

CONTROLE DE PROCESSO NA PRODUÇÃO DE BIOMATERIAIS

Francisco J.C.Braga, Sizue O.Rogero, Vera Lúcia R. Salvador
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – 05508-900
Cidade Universitária, São Paulo, Brasil

Resumo. *O processamento em escala de produção de biomateriais, principalmente aqueles cuja aplicação possui características invasivas no corpo humano, exige controles rigorosos no sentido de reduzir a liberação ao mercado de produtos em condições de não-conformidade [Kweh, 1999]. A tomada de decisão quanto a aprovação ou não de lotes produzidos está baseada nas Regulamentações Técnicas da Legislação do Ministério da Saúde (MS) e protocolos normativos como a ISO [10993, 1992] e ASTM [F1185-88, F1088-87]. Os ensaios in vitro para verificar a toxicidade são ferramentas importantes para o acompanhamento do processo de produção. Se durante o processamento o biomaterial apresentar toxicidade há a possibilidade de adequação do fluxo no sentido de eliminar a toxicidade ou mesmo descartar o processamento como não conformidade. O presente trabalho tem como objetivo apresentar o modelo adotado pela empresa CONSULMAT com o propósito de subsidiar e agilizar as decisões de produção.*

Palavras-chave: *Biomateriais, Ensaio in vitro, Controle de processo.*

1. INTRODUÇÃO

Três tipos de controle de qualidade devem ser efetivos em processamento de produtos classificados como correlatos invasivos: 1^o) decorrente das matérias-primas e insumos; 2^o) decorrentes do processamento físico-químico em si; e 3^o) decorrente das condições da área de trabalho, manuseio e embalagem. Este trabalho focará somente os dois primeiros tipos de controle.

A produção de biomateriais, especificamente nas condições de produtos voltados para a aplicação cirúrgica de reparação óssea no mercado odontológico, denota características de baixa escala em função de três quesitos imperativos: (a) pequena demanda do mercado, (b) esterilidade com validade em curto prazo e (c) risco elevado de contaminação por micro-organismos no produto acabado quando mantido não estéril por certo tempo para embalagem final futura. Dependendo do modelo de processamento utilizado, quantidades de produto em processo podem ser estocadas, mas ainda assim deverá ter seu controle verificado quanto a integridade estrutural de seu princípio ativo e ausência de toxicidade decorrente de formação de micro-organismos antes da continuidade do processamento para a sua finalização.

O modelo de produção da CONSULMAT assume características de campanha, ou seja, cada etapa é executada isoladamente e seqüencialmente dentro da lógica do processo de cada produto, sendo somente intercalada uma da outra pela operação de limpeza e preparo da área de trabalho. Uma vez obtido o lote, este é esterilizado em quantidades fracionadas que definem o número previsto de unidades que serão embaladas para a venda em cada período.

As análises fundamentais para que se ateste a qualidade final no produto processado são: (a) química, principalmente para verificação do teor de metais pesados; (b) citotoxicidade, atendendo requisitos biológicos de biocompatibilidade “in vitro”; e (c) pH, sendo medido na linha de processamento devido à possibilidade de correção imediata.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Primeiramente a matéria prima (MP) é analisada por espectrometria de fluorescência de raios-X por dispersão de comprimento de onda (WDXRF). Na Fig.1 é apresentado o fluxograma básico do controle de processo. Após o processamento é verificada no produto acabado a ausência de toxicidade e é realizado FR-X sendo os resultados comparados com os valores apresentados nas normas.

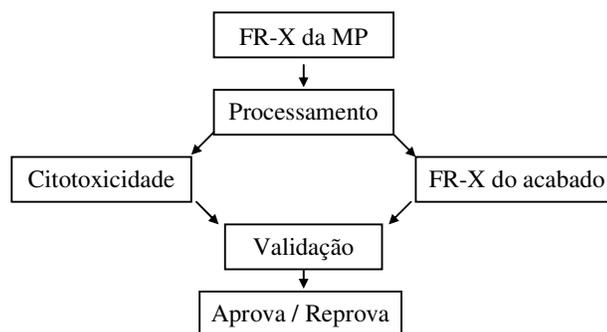


Figura 1. Fluxograma de controle do processamento em jornada de produção do biomaterial.

A técnica de análise por WDXRF está baseada nas medidas das intensidades dos raios X característicos emitidos pelos elementos que constituem a amostra. Para a calibração é utilizado o método de Parâmetros Fundamentais [Kataoka, 1989], que consiste em calcular-se as intensidades teóricas dos elementos químicos de uma amostra de composição conhecida (teores próximos da amostra a ser analisada) e relacionar com a intensidade medida, obtendo-se assim uma curva de sensibilidade do equipamento e assim, as amostras do lote produzido são analisadas na forma de pó compactado (pastilha prensada). O equipamento utilizado foi o espectrômetro de fluorescência de raios por dispersão de comprimento de onda da Rigaku, modelo RIX-3000.

A verificação da ausência de toxicidade durante o processo de preparação do biomaterial é realizada pelo ensaio de citotoxicidade. O método utilizado foi o de incorporação do vermelho neutro, em células da linhagem NCTC 929 do banco de tecidos da ATCC. Foram preparados extratos dos materiais e colocados em contato com a cultura celular e a determinação da citotoxicidade obtida pelo índice de citotoxicidade $IC_{50\%}$ [Rogerio, 2003].

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta as análises por FR-X dos lotes do produto *Estrutura Mineral Óssea Bovina* (EMOB) para quatro lotes produzidos pela CONSULMAT comparativamente aos valores especificados pelas normas ASTM F1185-88 e F1088-87.

A análise por espectrometria de fluorescência de raios-X foi focada na determinação percentual em peso dos elementos, principalmente metais pesados cujos limites máximos são estabelecidos em norma. Observa-se que nenhum dos lotes apresentou teor de metais pesados, exceto para o arsênio, em suas análises. Pelo teor limite máximo do arsênio exigido em norma, tanto para a ASTM F1185 como para a ASTM F1088, o lote 1 deveria ser reprovado, mesmo considerando que na somatória limite de metais pesados pela norma ASTM F1088 (50 ppm) ele fica abaixo.

Tabela 1. Valores dos lotes de EMOB por FR-X e valores limites de norma.

ÓXIDOS	LOTE 1	LOTE 2	LOTE 3	LOTE 4	ASTM F1185	ASTM F1088
CaO	59,4 %	58,9 %	59,9 %	57,3 %	---	---
P ₂ O ₅	39,1 %	39,7 %	38,7 %	40,5 %	---	---
MgO	0,57 %	0,54 %	0,52 %	0,74 %	---	---
Na ₂ O	0,34 %	0,34 %	0,37 %	0,55 %	---	---
SiO ₂	804 µg/g	991 µg/g	526 µg/g	0,20 %	---	---
Al ₂ O ₃	434 µg/g	621 µg/g	170 µg/g	332 µg/g	---	---
SrO	348 µg/g	280 µg/g	286 µg/g	783 µg/g	---	---
TiO ₂	153 µg/g	132 µg/g	74 µg/g	---	---	---
K ₂ O	122 µg/g	90 µg/g	90 µg/g	---	---	---
ZnO	104 µg/g	106 µg/g	110 µg/g	262 µg/g	---	---
Fe ₂ O ₃	62 µg/g	84 µg/g	119 µg/g	271 µg/g	---	---
BaO	50 µg/g	188 µg/g	371 µg/g	---	---	---
NiO	47 µg/g	26 µg/g	38 µg/g	135 µg/g	---	---
Cr ₂ O ₃	36 µg/g	45 µg/g	71 µg/g	---	---	---
As ₂ O ₃	31 µg/g	<10 µg/g	<10 µg/g	---	3,9 ppm máx	3,9 ppm máx
MnO	<10 µg/g	<10 µg/g	<10 µg/g	---	---	---
CdO	---	---	---	---	5,7 ppm máx	5,7 ppm máx
HgO	---	---	---	---	5,4 ppm máx	5,4 ppm máx
PbO	---	---	---	---	32,3 ppm máx	32,3 ppm máx

Porém o critério adotado para a aprovação ou não do lote de produção depende da avaliação conjunta desta análise e do resultado do ensaio de citotoxicidade. Na figura 2 estão apresentadas as curvas de viabilidade celular obtidas no ensaio de citotoxicidade do biomaterial *Estrutura Mineral Óssea Bovina* (EMOB) obtidos em 4 processos de produção. Pode-se observar que os materiais obtidos nos processos 1, 2 e 3 apresentaram-se não tóxicos, como o controle negativo. Somente o material obtido no processo 4 apresentou-se tóxico, comportamento semelhante ao controle positivo (IC_{50%}= 52). O EMOB do processo 4 mostrou-se tão tóxico que mesmo na diluição do extrato de cerca de 6% ainda lesava 100% da população celular no ensaio. Portanto o EMOB do processo 4 foi considerado não aprovado apesar dos resultados da FR-X estarem dentro dos limites estabelecidos nas normas.

Analisando comparativamente as composições químicas e os resultados da citotoxicidade, observa-se que no lote 4 os teores de silício, zinco, ferro, estrôncio e níquel foram cerca de duas vezes maior que nos demais lotes. Porém, destes elementos o estrôncio e o níquel possivelmente devem ser os responsáveis pelo resultado desfavorável na citotoxicidade.

Trabalhos recentes [Braga, 1999 e 2004] apresentam certa incoerência entre a citotoxicidade e o resultado de biocompatibilidade “in vivo” para a estrutura mineral bovina e hidroxiapatita, o que sugere que estudos complementares ainda devem ser realizados neste sentido.

A garantia de esterilidade é fornecida pelo prestador de serviço de radiação do material na dose de 25 kGy sob raios Gama em fonte de Co 60, através de laudo.

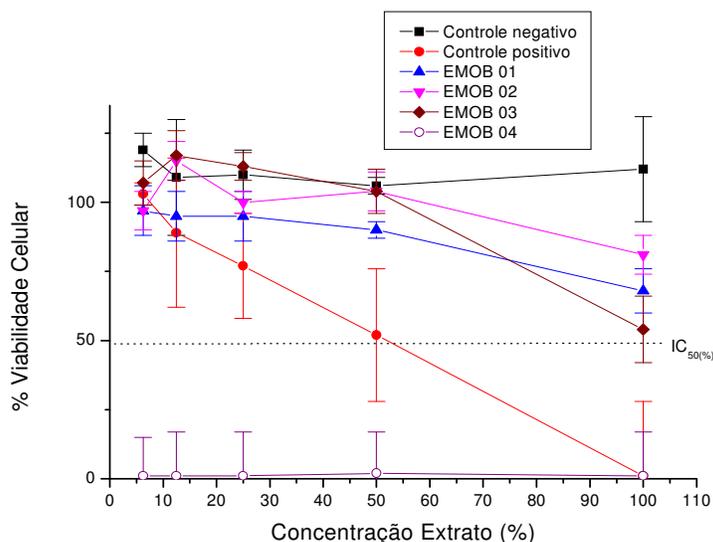


Figura 2. Ensaio de citotoxicidade: curvas de viabilidade celular pelo método de incorporação do vermelho neutro.

CONCLUSÕES

Com o ensaio de citotoxicidade realizado na fase final do processo, pode-se evitar a aprovação do lote de produção, mesmo que sob aspecto de composição química esteja de acordo com a norma, se o produto apresentar toxicidade. Esta decisão ainda se apresenta com certo grau de risco devido ao fato de se considerar insipiente em tipo e limite máximo de teores de contaminantes especificados em norma, e se ter pouca informação na literatura sobre a fidedignidade na correlação entre a composição química e o resultado citotóxico do material.

REFERÊNCIAS

- ASTM F1185-88, “Standard Specification for Composition of Hydroxylapatite Ceramic for Surgical Implants”, 514-515.
- ASTM F1088-87, “Standard Specification for Beta-Tricalcium Phosphate for Surgical Implantation”, 415-416.
- Braga, F.J.C.; Murad Da Silva, G.; König Jr., B.; (1999), “Obtenção de matriz mineral e a comprovação de sua biocompatibilidade”. *BCI - Rev Bras Cirurg Prótese e Implant*, 60(3): 43-49.
- Braga, F.J.C.; Rogero, S.O.; Yoshimoto, M.; Allegrini Jr., S.; König Jr., B.; (2004), “Estudo comparativo entre hidroxiapatitas de origem animal e sintética enxertadas em seios paranasais”. COLAOB 2004.
- ISO 10993, (1992), “Biological Evaluation of Medical Devices” – Part 5 – Test for cytotoxicity: *in vitro* methods.
- Kataoka, Y.; (1989), “Standarless X-ray fluorescence spectrometry – fundamental parameter method using sensitivity library”, *The Rigaku Journal*, 6: 33-39.
- Kweh, S.W.K.; Khor, K.A.; Cheang, P., (1999), “The production and characterization of hydroxyapatite (HA) powders”, *J Mater Proc Tech* 89-90: 373-377.
- Rogero, S. O.; Malmonge, S.M.; Lugao, A. B.; Ikeda, T. I.; Miyamaru, L.; Cruz, A. S., (2003), “Biocompatibility study of polymeric biomaterials”, *Artificial Organs*, 27(5): 424-427.

PROCESSING CONTROL OF BIOMATERIALS PRODUCTION

Francisco J.C.Braga, Sizue O.Rogero, Vera Lúcia R. Salvador
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – 05508-900
Cidade Universitária, São Paulo, Brasil

Abstract. *The processing of scale production of biomaterials mainly in that which application has characteristic of invasion into human body needs rigorous control to reduce the liberation to the market of no conformity conditions products. The decision about the approbation or not of some produced lots is based in the Technical Regulation of Health Ministry law and normative protocols as ISO and ASTM. The in vitro assay for toxicity is the most important tool to accompany production processing. If during processing the biomaterial presents toxicity there is possibility to adequate the process flux in order to eliminate that toxicity or even discharges this process as no conformity. The present work has the objective to present an adopted model from CONSULMAT with the intention to subsidize and turn faster the decisions of production.*

Keywords: *Biomaterials, In vitro assay, Processing control.*