua milimetrada.

**Quadro 4:** Graus de citotoxicidade.

<b>Grau</b>	<b>Citotoxicidade</b>	<b>Descrição da zona de citotoxicidade</b>
0	Ausência	Ausência de descoramento ao redor ou sob a amostra
1	Leve	Zona de descoramento limitada a área sob amostra
2	Branda	Tamanho da zona de descoramento a partir da amostra menor que 0,5 cm
3	Moderada	Tamanho da zona de descoramento a partir da amostra compreendido entre 0,5 cm a 1,0 cm

4	Severa	Tamanho da zona de descoloramento a partir da amostra maior que 1,0 cm, porém não envolvendo a placa inteira.
---	--------	---

(INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2009)

O sistema de cultura celular deve ser adequado para detectar no controle negativo grau 0 (não reatividade) e no controle positivo pelo menos igual ou superior ao grau 3 (moderado). O halo foi medido com uma régua milimetrada.

#### 4.5- Permeabilidade ao vapor d'água

Material:

- Solução de Na Cl a 0,9% (NaCl P.A. Merck);
- Seladora Lorenzetti;
- Funil de transferência médio;
- Proveta de 500 mL;
- Balança digital, fabricante Sartorius e modelo LP620P;
- Dessecador com solução saturada de hidróxido de potássio;
- Termo higrômetro, marca TFA modelo Microzelle MN 2400 e
- Geladeira.

Método:

- Ensaio de permeabilidade ao vapor d'água, conforme metodologia descrita na Portaria número 950, de 26 de novembro de 1998 (BRASIL, 1998) empregado na avaliação de bolsas plásticas para coleta e acondicionamento de sangue humano.

A metodologia foi adaptada para as embalagens testadas, introduzindo na embalagem um volume de solução de 0,9% de cloreto de sódio até

completar o volume da embalagem, evitando a presença de ar. Selou-se a embalagem, pesou-se e manteve-se a mesma a  $5 \pm 1$  °C em uma atmosfera com umidade relativa de  $50 \pm 5\%$  por 21 dias. Após este período foi realizado a segunda pesagem.

Os testes foram realizados com as embalagens de duas formas diferentes: testado a permeabilidade ao vapor d'água somente com a embalagem primária, testando assim a permeabilidade do plástico utilizado; testado a embalagem tripla (colocada uma embalagem dentro da outra), adicionando a solução somente à embalagem primária, mimetizando a forma com que a embalagem é utilizada para o armazenamento do tecido ósseo.

Em todos os ensaios foram testados os plásticos de duas embalagens: embalagem usada pelo BTME-INTO desde o ano 2000 até 2010; embalagem comprada em 2009, para ser testada quanto a sua qualidade.

## 5. RESULTADOS

### 5.1- Levantamento do material de embalagem utilizado pelos BTME no Brasil

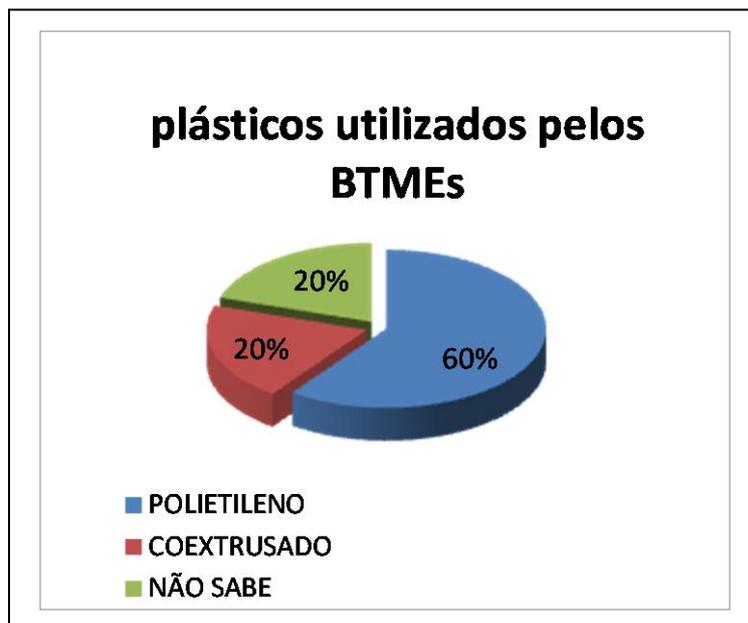
O levantamento realizado com os cinco BTME, incluiu além do tipo de material utilizado na embalagem plástica para o enxerto, os testes efetuados com estas embalagens e o relato de problemas apresentados pelas mesmas.

Os resultados estão disponibilizados no Quadro 5 abaixo. Os BTMEs foram dispostos de forma numérica para que não fossem identificados.

**Quadro 5** - Tipos de plásticos utilizados, testes realizados e problemas identificados por cinco BTMEs no Brasil.

<b>BTME</b>	<b>PLÁSTICO UTILIZADO</b>	<b>TESTES REALIZADOS</b>	<b>INTERCORRÊNCIAS</b>
<b>BTME 1</b>	Não mencionado	Sim, mas não relataram quais.	Não há relatos.
<b>BTME 2</b>	Coextrusado 5 camadas Nylon + polietileno	Sim. Pirogênio, toxicidade e esterilidade.	Nenhuma.
<b>BTME 3</b>	Polietileno de baixa densidade.	Não.	Quebra.
<b>BTME 4</b>	Polietileno de baixa densidade.	Sim, mas não relataram quais.	Descolamento de etiqueta.
<b>BTME 5</b>	Polietileno de baixa densidade.	Sim, mas não relataram quais.	Estufamento da embalagem.

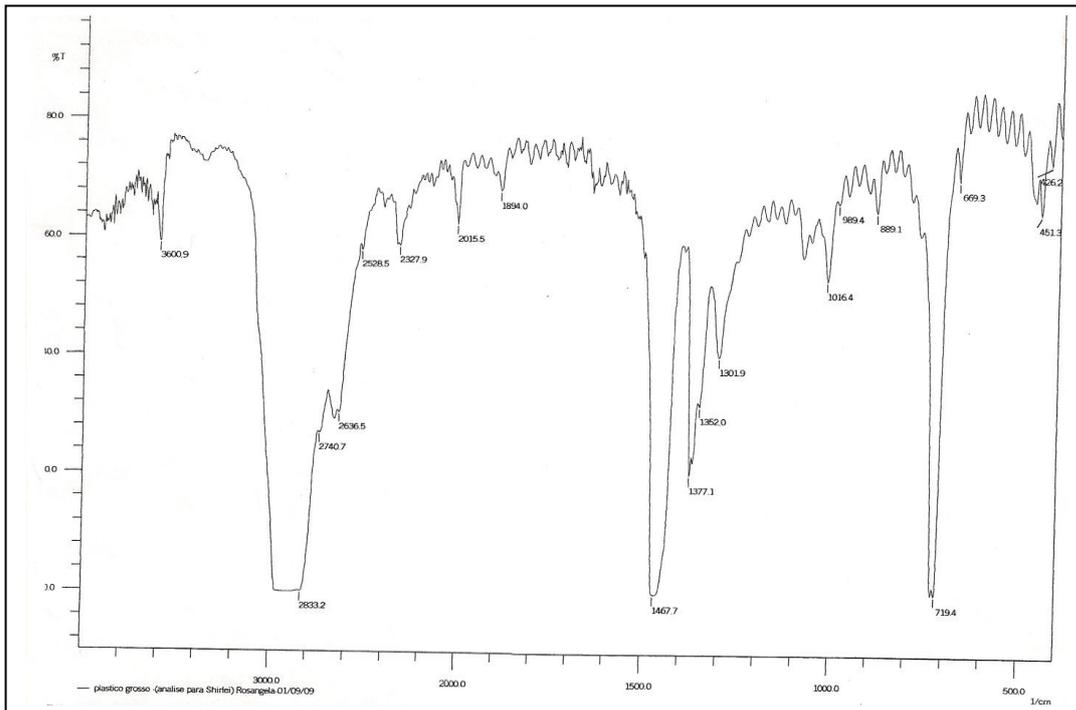
A figura 3 apresenta o percentual do material plástico utilizado em embalagens nos BTMEs.



**Figura 3:** Representação da porcentagem de material plástico utilizado em embalagens nos Banco de Tecidos Musculoesqueléticos (BTMEs), no Brasil.

## 5.2- Identificação dos plásticos pelo espectrofotômetro no infravermelho

Realizada leitura no espectrofotômetro no infravermelho do material da embalagem plástica adquirida em 2009, obtendo o espectro disponibilizado abaixo, mostrado na Figura 4.



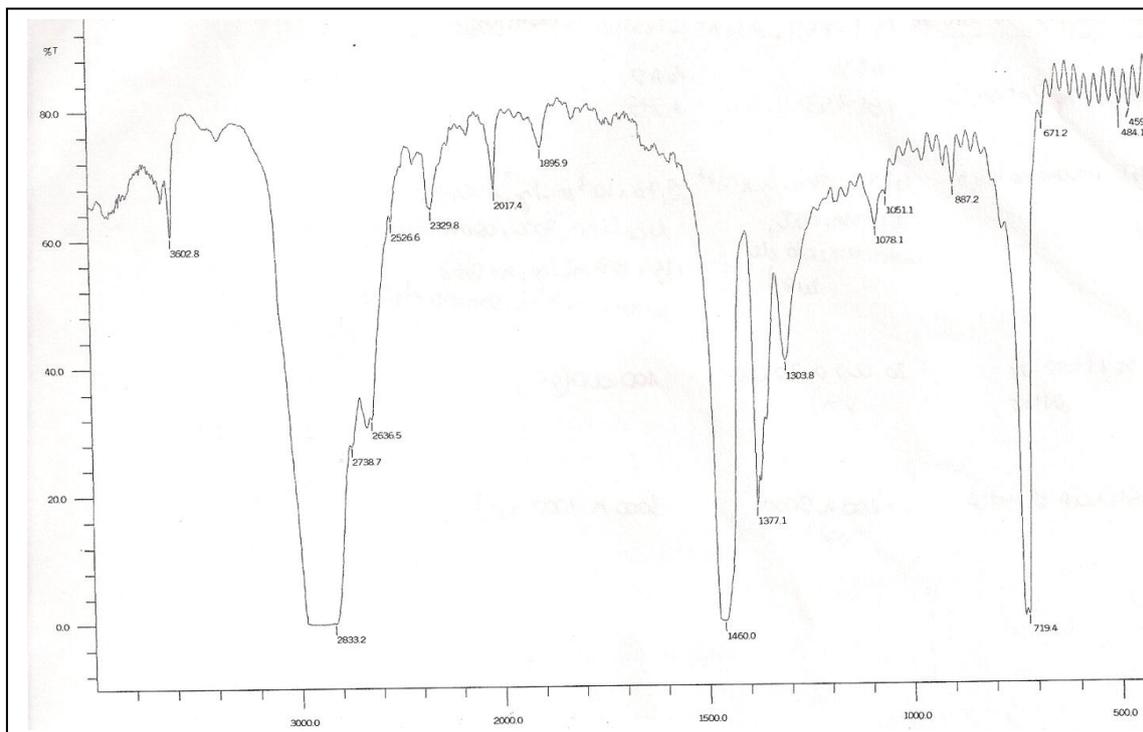
**Figura 4:** espectro de transmissão no infravermelho de material plástico adquirido no ano de 2009. Posição das bandas indicada por número de onda (cm<sup>-1</sup>).

As posições no infravermelho em números de onda (cm<sup>-1</sup>), provenientes da análise do material plástico das embalagens adquiridas em 2009, são mostradas no Quadro 6.

**Quadro6:** Espectro de absorção no infravermelho de material plástico adquirido em 2009. Posição das bandas indicada por números de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ).

Posição ( $\text{cm}^{-1}$ )
719,4
1467,7
2833,2
3600,9

Realizada leitura no espectrofotômetro no infravermelho do material da embalagem plástica adquirida em 2000, obtendo o espectro disponibilizado abaixo, mostrado na Figura 5.



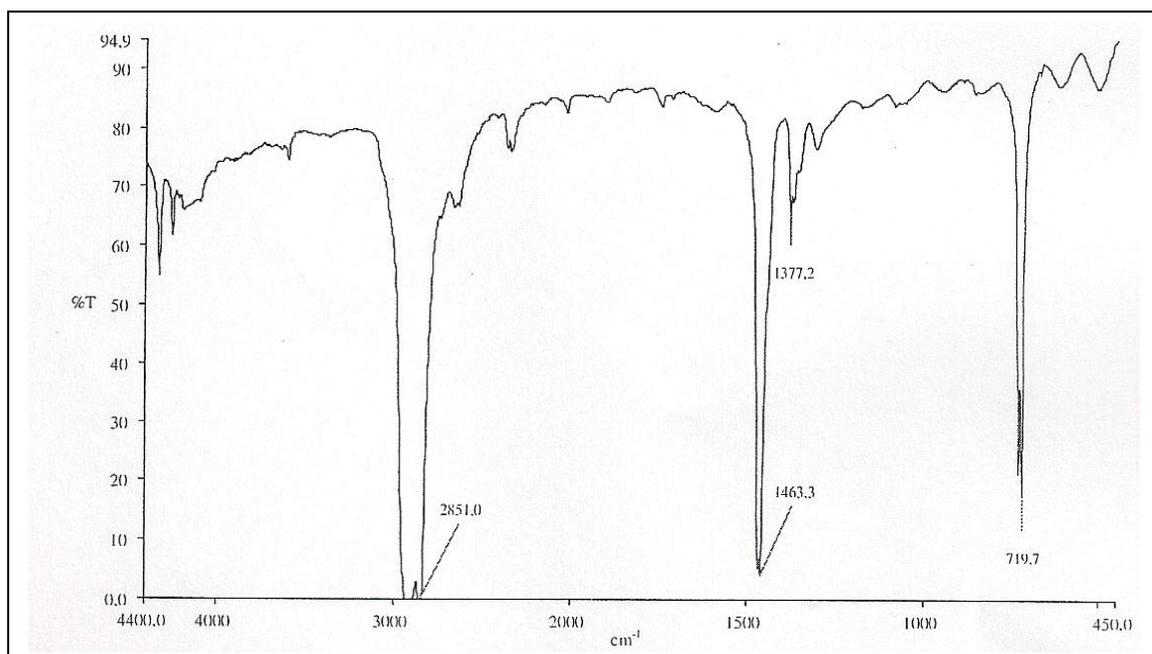
**Figura 5:** espectro de transmissão no infravermelho de material plástico adquirido no ano de 2000. Posição das bandas indicada por número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ).

As posições no infravermelho em números de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ), provenientes da análise do material plástico das embalagens utilizadas desde 2000, são mostradas no Quadro 7.

**Quadro7:** Espectro de absorção no infravermelho de material plástico adquirido em 2000. Posição das bandas indicada por números de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ).

Posição ( $\text{cm}^{-1}$ )
719,4
1460,0
2833,2
3602,8

A figura 6 mostra o espectro no infravermelho do PEBD de referência.



**Figura 6:** espectro de transmissão no infravermelho de material de

referência polietileno de baixa densidade. Posição das bandas indicada por número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ). (CLAIRE et al, 2002 b)

As posições no infravermelho em números de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ), provenientes da análise do material de referência PEBD, são mostradas no Quadro 8.

**Quadro 8:** Espectro de absorção no infravermelho de material de referência polietileno de baixa densidade. Posição das bandas indicada por números de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ).

Posição ( $\text{cm}^{-1}$ )
719,7
1463,3
2851,0
Aproximadamente 3600,0

Comparando-se os espectros das amostras com o material de referência (PEBD), as posições dos picos da porcentagem de transmissão se equivalem, concluindo-se desta forma que os materiais utilizados correspondem ao PEBD.

### 5.3- Ensaio para endotoxina bacteriana

Segundo a Farmacopéia Americana (USP) publicada em 2009 (THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 2009), o limite de endotoxina bacteriana não deve ser superior a 20,0 USP Unidades de Endotoxina por produto de uso médico (exceto para artigos em contato com fluido cerebrospinal, no qual o limite não pode ultrapassar 2,15 USP Unidades de Endotoxina).

A legislação vigente de BTME, não determina o teste a ser feito nem o limite de endotoxina aceitável na embalagem, somente declara que o produto

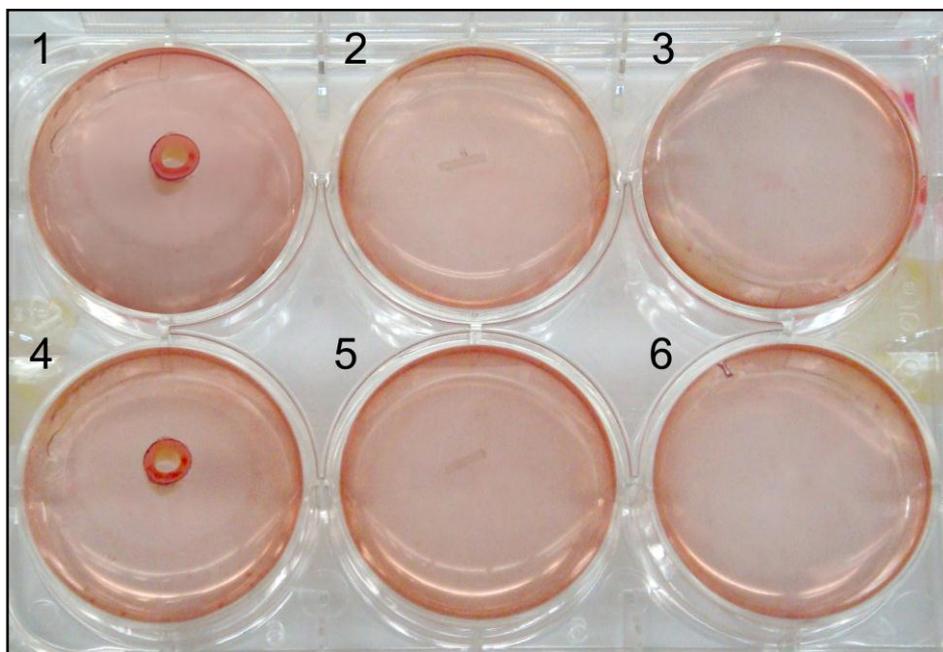
deve ser apirogênico.

As amostras testadas em duplicata apresentaram resultados negativos para a diluição e a sensibilidade do teste, onde seriam aceitáveis resultados satisfatórios  $\leq 0,25$  EU/mL, obtivemos resultados  $< 0,125$  EU/mL.

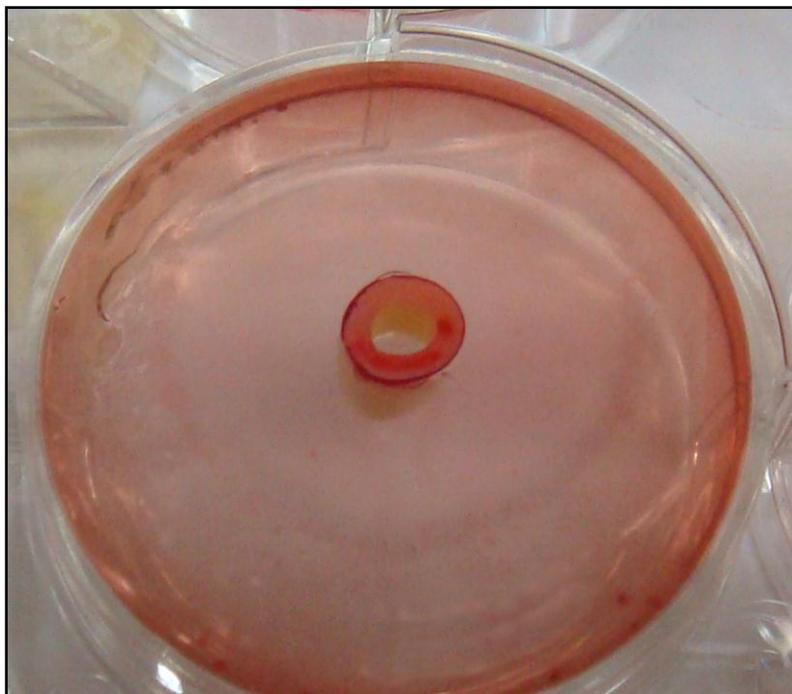
#### **5.4- Ensaio de Citotoxicidade *In Vitro* pelo Método de Difusão em Agar**

Segundo a USP 2009, as amostras de plástico elastômero e outros materiais poliméricos ao serem testadas quanto à reatividade biológica em contato com cultura celular de mamífero apresentam resultados satisfatórios quando nenhuma das culturas mostrar grau de citotoxicidade superior a 2 (branda). Adicionalmente, o controle negativo deve mostrar grau 0 de reação citotóxica e grau  $\geq 3$  para o controle positivo.

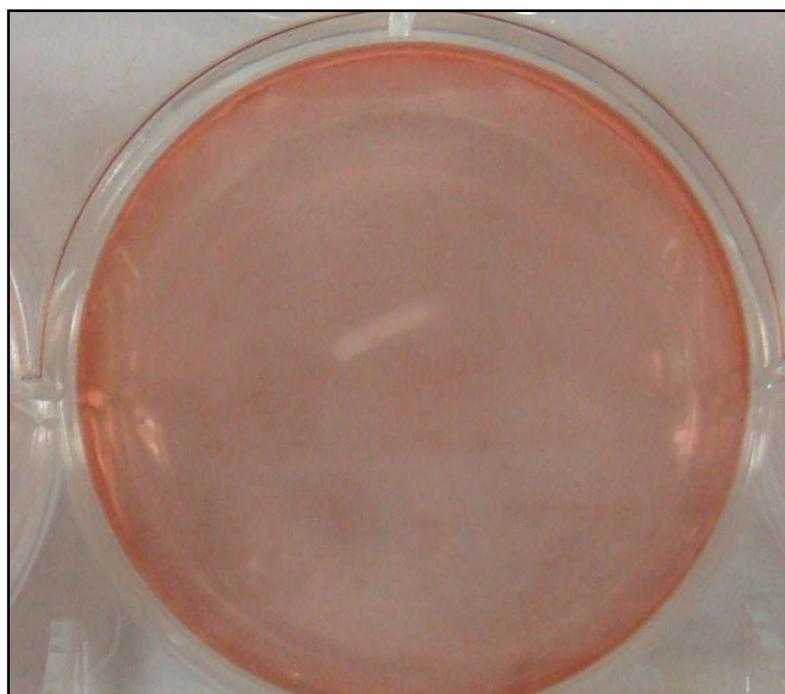
As amostras testadas em duplicata foram satisfatórias, pois apresentaram grau de citotoxicidade 0 (não havendo presença de halo), controle negativo apresentou grau de citotoxicidade 0 (não havendo presença de halo) e controle positivo apresentou grau de citotoxicidade 3 (apresentando halo de 0,9 a 1,0cm) conforme as Figuras 7,8,9,10 e 11, mostradas abaixo.



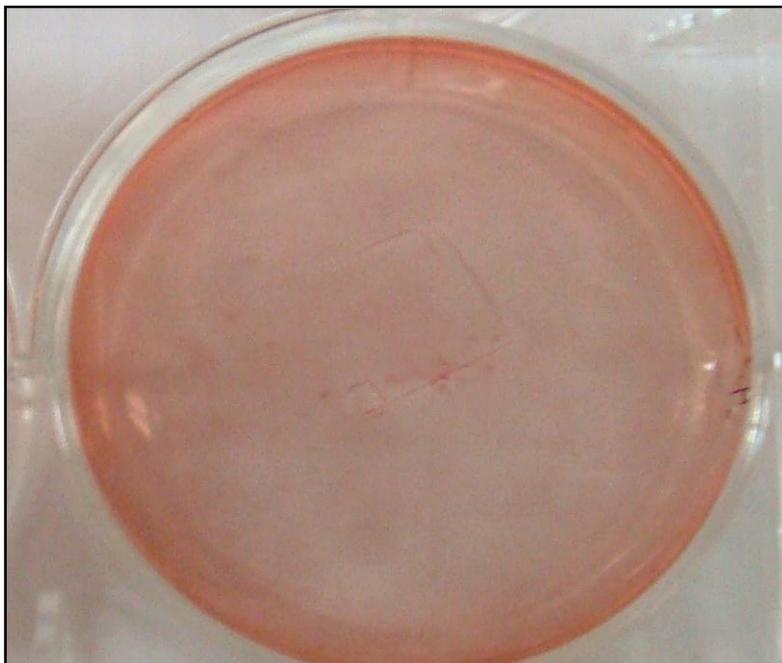
**Figura 7** – Ensaio de citotoxicidade *in vitro* em células L929 – método de difusão em Agar. Reatividade biológica 24 h após aplicação em duplicata de materiais em Agar com vermelho neutro. Em 1 e 4: formação de halo de descoloramento celular em Agar (grau 3) para o controle positivo (látex de garrote); 2 e 5: ausência de halo (grau 0) para o controle negativo; 3 e 6: ausência de halo (grau 0) – controle celular.



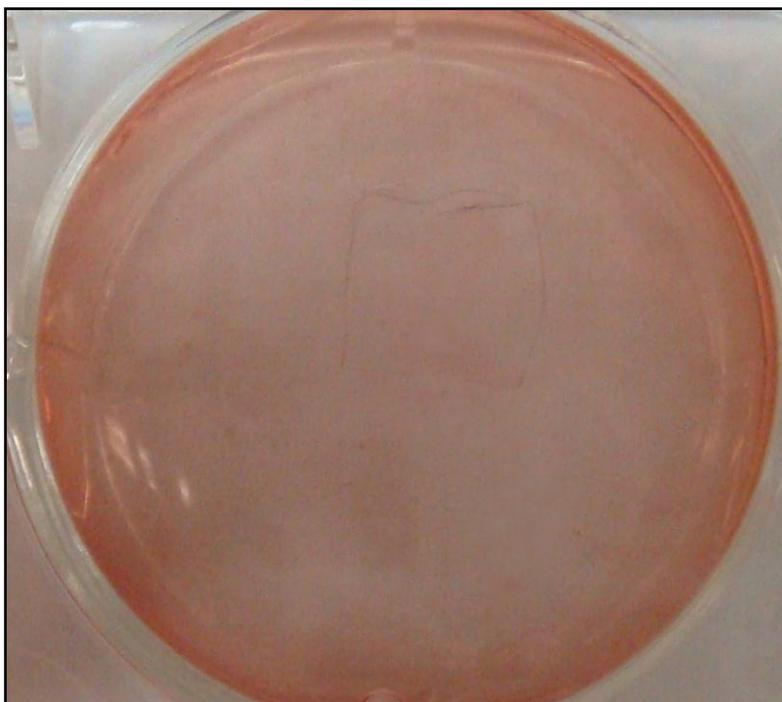
**Figura 8** – Ensaio de citotoxicidade *in vitro* em células L929 – método de difusão em Agar. Reatividade biológica 24 h após aplicação de controle positivo (látex de garrote) em Agar com vermelho neutro. Grau de citotoxicidade 3 visualizado pela formação de halo de descoloramento celular na faixa de 0,9 a 1,0 cm.



**Figura 9** – Ensaio de citotoxicidade *in vitro* em células L929 – método de difusão em Agar. Reatividade biológica 24 h após aplicação de controle negativo (plástico de referência USP, Lote G8 cat n°. 54500) em Agar com vermelho neutro. Grau de citotoxicidade 0 visualizado pela ausência de formação de halo de descoloramento celular.



**Figura 10** – Ensaio de citotoxicidade *in vitro* em células L929 – método de difusão em Agar. Reatividade biológica 24 h após aplicação da amostra de plástico utilizada pelo BTME-INTO do ano 2000 á 2010 em Agar com vermelho neutro. Grau de citotoxicidade 0 visualizado pela ausência de formação de halo de descoloramento celular.



**Figura 11** – Ensaio de citotoxicidade *in vitro* em células L929 – método de difusão em Agar. Reatividade biológica 24 h após aplicação da amostra de plástico adquirida pelo BTME-INTO no ano 2009 em Agar com vermelho neutro. Grau de citotoxicidade 0 visualizado pela ausência de formação de halo de descoloramento celular.

## 5.5- Ensaio de Permeabilidade ao vapor d'água

Segundo a Portaria número 950, de 26 de novembro de 1998 (BRASIL, 1998), as bolsas plásticas para coleta e acondicionamento de sangue humano quando testadas quanto a permeabilidade ao vapor d'água, não devem apresentar perda de massa maior que 1%.

Desta forma efetuou-se o teste e adotou-se como limite aceitável o preconizado para bolsas de coleta de sangue por não se dispor na legislação vigente (BRASIL, 2009) um valor pré-estabelecido aceitável para embalagem de acondicionamento de enxerto ósseo humano apesar da exigência de que as embalagens empregadas em BTME sejam impermeáveis (BRASIL, 2006).

Obtivemos os seguintes resultados conforme quadro 9 abaixo:

**Quadro 9:** Ensaio de permeabilidade ao vapor d'água para embalagem plástica de PEBD utilizada pelo BTME-INTO no período de 2000 á 2009 e embalagem plástica de PEBD adquirida pelo BTME-INTO em 2009. Peso inicial em gramas das embalagens e após 21 dias em temperatura controlada de  $5 \pm 1$  °C e umidade relativa de  $50 \pm 5\%$ .

<b>Tipo de embalagem</b>	<b>Peso inicial (g)</b>	<b>Peso após 21 dias (g)</b>
Embalagem utilizada BTME-INTO, única.	235,15	235,13
Embalagem utilizada BTME-INTO, tripla.	311,14	311,15
Embalagem adquirida em 2009, única.	187,30	187,28
Embalagem adquirida em 2009, tripla.	334,34	334,34

Comparando-se os pesos iniciais e após 21 dias das embalagens, constantes do quadro 9, não houve perda de massa maior que 1% para as embalagens. Concluímos que por essa metodologia as amostras mostraram-se impermeáveis ao vapor d'água.

## 6. DISCUSSÃO

A aplicação e utilização de enxerto ósseo vêm crescendo muito no Brasil, com isso a possibilidade do aumento no número de bancos de ossos também. As legislações têm tentado acompanhar essa evolução e cada vez mais mostram uma preocupação com a qualidade dos serviços prestados e a biossegurança dos produtos oferecidos.

A maioria dos BTMEs utiliza o polímero PEBD há algum tempo e o histórico destes bancos vem mostrando que não existem relatos de problemas graves na utilização dessas embalagens.

É percebido que apesar da preocupação em obter material de boa qualidade, os bancos em sua maioria não sabem como avaliar e controlar essa qualidade, por desconhecerem os testes e os parâmetros aceitáveis para garantir o uso adequado dessas embalagens evitando-se danos aos pacientes.

O presente estudo demonstrou que o BTME-INTO está no caminho e que dentro dos ensaios realizados essas embalagens se mostraram satisfatórias.

Sabemos que outros ensaios deverão ser realizados como: migração de substâncias tóxicas do plástico para o enxerto, testes físicos de estabilidade do plástico às baixas temperaturas, tempo de prateleira ou validade deste material nesta embalagem, testes de esterilidade e outros testes de impermeabilidade.

## 7. CONCLUSÃO

Com base nas nossas considerações, chegamos às seguintes conclusões:

Apesar das legislações mais recentes estabelecerem que é necessário que os BTME utilizem embalagens para tecido ósseo registradas ou autorizadas pela ANVISA, sabemos hoje que não existe nenhuma embalagem que apresente essas condições.

Faz-se necessário a criação de alguma legislação ou recomendação normativa que defina quais os ensaios mínimos a serem realizados e seus parâmetros aceitáveis e que seja claro o suficiente para os usuários poderem utilizá-la.

Para chegarmos a esses dados precisaremos definir exatamente o que precisamos e o que esperamos destas embalagens e algumas perguntas ficam abertas para serem respondidas.

O ideal é que fosse realizado um Regulamento Técnico sobre Embalagens Plásticas para Enxerto ósseo, assim como foi publicado em novembro de 1998 um Regulamento Técnico sobre Bolsas Plásticas para coleta e acondicionamento de sangue humano e seus componentes.

## 8. REFERÊNCIAS

- ALBERTINO, S.R.G. Água para hemodiálise no Estado do Rio de Janeiro: Avaliação dos resultados dos ensaios de endotoxina bacteriana (LAL) realizados pelo INCQS no período de 2000 a 2008. Rio de Janeiro: FioCruz, 2010. 38p. Monografia (Especialização) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Rio de Janeiro.
- AMATUZZI, M.M. et al. Banco de tecidos: estruturação e normatização. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v.35, n.5, maio 2000. Disponível em: <<http://www.rbo.org.br> > Acesso em 14 de abril 2009.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). Avaliação Biológica de Produtos para Saúde. Parte I: Avaliação e ensaio. Rio de Janeiro: 2003.12p.(NBR ISO 10993-1)
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **Salas limpas e ambientes controlados associados**. Parte 1: Classificação de limpeza do ar. Rio de Janeiro: 2005.27p. (ABNT NBR ISO 14644-1)
- BRASIL, 2000. Portaria GM número 904 de 16 de agosto de 2000. - Cria, no âmbito do Sistema Único de Saúde - SUS, os Bancos de Tecidos Ósteo-Fáscio-Condroligamentosos de procedência humana para fins terapêuticos ou científicos. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br> > acesso em 16/01/2010.
- BRASIL, 2001. RDC nº 185, de 22 de outubro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico que consta no anexo desta Resolução, que trata do registro, alteração, revalidação e cancelamento do registro de produtos médicos na Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Disponível em: < <http://e-legis.anvisa.gov.br> > , acesso em 29/01/2010.
- BRASIL, 2002. Portaria GM/MS número 1686 de 20 de setembro de

2002. Aprova as Normas para Autorização de Funcionamento e Cadastramento de Bancos de Tecidos Musculoesqueléticos pelo Sistema Único de Saúde. Disponível em:< <http://bvsms.saude.gov.br> > acesso em 15/01/2010.

- BRASIL, 2006. RDC 220 de 27 de dezembro de 2006. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o Funcionamento de Bancos de Tecidos Musculoesqueléticos e de Bancos de Pele de origem humana. Disponível em:< <http://bvsms.saude.gov.br> > acesso em 16/01/2010.
- BRASIL, 2009. Portaria número 2600 de 21 de outubro de 2009. Aprova o Regulamento Técnico do Sistema Nacional de Transplantes. Disponível em:<http://www.brasilsus.com.br> acesso em 16/01/2010.
- BRASIL,1998. Portaria número 950, de 26 de novembro de 1998. Aprova o Regulamento Técnico sobre Bolsas Plásticas para coleta e acondicionamento de sangue humano e seus componentes. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br>, acesso em 02/06/2009.
- CANALE et al. **Campbell's. Operative Orthopaedics**. 9 ed.Saint Louis: Mosby-Year Book,1998.v.1,c.1,p.40-42.
- CASARETT AND DOULL. The Basic Science of Poisons.In: AUTIAN,J. **Plastics**. Second Edition. New York: Macmillan Publishing Co., Inc., 1980. Chapter 20, p. 532.
- CLAIRE, I.G.L. et al. **Embalagens Plásticas Flexíveis – Principais Polímeros e Avaliação de Propriedades**. Campinas: CETEA/ITAL, 2002 a. Cap.1, p.7-22.
- CLAIRE, I.G.L. et al. **Embalagens Plásticas Flexíveis – Principais Polímeros e Avaliação de Propriedades**. Campinas: CETEA/ITAL, 2002 b. Cap.5, p.79-83.

- DEL VALLE, R.A. et al. Estudo do comportamento de enxerto ósseo com material doador obtido dos bancos de tecidos músculos-esqueléticos. **Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo**, 18(2) 189-194, maio/ago. 2006. Disponível em: < [http://www.cidadesp.edu.br/old/revista\\_odontologia](http://www.cidadesp.edu.br/old/revista_odontologia)> Acesso em 14 abril 2009.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4ª Edição. Parte I. São Paulo: Ed. Atheneu.cap.IV-5, 1998.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4ª Edição. Parte I. São Paulo: Ed. Atheneu.cap.IX.2.2, 1998.
- FERRUA, F.Q. et al. **Conservação de alimentos – Métodos de processamento, equipamentos e embalagens**. Minas Gerais: Universidade Federal de Lavras- UFLA, 2008. p287-305.
- FRIEDLAENDER, G. E.; MANKIN, H. J.; GOLDBERG, V. M. **Bone Grafts and Bone Graft Substitutes**. 1 ed. Rosemont: American Academy of Orthopaedic Surgeons, 2006. c.1, p.1-3.
- FUKUMORI, N.T.O. Determinação de endotoxina bacteriana (pirogênio) em radiofármacos pelo método de formação de gel. Validação. São Paulo: USP, 2008. 77p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.
- INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. Ensaio de Citotoxicidade In Vitro – Método de Difusão em Agar. Procedimento Operacional Padronizado nº 65.3330.010, revisão 10. Rio de Janeiro, 2009.
- INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. Ensaio para Endotoxina Bacteriana. Procedimento Operacional Padronizado nº 65.3330.006, ver. 07. Rio de Janeiro, 2008.

- INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. Espectrofotômetro de Infravermelho. Procedimento de Uso nº PU 3110.008. Rio de Janeiro, 2008.
- INTERNATIONAL PHARMACOPOEIA. Geneva, 2006. World Health Organization. 4 ed. V.2. p.1245-1247.
- LAROUSSE: Larousse Escolar da Língua Portuguesa. São Paulo: Larousse do Brasil, 2004. 800 p.
- MANO, E. B. **Introdução a polímeros**. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda. 1985.
- MOZELA, A.P. et al. Análise Epidemiológica da obtenção, processamento e utilização de enxertos homólogos pelo banco de tecidos. **R. INTO**, v.3, n.1, jan/abr. 2005. Disponível em: <http://www.into.saude.gov.br/revista/2005/artigo5>>. Acesso em 14 abril 2009.
- PEARSON, F. C. Pyrogens. **Endotoxins, LAL testing, and Depyrogenation**. New York: Marcel Dekker, 1985. p.11.
- PORTAL SAÚDE. Planilha com banco de tecidos músculo-esqueléticos autorizados para funcionarem pelo SNT. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br>. Acesso em: 17 de fev. 2010.
- RONDINELLI et al. Rotina do Banco de Ossos do Hospital de Traumatologia-Ortopedia (HTO-RJ). **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 29, n.6, junho 1994. Disponível em <http://www.inscricaoonline.com.br/docs/sbcj>. Acesso em: 03 de jun. 2009.
- THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA. 32ed. Rockville, 2009. v.1, p.125.

- TRABULSI, L.R. et al. Microbiologia. 3ed. São Paulo: Editora Atheneu, 1999. 586p.
- UNI-RIO. Aula de citologia bacteriana. Curso de Graduação da Universidade do Rio de Janeiro. Disponível em: [www.unirio.br/dmp/Graduacao/.../Citologia%20Bacteriana.pdf](http://www.unirio.br/dmp/Graduacao/.../Citologia%20Bacteriana.pdf). Acesso em: 22 de fevereiro de 2010.
- VIDAL, M. N. P. **Toxicidade em Biomateriais um Alerta aos Serviços de Saúde**. Rio de Janeiro, 2005. 90 p. II. Dissertação (Mestrado) – Centro Universitário Plínio Leite, Rio de Janeiro.