



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ESTERILIZAÇÃO DE HIDROGELES PARA APLICAÇÕES
BIOMÉDICAS**

Trabalho submetido por
Luísa Maria Claro Parreira
para a obtenção do grau Mestre em Ciências Farmacêuticas

novembro de 2016



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ESTERILIZAÇÃO DE HIDROGELES PARA APLICAÇÕES
BIOMÉDICAS**

Trabalho submetido por
Luísa Maria Claro Parreira
para a obtenção do grau Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Prof. Doutora Ana Paula Serro

novembro de 2016

Aos meus pais,
Ao meu irmão.

Agradecimentos

Ao longo destes cinco anos de trabalho, muitas foram as ajudas, os apoios ou simplesmente os sorrisos que me permitiram completar esta grande jornada da minha vida.

Agradeço a toda a minha família especialmente aos meus pais e ao meu irmão por todo o apoio durante este percurso, sem elesteria sido impossível conclui-lo.

Obrigada Pai e Obrigada Mãe por todo o amor, carinho, afeto, força e conselhos que me deram e também por sempre acreditarem em mim. Obrigada, também, ao meu irmão com quem cresci e que esteve sempre ao meu lado nos bons e maus momentos.

À minha orientadora, a Prof^a. Doutora Ana Paula Serro que desde início acompanhou toda esta monografia, pelo seu apoio incansável, pela constante disponibilidade, pelas suas críticas construtivas e sugestões e por todo o conhecimento ao longo deste percurso que contribuiu em muito para a elaboração desta dissertação.

Aos meus grandes amigos António Delgado e Mariana Cevada um enorme e especial obrigada, pela grande paciência, pelo apoio único, motivação, e sobretudo por nunca terem desistido de mim quando mais precisava.

Ao Dr. Francisco pela sua constante disponibilidade e colaboração.

Obrigada a todos os professores que passaram pela minha vida de estudante e que contribuíram para a minha formação.

Obrigada Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz.

A todos, um sincero, Muito Obrigada!

Resumo

Os hidrogéis são biomateriais poliméricos, naturais ou sintéticos que mimetizam tecidos corporais e desempenham um papel preponderante na indústria moderna, constituindo a base para múltiplas aplicações biomédicas, entre elas, lentes de contacto, pensos para o tratamento de feridas, implantes mamários ou ainda em engenharia de tecidos. O seu uso na medicina continua a crescer, com diversas novas variações destes polímeros a serem produzidas atualmente.

Todos os biomateriais são sujeitos a processos de esterilização protocolados e legislados para que o seu uso comercial seja seguro e padronizado. Os hidrogéis não são exceção. Uma vez que a tendência e a procura são cada vez maiores, é fulcral a adaptação dos processos de esterilização à disponibilidade de uso.

A esterilização dos hidrogéis permanece um desafio uma vez que não existe um método que possa ser empregue à maioria destes biomateriais. Alguns hidrogéis beneficiam de processos físicos de esterilização enquanto que outros beneficiam de processos químicos.

São necessárias investigações futuras que permitirão a adequação de um processo de esterilização transversal à maioria destes polímeros.

Palavras chave: biomateriais; hidrogéis; esterilização; polímeros

Abstract

Hydrogels are polymeric biomaterials that can be natural or synthetic, which mimic human body tissues and play a crucial role in the modern industry, serving as the basis for multiple biomedical applications, for example, contact lenses, wound dressings, breast implants and in tissue engineering. Hydrogel use in medicine continues to grow, with new polymer variations currently being manufactured.

Biomaterials must be submitted to standardized and protocolized sterilization procedures in order to be commercially available for safe use. Hydrogels are no exception to this. Their demand and tendency is still rising, which means the adaptation of the sterilization procedures towards its use is crucial.

Sterilization procedures for hydrogels remains a challenge. A sterilization procedure that can be employed for the majority of hydrogels is lacking. Some hydrogels advocate the use of physical sterilization procedures whereas others benefit from chemical sterilization procedures.

Further researches are needed to provide a procedure that can sterilize transversally the majority of these polymers.

Keywords: biomaterials; hydrogels; sterilization; polymers

Índice Geral

Resumo	1
Abstract.....	3
Índice de Figuras	7
Índice de Tabelas	8
Lista de Abreviaturas.....	9
1. Introdução.....	11
2. Biomateriais – Uma visão genérica.....	13
2.1. Hidrogeles.....	14
2.1.1. Hidrogeles – Aplicações biomédicas dos hidrogeles	16
2.1.1.1. Lentes de contacto	17
2.1.1.2. Pensos dérmicos para o tratamento de feridas.....	21
2.1.1.3. Dispositivos para cirurgia plástica e reconstrutiva	27
2.1.1.4. Aplicações em engenharia de tecidos	30
3. Esterilização.....	37
3.1. Noções gerais de esterilização	38
3.1.1. Conceito de esterilização	39
3.1.2. Parâmetros de esterilização	40
3.2. Tipos de esterilização	42
3.2.1. Calor húmido	43
3.2.2. Calor seco	45
3.2.3. Radiação	45
3.2.4. Vibração.....	47
3.2.5. Filtração	48
3.2.6. Gases.....	49
3.2.7. Líquidos	50
3.3. Esterilização de hidrogeles	51
3.4. Regulamentação sobre esterilização de hidrogeles para aplicações biomédicas..	54
3.4.1. Principais entidades reguladoras	55

3.4.1.1. FDA	55
3.4.1.2. EMA	55
3.4.1.3. INFARMED	56
3.4.2. Principais diretrizes/normas reguladoras	56
4. Conclusão	61
Referências Bibliográficas	63

Índice de Figuras

Figura 1 - Esquema dos métodos de preparação de hidrogéis de origem química e física.	14
Figura 2 - Dk versus EWC	19
Figura 3 - Tipos de lentes de contacto utilizados em 2015 nos E.U.A.....	20
Figura 4 - Penso de hidrogel Hydrosorb®.....	23
Figura 5 - Cortes histológicos de uma seção do estômago - A: sem injeção de ácido hialurónico; B: 24 horas após injeção de ácido hialurónico.....	28
Figura 6 - Definição dos valores de D e Z.....	41
Figura 7 - Métodos de esterilização mais comuns.....	43
Figura 8 - Esterilização de seringa por radiação gama.....	47

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Protocolos de esterilização mais comuns utilizados na autoclave	44
Tabela 2 - Normas ISO que fazem referência aos vários tipos de esterilização.....	58

Lista de Abreviaturas

ADN - Ácido desoxirribonucleico

AIM- Autorização de Introdução no Mercado

ARN- Ácido ribonucleico

cGMP - current Good Manufacturing Practices

CMC - Carboximetilcelulose

EMA - European Medicines Agency

EUA- Estados Unidos da América

EWC – Conteúdo de água em equilíbrio

FDA - Food and Drug Administration

INFARMED - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P.

NVP - N-vinil pirolidona

PDMS -Polidimetilsiloxano

PEG - Polietileno glicol

HEMA - Polihidroxietilmetacrilato

PHMG - Polihexametileno guanidina

PVC - Poli(cloreto de vinilo)

PLA - Ácido polilático

PMMA-Poli(metilmetacrilato)

PSI - *Pound force per square inch*

PVA- Álcool polivinílico

SAL-*Security Assurance Level*

sCO₂ -Gás denso supercrítico de dióxido de carbono

SiHy - Silicone hidrogel

TDT- *Thermal Death Time*

T- Temperatura

t- Tempo

UE- União Europeia

1. Introdução

O mundo dos biomateriais tem sofrido constantes avanços e atualizações, traduzindo-se hoje em dia numa disponibilidade imensa de opções para as mais variadas áreas tecnológicas. Os polímeros também acompanharam esta evolução, sobretudo os hidrogéis, que foram os primeiros biomateriais destinados ao uso no corpo humano (Kopeček, 2007). As suas propriedades, porosidade, conteúdo de água e capacidade da sua respetiva retenção tornam os hidrogéis em soluções biomiméticas e atrativas no que toca à Medicina e aos seus diferentes ramos (Caló & Khutoryanskiy, 2014). As suas aplicações vão desde a engenharia de tecidos e medicina regenerativa, pensos para tratamento de feridas ou mesmo ao setor agrícola (Ahmed, 2015; Dumitriu, 1994). Dada a sua relevância em diferentes setores, a necessidade destes biomateriais continuará uma tendência nos próximos anos (Karajnagi, 2011).

Para os tornar disponíveis e seguros para uso é necessário compreender as etapas de esterilização associadas aos hidrogéis. A esterilização destes materiais é uma etapa crítica e desafiante visto que são poucas as técnicas que não alteram e inviabilizam a estrutura dos polímeros (Ma, 2005; Waugh & Lawrence, 2014). Os métodos de esterilização mais comuns aplicáveis a estes biomateriais são a esterilização química por óxido de etileno e a esterilização por radiação ionizante. A esterilização eficiente destes materiais assegura a sua isenção microbiana e permite que o seu uso seja comercializado e usado em segurança nas suas diferentes áreas de aplicação (Waugh & Lawrence, 2014).

Esta presente dissertação abordará os vários campos de aplicação biomédica dos hidrogéis e os métodos de esterilização que podem ser empregues ao destino de cada um destes materiais nas suas diferentes áreas.

2. Biomateriais –Uma visão genérica

Desde a Antiguidade que o Homem utiliza materiais poliméricos para os mais diversos fins. Começou por utilizar materiais de origem natural como por exemplo o âmbar, o amido, a celulose, a seda e ainda a borracha natural. Foi no decorrer do século XVII que, com a evolução da tecnologia e síntese em Química Orgânica, foi possível proceder à modificação dos polímeros naturais já em uso e se passaram a produzir novos polímeros de origem sintética. Charles Goodyear, no ano de 1839, ao aquecer a borracha natural juntamente com enxofre descobriu que a mistura resultante tinha uma durabilidade bastante superior à da borracha até então usada. Após esta descoberta e até ao início do século seguinte, os novos polímeros que iam sendo sintetizados surgiam através de modificações feitas em materiais de origem natural já utilizados.

O primeiro polímero de origem totalmente sintética – a baquelite - surgiu no ano de 1907 pela mão de Leo Baekland quando este juntou numa reação o fenol e o formaldeído.

No decorrer do século XX, a industrialização e a comercialização de todo o tipo de polímeros ganharam relevância. Nos dias de hoje, materiais como o poli(cloreto de vinilo), conhecido vulgarmente como PVC, o nylon ou ainda o álcool polivinílico (PVA) são utilizados em diferentes áreas como na indústria automóvel, na indústria têxtil, na construção civil, entre outras. Uma outra aplicação que tem vindo a ganhar uma grande importância nos dias que correm é a utilização dos polímeros como biomateriais.

Ao longo dos anos, têm sido propostas diferentes definições para o termo ‘biomaterial’. De uma forma simplificada, um biomaterial pode ser definido como qualquer substância natural ou sintética, que se destina a interagir com um sistema biológico sem que este o afete adversamente (Ma et al., 2007).

Quanto aos materiais que podem ser usados como biomateriais distinguem-se quatro grandes grupos: os polímeros, os cerâmicos, os metais e os compósitos. Foi no uso dos polímeros como biomateriais que se notou a maior evolução tecnológica. São inúmeras as aplicações dos polímeros na área biomédica. Elas vão desde aplicações temporárias como fio de sutura ou balões aórticos, a aplicações de carácter mais permanente como enxertos vasculares, em cirurgia plástica e reconstrutiva, válvulas cardíacas, ou articulações. Dentro do grupo dos biomateriais poliméricos destacam-se os hidrogéis, pela

sua importância e variedade de aplicações, os quais serão abordados de seguida nesta revisão literária.

2.1.Hidrogéis

Os hidrogéis, por definição, são redes tridimensionais poliméricas e hidrofílicas resultantes de ligações químicas ou físicas de monómeros ou polímeros, capazes de absorverem e reterem quantidades significativas de água na sua estrutura (Caló et al. 2016). Os hidrogéis possuem um grau de flexibilidade semelhante aos dos tecidos corporais uma vez que têm um grande conteúdo de água. Diversos materiais, naturais ou sintéticos enquadram-se nesta definição (Ahmed, 2015).

Os hidrogéis, de acordo com o tipo de reticulações presentes na sua estrutura tridimensional, podem ser classificados em químicos ou físicos. Os hidrogéis químicos, ou permanentes, formam-se através de ligações covalentes entre os monómeros por diversos métodos como a fotopolimerização, reações orgânicas entre grupos funcionais, reações enzimáticas ou polimerização por iniciação redox. Por outro lado, os hidrogéis físicos, ou reversíveis, formam-se pela criação de associações intermoleculares físicas como ligações iónicas ou ligações por pontes de hidrogénio (Choi et al. 2015).

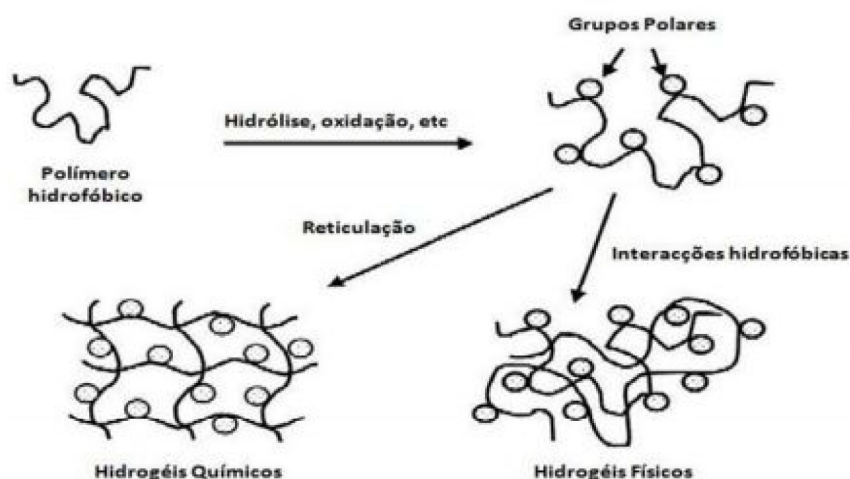


Figura 1 - Esquema dos métodos de preparação de hidrogéis de origem química e física. (Hoffman, 2002)

Existem várias outras classificações propostas (Ahmed, 2015) para os hidrogéis, com base nas suas diferentes propriedades:

- Quanto à composição polimérica podem ser homopoliméricos quando derivados de uma espécie única de monómero, copoliméricos quando compostos por duas ou mais espécies de monómeros com pelo menos uma componente hidrofílica, ou ainda multipoliméricos quando são constituídos por dois ou mais polímeros sintéticos ou naturais independentes ligados entre si;
- Quanto à sua estrutura os hidrogéis podem ser amorfos, semicristalinos ou cristalinos;
- Quanto à sua configuração eletrónica (carga) podem ser neutros, iónicos (catiónicos ou aniónico), ou zwitterónicos (eletricamente neutros, mas com cargas opostas e, diferentes átomos);
- Quanto à sua aparência/forma física, podem apresentar-se como uma matriz, um filme ou microsferas, entre outras, dependendo da técnica de polimerização e preparação;
- Quanto ao tipo de ligação, que poderá ser física ou química, como foi anteriormente mencionado.

Torna-se importante diferenciar um hidrogel de um gel, uma vez que podem haver equívocos quando se põem os dois em perspetiva. Os geles são materiais poliméricos semi-sólidos constituídos por polímeros hidrofílicos. Os hidrogéis são também constituídos por cadeias de polímeros em geral hidrofílicos, mas o que os distingue dos anteriores são as suas ligações cruzadas inerentes. Embora os geles também possam exibir ligações cruzadas sob determinadas forças estas são muito fracas e reversíveis, podendo ser disrompidas sob determinadas forças (Sherbiny & Yacoub, 2013).

Existem vários materiais que podem ser usados como base para a o fabrico de hidrogéis. Estes podem ser preparados a partir de polímeros de origem sintética, como o álcool polivinílico, o polihidroxietilmetacrilato (PHEMA), a N-vinil pirolidona (NVP) ou o poli (metacrilato de hidroxietilo) (PMMA), ou, em contraste, podem ser preparados tendo como base polímeros naturais como é o caso dos polissacáridos ou das proteínas como os

glicosaminoglicanos – hidrogéis com base em ácido hialurónico, quitina ou quitosano, colagénio e sulfato de condroitina (Dimitriu, 1994; Ahmed, 2015).

Foi através de Wichterle e Lim em 1954 que surgiram os primeiros avanços na síntese laboratorial dos primeiros hidrogéis não-naturais. Desde então, com o passar dos anos, a tecnologia associada a estes materiais tornou-os aplicáveis a um campo vasto de setores tais como a agricultura (e.g. substitutos de solo), alimentação (e.g. aditivos de comida), e o turismo e lazer/desporto (e.g. neve artificial). Na indústria farmacêutica as suas aplicações vão desde sistemas de libertação de fármacos, separação de biomoléculas ou células, adesão biológica, a biosensores. Também no campo da medicina como a medicina regenerativa, a cirurgia plástica e reconstrutiva ou engenharia dos tecidos este tipo de materiais tem desempenhado um papel cada vez mais importante (Ahmed, 2015).

Dentro da área médica, estes polímeros têm sido extensamente investigados e usados em inúmeras aplicações biomédicas devido às suas excelentes propriedades, biocompatibilidade e inúmeros alvos de aplicabilidade.

2.1.1. Hidrogéis – Aplicações biomédicas dos hidrogéis

Os hidrogéis, por terem propriedades análogas aos tecidos corporais tornaram-se ao longo dos tempos em materiais com elevado interesse a nível médico. Hoje em dia, estes materiais contam já com diversas patentes nas mais variadas formas, e estão também bem documentados e investigados na literatura (Caló & Khutoryanskiy, 2014). Hoje em dia, as áreas de maior foco da aplicação dos hidrogéis a nível biomédico são: as lentes de contacto, os pensos para feridas, aplicações em engenharia de tecidos como por exemplo os *scaffolds*, dispositivos para substituição e correção de defeitos nas cartilagens e também em materiais aplicados em cirurgia plástica e reconstrutiva como é o caso dos implantes mamários e materiais de preenchimento cosmético. Esta dissertação abordará, de seguida, cada um destes temas em detalhe.

2.1.1.1.Lentes de contacto

Uma lente de contacto é definida como um dispositivo oftalmológico que é colocado sobre a superfície da córnea, em íntimo contacto com esta, com o fim de corrigir defeitos visuais. Também pode ser usada com fins cosméticos ou terapêuticos (Jacob, 2016).

As lentes de contacto classificam-se em lentes rígidas ou flexíveis de acordo com a sua elasticidade. As lentes de contacto rígidas são feitas geralmente em poli(metilmetacrilato) ou poli-hexa-fluoroisopropil metacrilato enquanto que as lentes de contacto fabricadas a partir de hidrogéis (lentes macias) são lentes de contacto flexíveis, devido ao facto de estas serem feitas de um material polimérico, reticulado e hidrofílico que retém água no seu interior (Caló & Khutoryanskiy, 2014). A água ao ocupar a rede polimérica torna-as menos rígidas confere-lhes propriedades elásticas. De notar que estas lentes podem ser altamente permeáveis ao oxigénio, caso contenham na sua composição compostos à base de silicone. Tal característica permite a sua utilização prolongada, uma vez que não há risco de hipóxia da córnea. As lentes macias são atualmente as mais utilizadas por proporcionarem um elevado conforto e uma fácil adaptação. Apesar de todas as vantagens enumeradas, estas lentes são relativamente frágeis e podem ser facilmente rasgáveis no seu manuseamento (Caló & Khutoryanskiy, 2014; Maldonado-Codina & Efron, 2003).

A aplicação dos hidrogéis no fabrico das lentes de contacto surgiu, quando o trabalho pioneiro de Wichterle e Lim, na década de 1960, resultou na descrição do poli-2-hidroxietilmetacrilato (PHEMA) como um hidrogel sintético e útil para aplicações oftalmológicas (Caló & Khutoryanskiy, 2014). Com os avanços tecnológicos surgiram materiais diferentes e houve uma crescente evolução no mercado das lentes de contacto à base em hidrogéis. A partir deste avanço, foi-se descobrindo também as falhas funcionais e adaptativas das lentes de contacto em relação à córnea e à fisiologia do olho humano, e a procura dos novos materiais foi, a pouco e pouco, de encontro a estas necessidades (Nicolson & Vogt, 2001). Apesar da ampla gama de hidrogéis adequados para uso em lentes de contacto, o tradicional PHEMA e os derivados de HEMA continuam a ser um dos materiais mais usados no fabrico de lentes, a par de compostos de silicone que garantem o aumento da permeabilidade da lente ao oxigénio, fator primário que influencia o metabolismo corneal e sucesso das lentes.

As propriedades físicas que uma lente de contacto de hidrogel deve observar estão descritas transversalmente na literatura e são, essencialmente: a transparência óptica, um índice refrativo similar ao da córnea (cerca de 1,37), ser suficientemente permeável ao oxigénio, ter permeabilidade hidráulica e boa molhabilidade, ter estabilidade dimensional, boas propriedades mecânicas (nomeadamente um módulo de elasticidade adequado) e ser biocompatível relativamente ao ambiente ocular de modo a que a saúde do olho não seja comprometida durante o período uso do dispositivo (Caló & Khutoryanskiy, 2014) (Maldonado-Codina & Efron 2003). O sucesso da lente de contacto no olho humano prende-se essencialmente com o conteúdo de água da rede polimérica e a difusão de oxigénio na mesma.

O coeficiente de permeabilidade de oxigénio é uma propriedade característica do material, Dk , onde D representa o coeficiente de difusão do gás no material (quantidade de oxigénio que passa por unidade de área do material), e k é o coeficiente de solubilidade e representa a quantidade de oxigénio que é possível dissolver por unidade de volume de material. Para cada tipo de lente de contacto é importante conhecer a sua transmissibilidade, a qual é dada por tDk/l , onde l representa a espessura da lente em centímetros (Maldonado-Codina & Efron, 2003) (Dumitriu, 1994). A transmissibilidade depende do material do qual a lente é feita, mas depende também da espessura da lente de contacto. Logo, duas lentes feitas do mesmo material (permeabilidade idêntica), mas com espessuras diferentes (gradações distintas), terão diferentes transmissibilidades.

Nas lentes de hidrogel convencionais a permeabilidade ao oxigénio aumenta exponencialmente com o conteúdo em água (figura 2) uma vez que o oxigénio se difunde através da água. Logo, quanto maior a quantidade de oxigénio, mais eficiente será a passagem do oxigénio. Nas lentes de silicone hidrogel, o mecanismo preponderante para a passagem de oxigénio é a ligação deste aos grupos siloxil. O teor em água afeta negativamente a permeabilidade ao oxigénio até valores de 70% de conteúdo de água em equilíbrio (EWC) quando a percentagem de água é superior a este valor, observa-se um comportamento análogo ao das lentes de hidrogel, i.e. a permeabilidade ao oxigénio aumenta exponencialmente com o teor de água.

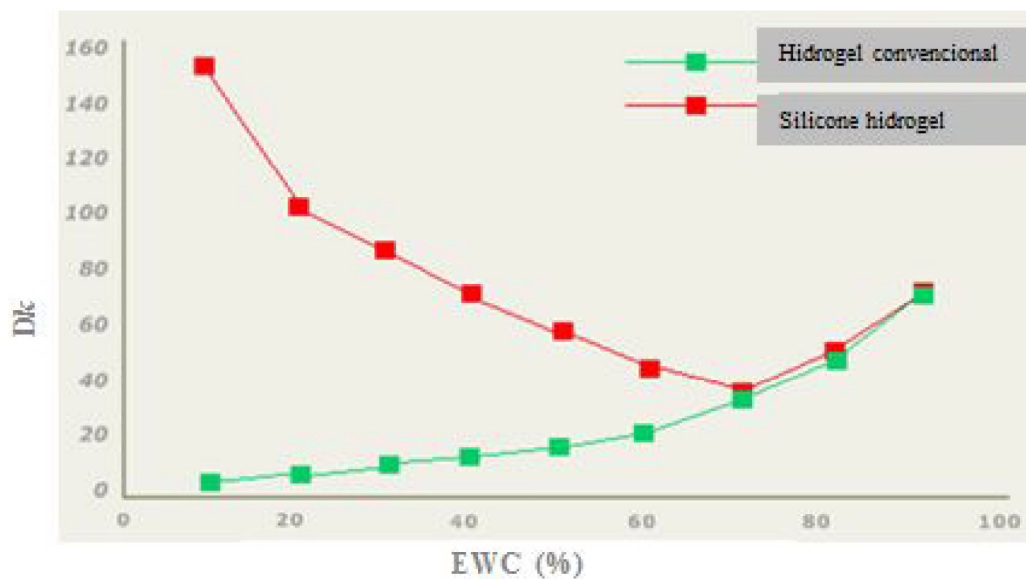


Figura 2 - Dk versus EWC (adaptado : (Dumbleton, 2002))

A copolimerização do hidrogel com monómeros mais hidrofílicos, nas lentes convencionais, ou o fabrico de lentes ultra-finas, podem favorecer a difusibilidade do oxigénio (Dumitriu, 1994). Investigações sucessivas levaram ao desenvolvimento de ambos os métodos. A copolimerização resultou no fabrico de lentes com copolímeros de HEMA, adicionando por exemplo N-vinil pirolidona, que assegura um maior conteúdo de água na lente, e também se foram desenvolvendo lentes cada vez mais finas com o passar dos anos (Maldonado-Codina & Efron 2003).

Hoje em dia, as lentes em silicone hidrogel (SiHy) dominam o mercado, pela sua elevada permeabilidade ao oxigénio e ajuste confortável. Estas lentes foram introduzidas no mercado em 1999 e em menos de quinze anos tornaram-se no tipo de lentes flexíveis mais usado no mundo representando cerca de 70% do mercado de lentes de contacto (figura 3)(González-Méijome et al., 2014).

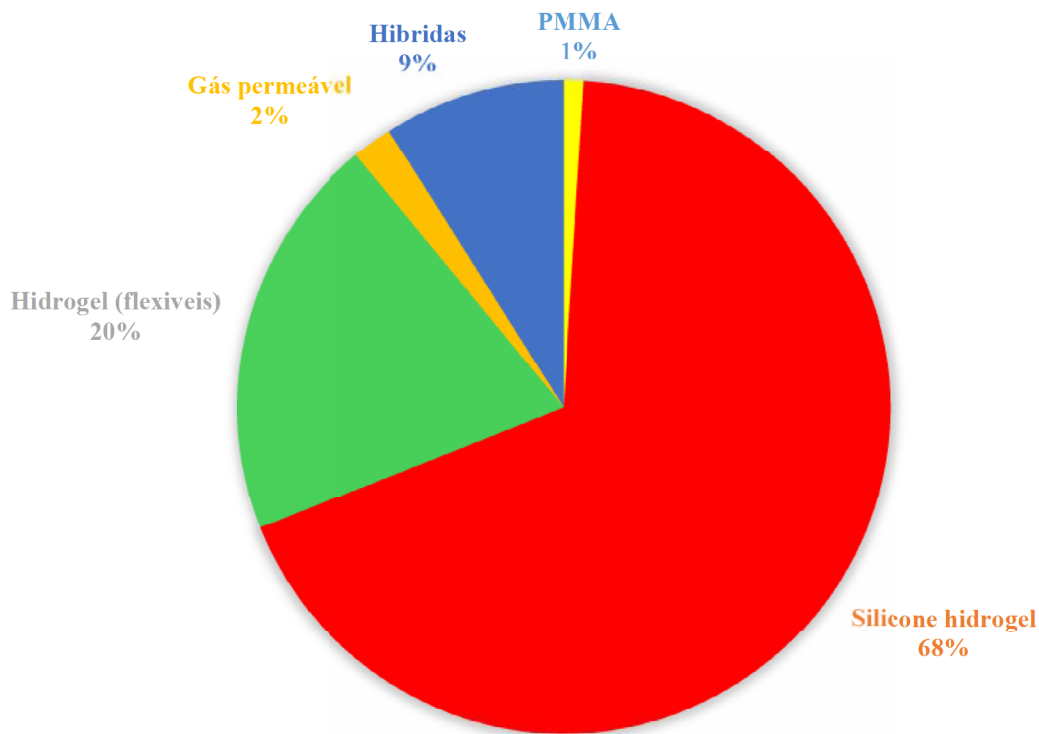


Figura 3 - Tipos de lentes de contacto utilizados em 2015 nos E.U.A (adaptado: (Segre, *Contact Lens Basics*, 2016))

Este tipo de lentes foi desenhada para ter características e propriedades melhoradas quando comparadas às já existentes, nomeadamente em parâmetros como a molhabilidade, na criação de superfícies com nanotexturas que se assemelham às próprias características intrínsecas à córnea humana e claro ao aumento da difusibilidade do oxigénio (Caló & Khutoryanskiy, 2014).

Segundo a literatura, estas lentes vieram colmatar as falhas das anteriores, provando-se aptas à adaptação fisiológica à córnea humana e mesmo ao longo uso ou uso noturno, devido ao seu bom desempenho no que diz respeito à passagem do oxigénio (French & Jones, 2008). Apesar dos claros benefícios a evidência científica sugere que este tipo de lentes não têm um conforto substancialmente melhor quando comparada com as lentes de contacto de hidrogel tradicional. Fatores como o conforto do uso de lentes dependem de

uma interação geral de vários aspetos, não só ligados às características mecânicas da lente mas também relativos ao seu modo de uso, frequência de troca das mesmas, cuidados e resposta do tecido ocular. O conforto é portanto específico de cada lente e não da classe de lentes específico (Guillon, 2013).

Não obstante existem estudos que justificam o uso contemporâneo destas lentes de contacto de silicone, dado que as taxas de abandono são bastante baixas quando comparadas às alternativas existentes (Dumbleton, Woods, Jones & Fonn, 2008)

As lentes em silicone hidrogel são constituídas por diversos materiais: além de derivados de de siloxano como o polidimetilsiloxano (PDMS), contêm também materiais tradicionais das lentes de contacto convencionais como é o caso dos derivados do HEMA e outros metacrilatos. Hoje em dia mais de doze materiais diferentes de silicone hidrogel estão disponíveis no mercado (Méijome et al., 2014).

Atualmente estão em estudo estratégias para a utilização das lentes de contacto noutros campos biomédicos para além da correção da visão, tais como a libertação de fármacos para o olho (Caló & Khutoryanskiy, 2014) (Xinming et al. 2008). Devido às suas propriedades, as lentes flexíveis de hidrogéis são capazes de armazenar e libertar fármacos, tornando-os disponíveis para absorção pela mucosa ocular. Hoje em dia, já existem numerosos métodos que tornam possível a incorporação de fármacos nas lentes de contacto (Xinming et al. 2008), mas este dispositivo ainda não existe no mercado.

2.1.1.2. Pensos dérmicos para o tratamento de feridas

Outra das aplicações possíveis a nível biomédico dos hidrogéis é na cicatrização de feridas cutâneas, por intermédio de pensos dérmicos.

Uma ferida é uma lesão na pele que envolve uma descontinuidade deste tecido, normalmente causada por um ato ou acidente, embora também possa dever-se a doença. O trauma sofrido na pele e nos tecidos subjacentes requerem cicatrização de modo a que este defeito seja reparado e se evitem infeções (Leonard, 2014). O fabrico de pensos que sejam eficazes no tratamento de feridas deve pressupor uma compreensão holística da ferida.

A escolha do penso a utilizar deve ter em conta as condições específicas do doente e da ferida e as características do material em si que será aplicado na ferida. A escolha correta do penso influencia diretamente a cicatrização e de uma forma genérica a qualidade de vida do doente (Caló, 2015). Pensos apropriados são cada vez mais procurados, especialmente em feridas crónicas, que não seguem o padrão normal de cicatrização, como é o caso das úlceras (Sannino et al., 2009).

Hoje, sabe-se que um penso que proporcione o nível de humidade adequado ao tratamento de uma ferida diminui para metade o tempo de cicatrização desta quando comparado ao penso tradicional, tornando-o mais eficaz que o tratamento clássico que poderá até mesmo secar ou irritar a pele. A humidade, segundo a literatura, favorece a reconstrução tecidual e a renovação das células epiteliais da pele (Gibas & Janik, 2010).

Os pensos são geralmente classificados como produtos passivos, ativos ou bioativos (Paul e Sharma, 2004). Os pensos modernos são atualmente vistos em três categorias. Podem ser pensos passivos – como o caso da gaze, não oclusivos, que são usados para tapar a ferida e permitir que restaure a sua função, podem ser interativos se forem semi-oclusivos ou oclusivos – disponível na forma de geles, hidrocolóides, hidrogéis ou espuma que atuam como barreira contra a penetração bacteriana. Por último temos os pensos bioativos, produzidos de biomateriais que desempenham um papel importante no processo da cicatrização – geralmente derivados de tecidos naturais como o colagénio, ácido hialurónico ou o quitosano (Dhivya, Padma & Santhini 2015).

Em 1999, a FDA sugeriu a classificação que se segue para os materiais usados no tratamento de feridas:

1. Não reabsorvíveis (gaze)
2. Pensos oclusivos
3. Pensos absorvíveis/hidrofílicos
4. Hidrogéis

Contudo, esta classificação clássica já foi ultrapassada no sentido em que não existem verdadeiros limites entre os vários grupos, e hoje em dia há bastantes materiais que se enquadram em mais de um grupo (Shai & Maibach, 2005)

Como referido anteriormente, os hidrogéis têm uma estrutura capaz de reter água e deste modo conseguem proporcionar o ambiente húmido favorável à regeneração tecidular e a difusão e transporte de nutrientes e gases, prevenindo a necrose e contribuindo para o controlo da resposta imunitária. São não irritantes aos tecidos e demonstram elevada biocompatibilidade. Na presença de tecidos necrosados, os hidrogéis são capazes de estabelecer um desbridamento por autólise que facilita a eliminação desse tecido necrosado (Caló, 2015) (Mayet et al., 2014). Também podem ser usados, no tratamento de queimaduras (pensos húmidos) e como componentes de pastas.

Os hidrogéis usados como pensos no tratamento de feridas fornecem hidratação a feridas com um teor baixo ou médio de exsudado. Alguns são adequados a feridas necróticas ou com crosta, podendo permanecer sobre a ferida por vários dias (Mayet et al., 2014) (Caló, 2015). Podem ser usados em feridas planas, em seios ou cavidades e em feridas com superfícies e/ou formas irregulares (Ågren, 2016).



Figura 4 - Penso de hidrogel Hydrosorb® (Hartmann, 2016)

Na generalidade existem três grandes tipos de hidrogéis que são utilizados pensos em feridas: amorfos, impregnados ou em placa. Os hidrogéis amorfos são utilizados diretamente sobre a ferida e são a forma mais comum no que toca a pensos para aplicação em feridas, e o seu emprego está altamente evidenciado na literatura científica (Jones, Grey, Harding, 2006). Como o próprio nome indica, ao serem amorfos não adquirem uma forma específica e são constituídos 2 a 3% de um polímero formador de gel como a carboximetilcelulose e um balanço de 80% de água. Podem ser aplicados juntamente com uma gaze na forma impregnada (Hafner, 1999) A forma impregnada consiste num hidrogel amorfo que é aplicado sobre a gaze e de seguida colocado na ferida. Os hidrogéis em placa são finas malhas de polímero que podem ser cortadas à medida e colocadas diretamente sobre a ferida (Ågren, 2016). São normalmente hidrogéis de poliacrilamida ou óxido de polietileno, feitos de uma rede tridimensional destes polímeros sintéticos que incorpora água e assume uma forma sólida de placa (Hafner, 1999).

Vários hidrogéis foram patenteados ao longo dos anos para o uso em pensos para o tratamento de feridas, que à base de polímeros sintéticos, quer naturais ou mesmo a combinação de ambos (Sannino et al., 2009).

Exemplos de hidrogéis usados no fabrico de pensos dérmicos para feridas são, no caso dos sintéticos os hidrogéis à base de PVA e o PHEMA, e no caso dos hidrogéis naturais os hidrogéis de quitosano, os hidrogéis, à base de celulose e à base de alginato.

Os hidrogéis de PVA são dos hidrogéis sintéticos mais antigos e mais frequentes em aplicações biomédicas, muito usados nos pensos dérmicos (Kamoun, Chen, Eldin & Kenawy, 2014). Este é um material que consegue reter bastante água na sua estrutura por tempo prolongado conferindo à ferida o ambiente húmido necessário à cicatrização. Devido às suas excelentes propriedades, torna-se possível misturar o PVA com outros polímeros sintéticos ou naturais como o alginato e o quitosano formando assim membranas ou filmes com boas características para serem usadas em pensos para tratamento de feridas (Kamoun, Chen, Eldin & Kenawy, 2014).

Também o PHEMA é utilizado sobretudo em pensos para queimaduras dado que assegura boas condições no tratamento destas feridas (Gibas & Janik, 2010).

No que diz respeito aos hidrogéis à base de polímeros naturais, os de quitosano apresentam excelentes características para este tipo de aplicação. O quitosano é um biopolímero derivado da quitina, que existe no esqueleto de crustáceos. Tem propriedades que contribuem para o processo de cicatrização, nomeadamente: antibacterianas, fungistáticas, de indução celular como a hemóstase, alteração da função imunitária e reestruturação da arquitetura dos tecidos. O seu uso está bem documentado na literatura (Paul e Sharma, 2004) (Águilar & Román, 2014). Os hidrogéis de quitosano podem ser combinados com filamentos de alginato e de algodão para o fabrico de pensos (Águilar & Román, 2014).

Os hidrogéis de alginato ou à base de alginato são obtidos através da reticulação de polímeros de alginato e são compostos por uma matriz formada por ou alginato de cálcio ou sódio, ou uma combinação das duas. Estes iões, sódio e cálcio, são trocados entre a ferida, o exsudado e o material do penso acelerando o processo da cicatrização (Rajendran, 2009). Os géis poliméricos de alginato são altamente absorventes e têm que ser trocados diariamente. Necessitam de um penso secundário por cima e são úteis em todas as feridas com alto teor de exsudado (Mayet et al., 2014).

Os hidrogéis naturais à base de celulose são também bastante populares como pensos. Os produtos comerciais deste tipo existentes no mercado para este fim contêm tipicamente carboximetilcelulose ou carboximetilcelulose sódica e podem ser combinados com propilenoglicol que atua como humectante e conservante, ou mesmo a outros polímeros como o quitosano ou os alginatos (Ågren, 2016). Eles estão disponíveis na forma de gel amorfo ou em placas (Sannino et al., 2009). Também é importante sublinhar a existência da celulose de origem bacteriana, produzida em cultura microbiana e desenvolvida como um polímero biocompatível e biodegradável com capacidades de absorção em feridas com alto teor exsudados (Ågren, 2016). Vários estudos que provam as suas excelentes capacidades

para a cura de queimaduras e feridas crônicas como as úlceras (Czaja, Young, Kawecki & Brown, 2007).

Genericamente, os hidrogeles mostram resultados superiores quando comparados aos pensos tradicionais como a gaze. Foi provado numa revisão Cochrane que devem ser o tratamento de eleição para a cicatrização de úlceras em doentes com pé diabético (Dumville, O'Meara, Deshpande et al., 2011). Noutra meta-análise, demonstraram maior eficácia na cura de queimaduras superficiais e de segundo grau do que os métodos tradicionais (Wasiak, Cleland, Campbell et al., 2013).

Como está supramencionado, não podemos olvidar a aplicabilidade dos hidrogeles como sistemas de libertação de fármacos. Também no campo dos pensos dérmicos se pode explorar esta característica farmacoterapêutica. Dentro dos hidrogeles utilizados para o fabrico de pensos, recentemente foram investigadas formulações onde se juntaram agentes

antimicrobianos como iões de prata ou o iodo (Caló & Khutoryanskiy, 2014) (Sannino et al., 2009). Também foi investigada a incorporação do antisséptico hidrócloro de polihexametileno guanidina (PHMG) (Finnegan & Percival, 2015). A incorporação deste tipo de substância é especialmente útil quando as feridas têm associada infeção local ou mesmo sistémica, que compromete o processo de cicatrização (Caló & Khutoryanskiy, 2014).

A escolha dos hidrogeles com incorporação de antimicrobianos dependerá do tipo de patologia subjacente, do tipo de ferida e sua localização e obviamente do biofilme que se pretende erradicar. Apesar da grande variedade de hidrogeles antimicrobianos, existe uma grande lacuna no que toca a evidência científica que aborde a eficácia destes nos biofilmes e a taxa de cura e cicatrização (Finnegan & Percival, 2015).

Atualmente estão a ser desenvolvidos cada vez mais hidrogeles, e a tendência futura será de aumentar o espectro existente de materiais disponíveis para o tratamento dos diversos tipos de feridas existentes. Estão a ser investigados hidrogeles contendo endopeptidases que

clivam proteínas desnaturadas, ou mesmo com superóxido dismutase que revela efeitos positivos na cura de feridas (Finnegan & Percival, 2015). Também hidrogeles biodegradáveis produzidos a partir de policarbonatos de vitamina E estão a ser estudados com o objetivo de apresentarem atividade antimicrobianas (Lee et al., 2013). Pensos à base de celulose modificada podem ser usados para incorporação de moléculas como agentes antimicrobianos, antioxidantes, hormonas, vitaminas e outros agentes (Ågren, 2016). A tendência futura revela assim inúmeros novos hidrogeles com eficácia acrescida que poderão vir a fazer parte do arsenal terapêutico (Finnegan & Percival, 2015).

2.1.1.3. Dispositivos para cirurgia plástica e reconstrutiva

Os hidrogeles, pela sua estrutura polimérica e arquitetura, assemelham-se aos componentes da matriz extracelular natural ocorrente nos tecidos do corpo humano. Esta característica despoletou o interesse do seu estudo como materiais passíveis de serem utilizados em cirurgias plásticas e reconstrutivas (Chirani et al., 2015)

Nesta categoria enquadram-se, entre outros, os hidrogeles de ácido hialurónico e os hidrogeles de poliacrilamida. Ambos os materiais são usados em cirurgias plásticas e reconstrutivas, na forma de injeções como materiais de preenchimento para aumento mamário, aumento de nádegas e enchimento labial. São também adequados para uso nas superfícies articulares, com fim reconstrutivo, tomando como exemplo a articulação temporomandibular.

Os hidrogeles de ácido hialurónico, compostos que já existem na matriz extracelular e que está, portanto, presente nos tecidos conjuntivos, epiteliais e neurais como a pele, cartilagem e o humor vítreo, são fabricados com base neste glicosaminoglicano natural. Devido à sua origem natural são biocompatíveis, não desencadeando nem resposta imunológica nem inflamatória (Li, Rodrigues, Tomás, 2012). Já desde há alguns anos que têm sido investigados com o objetivo de servirem como agente para preenchimentos em cirurgias plásticas (Chirani et al., 2015) e ainda são usados nos dias de hoje em diversos procedimentos cosméticos.

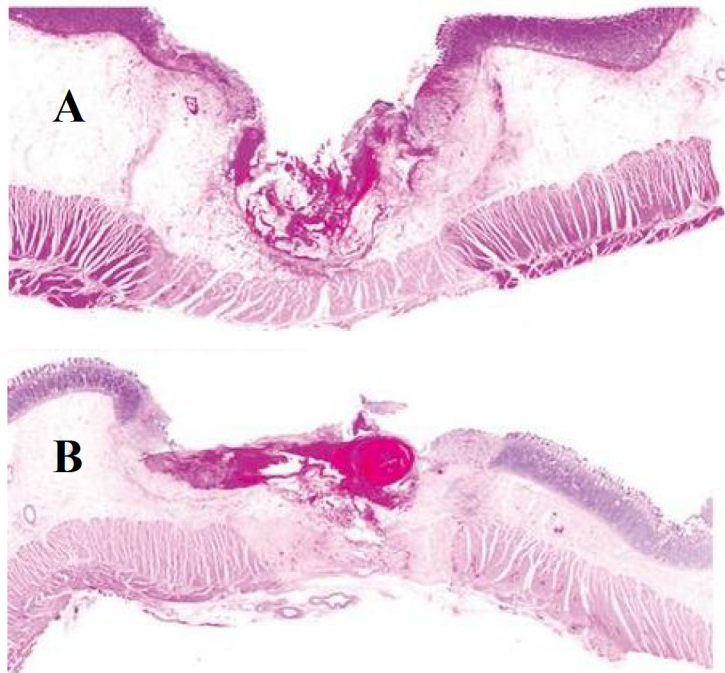


Figura 5 - Cortes histológicos de uma seção do estômago - A: sem injeção de ácido hialurônico; B: 24 horas após injeção de ácido hialurônico (adaptado: (Niimi K. , Fujishiro, Kodashima, & Ono, 2009))

Os derivados de ácido hialurônico, desenhados e produzidos através da bioengenharia são considerados como uma opção segura e eficaz no aumento dos tecidos moles no âmbito do rejuvenescimento facial não cirúrgico. O seu uso é extenso no presente e manter-se-á uma opção pertinente no futuro. Encontram aplicações especificamente na região dos lábios, nasolabial e também na região malar (Rohrich, Ghavami, Crosby, 2006).

Também os hidrogéis de poliacrilamida foram alvo de alguma atenção na área da cirurgia plástica na década de 1990. Foram primeiramente apresentados como atóxicos, estáveis, não reabsorvíveis e altamente biocompatíveis, sendo utilizados no campo da oftalmologia (Christensen et al., 2003). Com o passar dos anos foram introduzidos similarmente, ao

ácido hialurónico, como material de preenchimento, sobretudo na zona mamária – como alternativa ao silicone - e tornaram-se bastante populares no Leste da Europa (Christensen et al., 2003; Evstatiev, 2003). Contudo, em contraste com os hidrogéis de ácido hialurónico, provavelmente devido à sua origem sintética, começaram a originar várias complicações para os portadores, o que levou a uma certa apreensão por parte da comunidade clínica, público e algum mediatismo (Evstatiev, 2003; Wang et al., 2012).

Foi documentado que o aumento mamário através de geles de poliacrilamida resultou mesmo em reações graves como infeções crónicas e sistémicas possivelmente fatais, ulcerações e outras reações adversas bizarras (Wang et al., 2012) o que levou ao abandono da popularidade de uso deste material. Mesmo em alguns casos, observou-se a migração do hidrogel passado algum tempo da sua injeção, o que resultou em reações inflamatórias diversas e mesmo necrose dos tecidos nas áreas de injeção e de migração. A sua remoção posteriormente a ser injetado é tecnicamente difícil, o que o torna ainda mais perigoso (Evstatiev, 2003).

Ainda dentro da cirurgia plástica para aumento mamário encontramos os hidrogéis como carboximetilcelulose (CMC), que foram apresentados como geles viscoelásticos, não tóxicos, não mutagénicos e biodegradáveis, em detrimento dos implantes tradicionais de silicone que não têm capacidade de serem degradados pelo corpo caso haja ruptura (Bruner &Gröner, 2006). Foram conduzidos estudos prospetivos de modo a avaliar a eficácia da reabilitação com estes implantes e os resultados foram bastante positivos – alta taxa de satisfação por parte dos pacientes e uma taxa de complicações muito baixa (Bruner &Gröner, 2006) (Kappel & Prujin, 2011). Estes implantes provaram assim ser uma alternativa viável aos seus congéneres de silicone.

Note-se que os implantes mamários de silicone são constituídos por um invólucro de silicone que contém diferentes tipos de substâncias. Os produtos habitualmente utilizados para o seu preenchimento são o gel silicone (diferente de um hidrogel, como se explicou anteriormente), seja solução salina ou hidrogel(INFARMED, 2012)

2.1.1.4. Aplicações em engenharia de tecidos

A medicina regenerativa foi uma área que sofreu um incremento substancial nas últimas décadas do século XX e continua a evoluir a grande escala na atualidade. Foi sem dúvida uma das descobertas revolucionárias que permitiu os avanços biomédicos experienciados nos dias de hoje.

O termo engenharia dos tecidos diz respeito à aplicação de princípios e métodos de engenharia e das ciências da vida, com vista à compreensão das relações entre as estruturas e a função de tecidos mamíferos normais e patológicos e ao desenvolvimento de substitutos biológicos para restaurar, manter e melhorar a função dos tecidos (Patrick, Milkos, McIntire, 1998)

A engenharia dos tecidos é uma das mais recentes áreas de aplicação dos hidrogéis. Ainda que seja das mais recentes, é possivelmente a área mais explorada em termos de estudos e investigações, de todas as mencionadas, anteriormente.

Dentro desta área, eles podem ser usados como agentes preenchedores de espaço em falta, como veículos de libertação de substâncias bioativas ou como estruturas tridimensionais que suportam e organizam as células e produzem estímulos para o desenvolvimento dos tecidos, como é o caso dos *scaffolds* (Caló & Khutoryanskiy, 2014). Neste tópico será abordada a engenharia dos tecidos e o *scaffolding* na sua generalidade bem como o emprego dos hidrogéis em locais específicos como é o caso das cartilagens.

O planeamento e fabrico de *scaffolds* é uma das grandes áreas de investigação em biomateriais uma vez que estes desempenham um papel fundamental na regeneração e reparo dos tecidos.

Os *scaffolds* são definidos como estruturas constituídas por biomateriais porosos sólidos tridimensionais planeadas para desempenhar algumas ou todas as seguintes funções: promover interações entre as células e o biomaterial, adesão celular ou deposição de matriz extracelular, permitir o transporte de gases nutrientes e fatores reguladores da sobrevivência

celular e sua proliferação e diferenciação; poderem ser biodegradadas a uma taxa controlável que aproxima a da regeneração de tecidos sob meios de cultura e terem a capacidade de provocar um grau mínimo de inflamação ou toxicidade *in vivo* (Dhandayuthapani et al., 2011).

Os hidrogeles usados em engenharia de tecidos, em particular em *scaffolds*, podem acomodar células vivas (quando os poros são suficientemente grandes), ou então podem dissolver-se/degradar-se naturalmente, libertando desta forma fatores de crescimento e criando poros passíveis de serem penetrados por células vivas que seguem a sua proliferação (Chirani et al., 2015). Em engenharia dos tecidos, os hidrogeles têm que cumprir uma série de características e parâmetros físicos e biológicos para promoverem adequadamente a formação de tecido novo para reparar a lesão (Dhandayuthapani, Yoshida, Maekawa & Kumar, 2011).

Existem diversos hidrogeles com possibilidade de serem aplicados no campo da engenharia dos tecidos. Mais uma vez, estes dividem-se em naturais ou sintéticos. No que diz respeito aos hidrogeles baseados em polímeros naturais, temos os hidrogeles de ácido hialurónico, quitosano, alginatos, colagénio ou sulfato de condroitina. Os hidrogeles sintéticos usados para este fim são essencialmente o polietileno glicol (PEG), o ácido poliláctico (PLA) (Sherbiny & Yacoub 2013) e também o PVA. As vantagens e desvantagens de ambos os tipos de materiais são múltiplas. Essencialmente, os materiais sintéticos conseguem ser mais consistentes e mais baratos que os polímeros naturais, mas são mais suscetíveis a demonstrarem toxicidade. Ainda assim, também os naturais podem ser patogénicos, como é o caso do ácido hialurónico proveniente de animais (Weiss, Fatimi Guicheux & Vinatier, 2010).

Apesar de à partida parecer que as qualidades/vantagens dos hidrogéis são incomensuráveis, em bioengenharia tecidual existem ainda bastantes desafios a ultrapassar de modo a melhorar o desempenho destes materiais. Os maiores problemas relativamente à regeneração de tecidos são: a regulação das células estaminais, as propriedades mecânicas do material, a vascularização do tecido interdependente da viabilidade e função celular, o edema após a injeção e a toxicidade originária dos constituintes não reagidos (Shi, Xing, Zhong, 2012). A par com estas existe ainda a fraca penetração celular e o semear irregular

das células devido ao controlo espacial ou temporal inapropriado, e as dificuldades associadas aos múltiplos tipos de células existentes numa só matriz (Sherbiny & Yacoub 2013).

A área ortopédica é o exemplo por excelência da aplicação biomédica dos hidrogéis em engenharia de tecidos. É de notar que as extremidades ósseas em superfícies articulares móveis são cobertas por cartilagem articular, formada por intermédio de um tecido de hidrogel natural constituído por colagénio e sulfato de condroitina (Corkhill, Hamilton, Tighe, 1987). Uma vez que a própria anatomia articular incorpora os hidrogéis, estes tornam-se perfeitos candidatos para reabilitação das articulações devido as características similares aos tecidos conjuntivos, os hidrogéis suportam também o crescimento, a multiplicação e diferenciação das células precisas à regeneração desses tecidos (Weiss, Fatimi Guicheux & Vinatier, 2010).

O emprego dos hidrogéis em patologias degenerativas ou defeitos articulares é por isso pertinente. Com efeito, a cartilagem articular humana requer pouco envolvimento metabólico por ter uma matriz com baixa taxa celular e por ser avascular (Weiss, Fatimi Guicheux & Vinatier, 2010).

As técnicas tradicionais de abordagem cirúrgica a reparos e defeitos a nível articular eram na sua maioria invasivas, ou implicavam enxertos cartilaginosos autógenos – provenientes do próprio indivíduo ou alógenos – provenientes de um indivíduo geneticamente diferente mas da mesma espécie (Abbas, Lichtman, Pillai, 2014)(Vilela et al., 2015). A aplicação dos hidrogéis veio resolver muitos destes problemas visto que poderá simplificar os procedimentos e protocolos cirúrgicos, tornando-os minimamente invasivos. Uma solução com a matriz funcional passa a ser injetada na área requerida, diminuindo os custos de tratamento e incrementado a segurança e o conforto por parte do doente (Vilela et al., 2015).

Os hidrogéis podem ser usados em engenharia dos tecidos como implantes ou *scaffolds*. Ou seja, pode haver uma adesão direta do hidrogel às células ou pode haver uma suspensão destas sobre o *scaffold*, que é apenas utilizado para o crescimento *ex vivo* ou *in vivo* acompanhando de degeneração da matriz polimérica (Sherbiny & Yacoub 2013). Pela sua natureza biomimética, os hidrogéis usados como *scaffolds* desempenham um papel admirável. Eles conseguem substituir muitas das funções da matriz extracelular nativa, organizar as células tridimensionalmente e permitir, no meio disto, trocas gasosas e metabólicas no sítio da sua implantação (Vinatier et al., 2006). Os hidrogéis podem também servir de transportadores para a transplantação celular, através de microesferas de hidrogel que contêm soluções incorporadas com células (Sherbiny & Yacoub 2013).

Como implantes acelulares, os hidrogéis tornam-se semelhantes mecanicamente e estruturalmente à cartilagem, permitindo uma transferência de carga aos tecidos articulares e ósseos adequada (Spiller, Maher & Lowman, 2011)

O hidrogel de PVA revela um comportamento friccional e de lubrificação semelhante à da cartilagem articular, ainda assim, a sua falta de integração com os tecidos cartilagíneos circundantes impediu-o de ser usado como um substituto da cartilagem. Ele é essencialmente usado como *scaffold* para a incorporação celular (Spiller, Maher & Lowman 2011).

O PEG é usado como hidrogel injetável, encapsulado como condrócitos ou células estaminais para induzir a formação de cartilagem na presença de fatores de crescimento (Spiller, Maher & Lowman, 2011). Analisando os polímeros naturais existem várias opções, como o colagénio, os hidrogeles de fibrina, o quitosano ou os alginatos. Estes apresentam estruturas similares aos glicosaminoglicanos encontrados na matriz extracelular articular. O grande problema com os polímeros naturais é sem dúvida as fracas propriedades mecânicas, que dificultam o manuseamento e a sua colocação *in situ*. Apesar disto, eles são usados como *scaffolds* para a distribuição tanto celular como de fatores de crescimento (Zhao et al., 2012).

O desenvolvimento e reparo de defeitos de cartilagem hialina com auxílio dos hidrogeles já foi documentado e provado num número considerável de estudos *in vivo*, demonstrando a viabilidade do uso destes materiais (Vilela et al., 2015).

Novos projetos de hidrogeles para *scaffolds* estão a ser desenvolvidos, e certamente que esta será uma área com grande potencial de desenvolvimento nos anos futuros. Materiais híbridos como hidrogeles formados por nanocompósitos de quitina e hidroxiapatite já foram investigados como candidatos para a renovação e engenharia estrutural de tecido ósseo (Chang et al., 2013). Têm sido também realizados estudos de matrizes para o crescimento de células estaminais (Wang et al., 2016), que poderão servir como base para a formação de órgãos ou renovação e reparo de tecidos ausentes, como é o caso dos folículos capilares. Também é importante reforçar o seu potencial como matrizes para sistemas libertadores de fármacos, uma área com um interesse crescente atualmente (Gan et al., 2016), que permitirá colmatar as falhas da farmacoterapia na presente geração.

Apesar de todas as técnicas existentes é importante referir que a engenharia de tecidos é uma tecnologia com grandes custos, e para que hajam avanços e o seu acesso seja mais vasto é fundamental que se reduzam os custos associados (Weiss, Fatimi Guicheux & Vinatier, 2010).

Ressalve-se que para além das aplicações biomédicas dos hidrogéis enumeradas nesta revisão literária, existem inúmeros campos possíveis de destino para o uso destes polímeros. A área médica é uma área de constante desenvolvimento e novos métodos/tecnologias surgirão para dar emprego a estes materiais.

Assim, torna-se bastante oportuno o enquadramento da esterilização destes materiais, abordada a seguir, já que, sendo um passo fundamental para garantir a segurança dos dispositivos, não deverá comprometer as suas propriedades.

3. Esterilização

Devido às suas incontáveis aplicações no campo da medicina e ciências afins os hidrogéis têm muitas vezes que ser submetidos a processos e técnicas de esterilização para que o seu uso médico e comercial seja seguro do ponto de vista biológico. Em particular, antes da implantação de um dispositivo no corpo humano, este deverá ser esterilizado para diminuir o risco de infecção (Moore & Maitland, 2014).

A esterilização pode constituir um problema nos materiais poliméricos, dado que muitos deles são sensíveis ao calor e/ou à radiação, agentes que constituem a base de muitos métodos de esterilização. A esterilização de hidrogéis é um desafio ainda maior, uma vez que a natureza destes materiais permite o aporte de uma quantidade significativa de água que favorece a entrada e proliferação de microorganismos no material. Além disso, na maior parte dos casos é necessário esterilizar estes materiais no seu estado hidratado, e a presença de água pode, nalgumas situações, desencadear reações que originam degradação da matriz polimérica (cisão), conduzindo a alterações nas propriedades intrínsecas do material. Assim, é necessário haver um grande cuidado na esterilização deste tipo de materiais, especialmente para aplicações *in vivo* (Waugh & Lawrence, 2014).

É mandatório considerar a esterilização quando se pensa no desenvolvimento de um dispositivo médico. Com efeito, este passo deve ter sido em conta nas fases primárias do seu desenvolvimento dado que é necessário assegurar que o produto final consegue ser esterilizado de maneira eficaz, utilizando procedimentos baratos e ecológicos (Lerouge & Simmons, 2012). Existem vários métodos de esterilização para biomateriais, e mesmo considerando os polímeros e em especial os hidrogéis, existem bastantes métodos ao dispor para cumprir este parâmetro (Lerouge & Simmons, 2012).

Devido ao progresso dos meios e procedimentos de esterilização, conseguiu-se superar o grande problema das infeções nasocomiais – infeções adquiridas em meio hospitalar, ligadas à falta de meios de higiene e à contaminação dos instrumentos e materiais de uso médico. Hoje em dia, grande parte destas infeções já não estão relacionadas com a deficiente esterilização (Lerouge & Simmons, 2012). Ainda assim, a esterilização eficaz dos biomateriais continua a ser uma etapa que requer bastante atenção, na medida em que é

necessário ponderar cada método e os seus efeitos na estrutura do material, que condicionarão a futura aplicação.

Dada a indiscutível importância da esterilização para a prevenção do desenvolvimento de infecções no hospedeiro, neste capítulo serão abordados os métodos de esterilização mais comuns, e em particular os mais adequados à esterilização de hidrogéis para as aplicações anteriormente referidas nesta dissertação.

3.1.Noções gerais de esterilização

A esterilização é um requisito essencial para os instrumentos ou biomateriais que estejam em contacto direto com partes do corpo humano que sejam, em condições normais, estéreis (Rao, 2007), ou onde se pretende evitar a introdução de microorganismos estranhos. A esterilização é assim definida como o uso de um procedimento químico ou físico que visa a destruição de toda a vida microbiana incluindo os endosporos bacterianos altamente resistentes (Szycher & Sharma, 1991).

Falhas na esterilização resultam, em última instância, em infeções nasocomiais contraídas por parte de pacientes internados e preocupações a nível da mortalidade e morbilidade (Lerouge & Simmons, 2012), constituindo um problema de saúde pública e aumentando custos para os pacientes e para os sistemas de saúde.

Na indústria de dispositivos médicos, a probabilidade de microorganismos sobreviverem ao processo de esterilização define a sua esterilidade. A metodologia empregue na esterilização deve providenciar vias para a morte de esporos, ou deve deixar o microorganismo incapaz de se reproduzir de modo a que o dispositivo não possa suportar vida bacteriana *in vivo* (Kausch, 2003). Contudo, nem sempre o emprego de um método de esterilização garante a esterilidade do dispositivo ou produto (McDonnell, 2007). Um método de esterilização ideal deve ser altamente eficiente e muito fiável, sendo capaz de desativar todas as formas de vida incluindo príons, endotoxinas e endosporos bacterianos. Não deve induzir danos no dispositivo, mesmo que sejam aplicados ciclos repetidos de esterilização (Lerouge & Simmons, 2012).

3.1.1. Conceito de esterilização

Existe algum equívoco relativamente aos termos “desinfecção” e “esterilização” por parte dos profissionais de saúde, levando a um grau de confusão que é aumentado com o uso corrente da expressão (Szycher & Sharma, 1991). É necessário por isso clarificar estes conceitos.

A desinfecção distingue-se da esterilização uma vez que não assegura a morte de todas as formas de microorganismos, como por exemplo, de esporos bacterianos. (Szycher & Sharma, 1991)(Lerouge & Simmons, 2012) o que logicamente lhe confere um nível de segurança inferior ao obtido com a esterilização. Existem diferentes níveis de desinfecção, que variam dependendo do desinfetante e do processo utilizado na desinfecção. A desinfecção, é, portanto, um procedimento que apenas reduz o nível de contaminação microbiana (Szycher & Sharma, 1991). A escolha entre esterilização e desinfecção deve ser feita de acordo com o risco de se propagar a infeção (Lerouge & Simmons, 2012).

Spaulding em 1957 sugeriu uma classificação que evidencia quais os dispositivos médicos que devem ser desinfetados e quais os que devem ser esterilizados. A esterilização é necessária e obrigatória a todos os dispositivos médicos críticos – ou seja, todos os que se destinam a entrar em contacto com tecidos estéreis – e é recomendada a todos os dispositivos médicos semi-críticos – todos os dispositivos concebidos para o contacto com tecidos mucosos ou pele não intacta. Estes últimos também poderão sofrer, em alternativa, um alto nível de desinfecção (Spaulding, 1972; Lerouge & Simmons, 2012)

Uma vez que a esterilização absoluta é inatingível, definiu-se que um material está estéril quando a probabilidade de encontrar um organismo viável no seu interior ou na sua superfície é no máximo de 1 em 1 000 000 (Block, 2000). Este conceito está ligado ao *Security Assurance Level* (SAL) que é a probabilidade de um único microorganismo viável ocorrer no produto após este ser submetido ao processo de esterilização (Lerouge & Simmons, 2012). Assim, o SAL aplicável ao conceito de Block traduz-se em 10^{-6} , que é o valor recomendável e aceitável para um dispositivo médico (Agrawal et al., 2014).

A esterilização é em geral o último passo no fabrico de dispositivos biomédicos destinados a estarem em contacto com tecidos virtualmente estéreis, pele gravemente danificada ou tecidos mucosos (Lerouge & Simmons, 2012). Os hidrogeles discutidos nesta revisão bibliográfica enquadram-se nesta categoria de dispositivos médicos.

Para garantir a esterilidade durante as fases de armazenamento, distribuição e transporte, até à utilização dos dispositivos, estes devem estar devidamente acondicionados. A embalagem a utilizar deve constituir uma barreira eficaz, que garanta a esterilidade dos materiais, desde que são esterilizados até serem utilizados. O material utilizado na embalagem deve ser adequado e suficientemente resistente para garantir a sua integridade, tendo em conta as características do dispositivo médico e o manuseamento a que vai ser sujeito.

3.1.2. Parâmetros de esterilização

Conhecer e compreender a inativação microbiana e os seus parâmetros cinéticos é fundamental para a determinação da influência das várias condições utilizadas nos métodos de esterilização (Nagaraja, 2011).

A esterilização pode ser considerada uma função de probabilidade. A probabilidade de existir um microorganismo sobrevivente não deve ser superior a 10^{-3} para produtos de uso tópico e de 10^{-6} para dispositivos implantáveis ou contendo sangue.

O intervalo de tempo de redução decimal (valor D) é o principal parâmetro de avaliação das características de termoresistência da população microbiana. O valor D pode definir-se como o tempo necessário para reduzir 90% da população microbiana inicial, ou seja, obter uma fração sobrevivente de 1/10 (ou reduzir um ciclo logarítmico). O uso do valor D permite o cálculo teórico do SAL de qualquer processo de esterilização terminal (Sherman, 1998). A partir do valor de D de um lote de bioindicadores é possível também determinar o tempo mínimo que um microorganismo deve ser exposto ao agente esterilizante.

A variação do número de sobreviventes, com o tempo de exposição, depende do número de microorganismos inicialmente presentes, e é representada pela equação:

$$\text{Log } N_f = \text{Log } N_0 - (k/2.303)t \quad (1)$$

onde $\text{Log } N_f$ é o logaritmo decimal do número de microorganismos sobreviventes após um tempo (t) de exposição; $\text{Log } N_0$ é o logaritmo decimal do número de microorganismos presentes no tempo inicial ($t=0$) e k é a constante de velocidade específica de destruição por unidade de tempo (t).

O valor D relaciona-se com a constante de velocidade específica de destruição através da relação:

$$D = (2.303/k) \quad (2)$$

Logo, a equação (2) pode ser representada por:

$$\text{Log } N_f = \text{Log } N_0 - (1/D)t \quad (3)$$

(Pinto, Kaneko, & pinto, 2015).

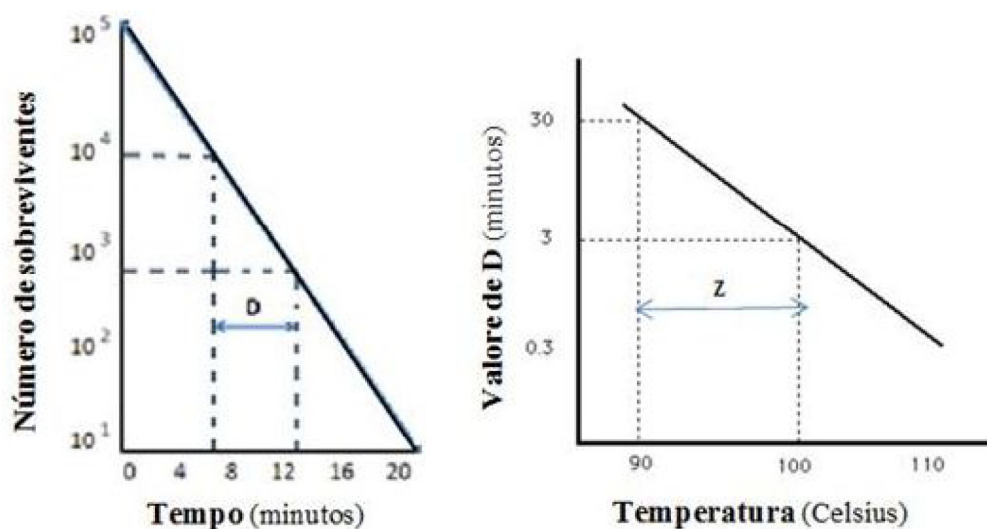


Figura 6 - Definição dos valores de D e Z (adaptado: (Pinto, Kaneko, & Pinto, 2015).

Juntamente com o valor D , o valor Z e F são também parâmetros importantes para definir a cinética de morte microbiana.

A relação entre tempos de processo a diferentes temperaturas para um mesmo nível de

destruição microbiana corresponde à curva do tempo de destruição térmica (TDT- thermal death time). A curva TDT é representada pelo logaritmo decimal do tempo de redução decimal (D) em função da temperatura. O intervalo de temperatura necessário para a redução de 90% do tempo de redução decimal (valor D) é denominado valor Z (Van Doornmalen & Kopinga, 2009). O valor Z permite caracterizar o processo de inativação térmica e é definido como a variação de temperatura em graus Celsius necessária para que haja uma redução de uma unidade logarítmica do valor D. Portanto, o valor Z representa o intervalo de temperatura que ocasiona uma variação de 10 vezes na velocidade de destruição. Quanto menor o valor Z então, tanto maior a variação da velocidade de destruição com a temperatura de exposição.

Em processos em que a temperatura varia ao longo do tempo, é importante conhecer um parâmetro designado valor F. O valor F representa o tempo de um tratamento térmico a temperatura constante (T_{ref}) que tem o mesmo impacto sobre a população de microorganismos que um dado tratamento térmico caracterizado por um perfil de temperatura variável com o tempo, $T(t)$. O valor F permite comparar o efeito de diferentes perfis de tempo-temperatura em termos de impacto sobre a população microbiana. Quanto maior o valor F, maior a redução na população de microorganismos (Fraiese, Lambert & Maillard, 2013).

3.2. Tipos de esterilização

A esterilização, como anteriormente já referido, pode ser um processo químico ou físico (Szycher & Sharma, 1991). Será um processo físico quando é levada a cabo por variáveis físicas tais como a pressão, a temperatura ou a radiação, e química quando recorre a agentes químicos na forma de gases ou líquidos (Torok, Moran & Cooke, 2009).

Inicialmente as técnicas de esterilização eram essencialmente baseadas no calor, como por exemplo o calor húmido (autoclave), da água quente e do calor seco. No entanto, a partir de 1940, devido à introdução dos materiais plásticos, que impôs a necessidade do desenvolvimento de técnicas de baixa temperatura, surgiram outros métodos de

esterilização como a radiação gama ou a esterilização por gás de óxido de etileno (Lerouge & Simmons, 2012). Na figura 7 apresentam-se de forma esquemática os métodos de esterilização mais comuns, que se descrevem em seguida.

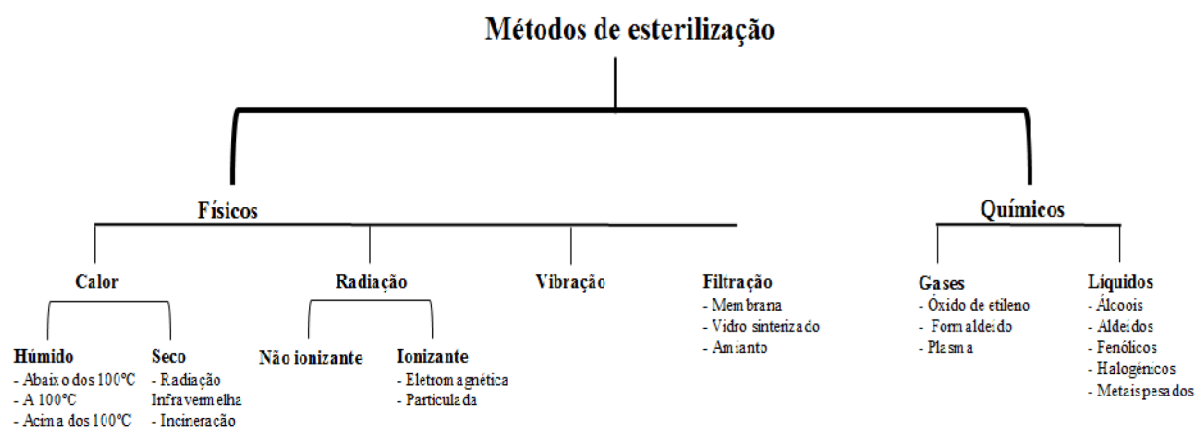


Figura 7 – Métodos de esterilização mais comuns. Adaptado: (Fraise, Lambert, & Mailard, 2013)

3.2.1. Calor húmido

O método mais documentado e conhecido de esterilização é certamente a esterilização por calor húmido com recurso a autoclave (Rutala & Weber, 2008). Neste processo, o dispositivo médico é submetido a vapores com altas pressões e uma temperatura que pode rondar valores desde 121°C até 134°C num período de tempo que ronda desde os 20 minutos aos 45, dentro de uma câmara pressurizada e aquecida chamada autoclave. A autoclave é usada tanto para esterilização como para descontaminação. O princípio básico para a esterilização por calor húmido é essencialmente o contacto direto com a temperatura necessária a uma pressão específica num dado tempo. Os quatro parâmetros necessários são, então, o vapor/humidade, a pressão, a temperatura e o tempo (Rutala & Weber, 2008). Na tabela 1, vem especificado os protocolos de esterilização mais comuns utilizados na autoclave. A esterilização por calor húmido é capaz de matar microorganismos por

desnaturação irreversível de proteínas e enzimas necessárias à viabilidade destes. Contudo só pode ser usada em materiais que aguentem o calor e que não sofram alterações graves estruturais, o que muitas vezes não acontece com os polímeros (Agrawal et al., 2014).

Tabela 1 - Protocolos de esterilização mais comuns utilizados na autoclave (Rutala & Weber, 2008)

Parâmetros necessários para a esterilização	<u>Temperatura</u>		<u>Pressão*</u>		<u>Duração**</u>
	°C	°F	Atm, Bar ou Kg/cm ²	PSI	Minutos
Instrumentos, dispositivos médicos, plásticos, vidros, borracha	121	250	1	15	30
Vestuário	134	275	2	30	20
*Acima da pressão atmosférica					
**Adicionar 5 minutos por cada 1000 metros acima do nível da água do mar					

O valor PSI (*pound force per square inch* ou libra-força por polegada) representa a pressão relativa utilizada na autoclave para garantir as condições de esterilização. Tempos de exposição de vinte minutos tipicamente asseguram uma completa esterilização. A esterilização por calor húmido é largamente utilizada em hospitais, centros de saúde e clínicas privadas (Madhally, 2010). É um método simples, seguro, rápido e eficiente. É muito fácil de ser controlado, é de baixo custo e não origina resíduos tóxicos. Pode ser também usado para a esterilização de líquidos. As suas desvantagens são o facto de poder corroer metais e danificar as suas partes cortantes e ser inadequado para polímeros termosensíveis (Lerouge & Simmons, 2012).

3.2.2. Calor seco

Dentro dos métodos de esterilização por temperatura temos também a esterilização por calor seco, conduzida com temperaturas que variam entre 120°C a 180°C com tempos de exposição menores para as temperaturas maiores. O método de esterilização por calor seco é aplicado ou por radiação infravermelha ou por incineração, normalmente a 134°C (Madhally, 2010), sendo a humidade do ar negligenciável (Agrawal et al., 2014). Para esterilizar através deste método é necessário um tempo mais prolongado do que o calor húmido, e geralmente evita a corrosão dos metais (Lerouge & Simmons, 2012). As temperaturas elevadas necessárias neste método de esterilização não são adequadas para a maioria dos dispositivos médicos. Isto é verdade especialmente quando se fala em polímeros, devido à deterioração experienciada quando estes são sujeitos às altas temperaturas. Este método só costuma ser usado quando o calor húmido não pode ser aplicado, uma vez que é menos eficaz que o antecedente (Rutala & Weber, 2008).

3.2.3. Radiação

Na esterilização com radiação utiliza-se em geral radiação ionizante. A radiação não ionizante é menos energética. Exemplo deste tipo de radiação é a luz ultravioleta. Embora esta radiação corresponda à porção do espectro com comprimentos de onda dos 10 aos 400 nm o comprimento de onda que possui maior atividade bactericida está ao redor de 265 nm. A luz solar tem poder germicida, uma vez que a energia radiante da luz do sol compreende luz ultravioleta. O mecanismo de ação da radiação ultravioleta tem a ver com o dano que esta induz nos ácidos nucleicos. Formam-se dímeros de pirimida e a replicação do ADN pode ser inibida ou podem ocorrer mutações. No entanto, devido à sua baixa energia, a radiação ultravioleta não pode ser utilizada como processo de esterilização. Com efeito, após exposição a luz ultravioleta, uma pequena parte dos microorganismos mantêm-se em geral viáveis. Além disso, a radiação ultravioleta tem um baixo poder de penetração, agindo apenas sobre a superfície e não atravessando a maior parte dos materiais. Por estas razões, este tipo de radiação é apenas usada habitualmente para desinfeção (Thurau, 1999).

Quando se considera radiação ionizante, temos os raio-X, a radiação gama e os feixes de elétrons. A radiação gama é talvez a mais usada para fins industriais, e também na esterilização de polímeros. Esta radiação é produzida, em geral, utilizando o isótopo radioativo do cobalto -Cobalto-60 (^{60}Co). (Agrawal et al., 2014). Os biomateriais são expostos a radiação gama com uma determinada dose, por um dado período de tempo que garante a eliminação dos microorganismos (Madhally, 2010). É um método com custos muito elevados e por isso só está disponível em alguns centros industriais. A sua utilização só se justifica numa abordagem de esterilização em larga escala. Admite uma excelente penetrabilidade, eficácia e segurança. É compatível com vários biomateriais mas, de modo similar aos outros métodos de esterilização abordados também pode alterar a sua estrutura (especialmente de alguns polímeros). Dado que a irradiação é realizada à temperatura ambiente, é uma boa alternativa para esterilização de materiais termosensíveis. Habitualmente o procedimento demora algumas horas e as doses utilizadas podem ir de 10 a 40 kGy, sendo a dose padrão mais comum de 25kGy (Lerouge & Simmons, 2012). O seu mecanismo de ação prende-se com a alteração estrutural direta ou indireta do ADN levando à morte dos microorganismos (Agrawal et al., 2014). Este método de esterilização pode levar à cisão da cadeia e à reticulação do polímero dependendo da dose da radiação e da estrutura química do polímero (Zourikadis, 2013).

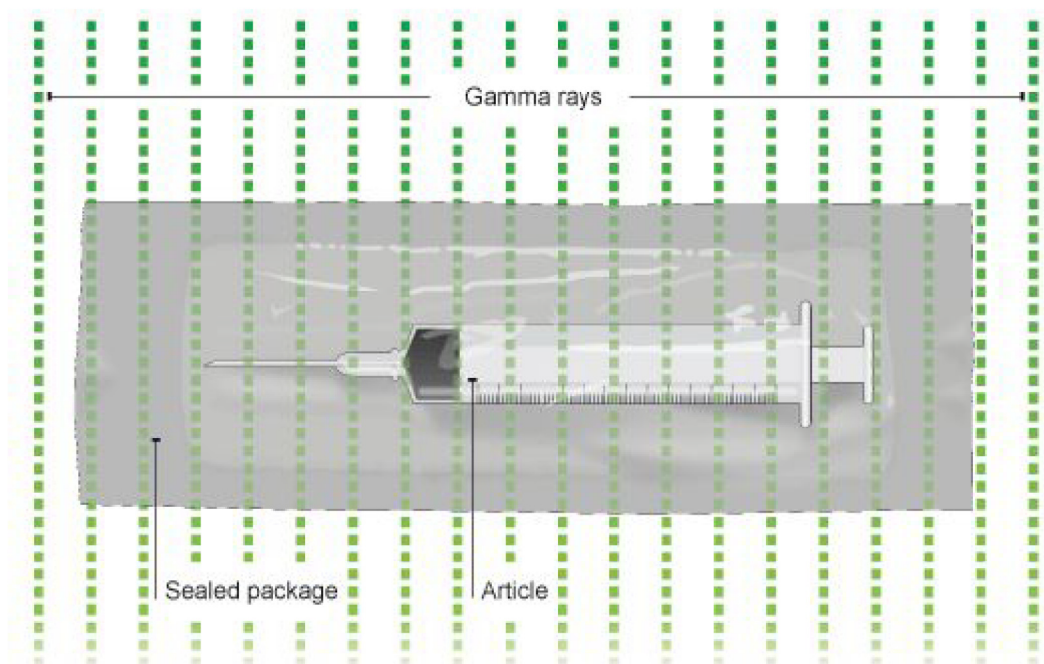


Figura 8– Esterilização de seringa por radiação gama(BBC, 2014).

3.2.4. Vibração

Um outro método físico que pode ser utilizado para eliminar microorganismos é a vibração ultra-sônica, utilizando ondas sonoras de elevada frequência (superior à gama detetada pelo ouvido humano). Os ultra-sons apresentam frequências acima dos 15 kHz e podem causar cavitação nas bactérias. A cavitação é a formação de vácuo parcial no seio de um líquido, que origina pequenas “bolhas”. Estas cavidades colapsam e emitem ondas de choque. Quando este fenómeno ocorre no fluido citoplasmático das células bacterianas, estas desintegram-se devido à pressão externa e ocorre também desnaturação das suas proteínas. As vibrações com ultra-sons são usadas por médicos dentistas para limpeza da superfície dos dentese nos hospitais para limpar instrumentos. Quando usado com um germicida

eficaz, a vibração com ultra-sons permite alcançar a esterilização. No entanto, na generalidade dos casos este procedimento é utilizado como método de limpeza, procedendo-se depois à esterilização em autoclave (Fraise, Lambert, &Mailard, 2013).

3.2.5. Filtração

A esterilização por filtração baseia-se na remoção dos microrganismos de soluções líquidas ou de gases por atravessamento de membranas filtrantes. As membranas, em geral de acetato de celulose ou de polycarbonato apresentam diâmetros de poro muito pequenos (usualmente 0,2 μm) o que permite reter as células microbianas. Esta técnica é muito utilizada em Microbiologia para esterilizar meios de cultura com componentes termossensíveis (e.g. vitaminas, antibióticos, açúcares, aminoácidos) e na indústria farmacêutica para esterilização de soluções de vitaminas, agentes quimioterapêuticos, soro etc. (Shintani, 2011).

Esta é uma técnica que apresenta várias limitações. Em primeiro lugar, só pode ser utilizada para gases ou líquidos, o que inviabiliza a possibilidade de ser utilizada para esterilização terminal de dispositivos médicos. Pode, no entanto, ser usada para esterilizar matérias-primas em solução que depois serão utilizadas na produção dos materiais, mas isso implica que todo o processo de fabrico tenha lugar em condições cGMP (current Good Manufacturing Practices) assépticas. Esta prática pode não ser uma opção viável se a preparação dos materiais envolver um conjunto de passos complexos que possam aumentar o risco de comprometer a esterilidade do produto final e/ou aumentar os custos de uma produção cGMP asséptica. Uma outra limitação do procedimento é o facto da maior parte dos vírus serem suficientemente pequenos para atravessarem os poros das membranas filtrantes, pelo que esta técnica pode não assegurar a esterilidade total das soluções ou gases filtrados (Pinto, Kaneko, & Pinto, 2015)

3.2.6. Gases

O gás óxido de etileno é um dos agentes químicos mais comuns usados para a esterilização por gás (Agrawal et al., 2014). A esterilização por óxido de etileno é um método comumente empregue na esterilização de dispositivos médicos sensíveis à temperatura e humidade. Existem duas formas de esterilizador nesta categoria, os que usam misturas de gases os que usam óxido de etileno a 100% (Rutala & Weber, 2008). Devido ao facto do gás de óxido de etileno ser inflamável e explosivo, e por poder produzir resíduos tóxicos nocivos à saúde, este é normalmente misturado com outros gases como os fluoretos de carbono e o dióxido de carbono (França et al., 2013). O processo de esterilização por óxido de etileno tem algumas etapas: começa com pré-acondicionamento, acondicionamento, exposição ao óxido de etileno, lavagem do produto e finaliza-se com a ventilação final (Rutala & Weber, 2008).

Este método de esterilização mata os microorganismos por alteração da estrutura química dos ácidos nucleicos ou proteínas. Esta alteração química afeta a viabilidade e proliferação dos microorganismos. É muito eficaz em vários tipos de biomateriais, implantes, e também materiais porosos uma vez que consegue penetrar facilmente nos poros (Agrawal et al., 2014). É um método compatível com a maioria dos biomateriais. As desvantagens deste método de esterilização prendem-se com o tempo necessário do processo (3 a 8 horas), o seu custo e principalmente o seu potencial efeito nocivo para os profissionais de saúde e pacientes uma vez que deixa resíduos tóxicos, é mutagénico, cancerígeno, reativo e inflamável (Rutala & Weber, 2008), (Agrawal et al., 2014). Uma vez que é detrimental para a saúde, o seu uso requer grandes cuidados e um alto investimento em sistemas de vácuo/arejamento, sendo por isso deixado para último recurso em muitos casos (Farmacopeia Portuguesa IX, 2008).

Existe também outro tipo de esterilizações químicas com agentes como o formaldeído e o glutaraldeído (Agrawal et al., 2014) ou o dióxido de cloro, que podem ser aplicados também em forma de vapor dentro de uma câmara de ar (Rutala & Weber, 2008).

A atividade germicida destes compostos está também relacionada com a modificação/degradação da estrutura das proteínas e ácidos nucleicos dos microorganismos, que impede que esses compostos celulares realizem as suas funções. O formaldeído tem uma ação lenta: para a concentração de 5%, necessita de 6 a 12 horas para agir como bactericida. Também tem ação fungicida e virucida. A principal desvantagem destes compostos tem a ver com a sua alta toxicidade(Possari, 2003).

O plasma obtém-se através de uma descarga elétrica sobre um gás ou vapor (e.g. de peróxido de hidrogénio ou ácido peracético), que origina iões, eletrões e radicais altamente reativos. Estas espécies reagem com substâncias celulares como enzimas, fosfolípidos, ADN, ARN e outros, impedindo o metabolismo ou reprodução celular. Este método de esterilização é muito útil para materiais termossensíveis e/ou sensíveis à humidade. Não deixa nos materiais resíduos tóxicos, podendo ser considerado ecologicamente viável(McDonnel & Russel, 1999).

3.2.7. Líquidos

Outro método químico de esterilização utilizado é a esterilização com recurso a líquidos; dentro deste destacam-se os álcoois e os aldeídos. Também agentes químicos derivados de compostos fenólicos ou soluções de hipoclorito estão descritas na esterilização de polímeros, ainda que possam danificar a sua estrutura quando a exposição é demasiado longa (Agrawal et al., 2014). Contudo estes métodos através de soluções estão menos estudados no que toca a parâmetros cinéticos de cumprimento de níveis de segurança de esterilização, tornando o seu uso menos comum (Rutala & Weber, 2008).

Os álcoois, tanto o etanol (70%) como o isopropílico (92%) são compostos bactericidas rápidos, mas de baixa potência. Também têm atividade contra bacilos, fungos e vírus, mas por outro lado, não atuam contra esporos bacterianos. No que diz à sua concentração ideal, esta varia entre 60% a 90%. O mecanismo de ação do álcool varia consoante a sua concentração; contrariamente ao que se possa pensar, o álcool com maior concentração não é o que exerce maior poder de desinfeção. Quando este se encontra em concentração de

50% a 70% ele atuam dissolvendo a membrana lipídica das células o que, por sua vez, compromete a integridade da membrana, levando assim à lise celular. Por outro lado, se este se encontra em concentrações de 60 a 70%, penetra no núcleo, desnatura as proteínas através da coagulação na presença de água e inibe a produção de metabolitos fundamentais para a divisão celular (Rutland & Weber, 2008).

O grupo dos álcoois não é compatível com a esterilização de biomateriais.

No que diz respeito aos aldeídos, temos, como mais conhecidos, o formaldeído e o glutaraldeído. O primeiro composto apresenta como grande limitação o facto de ser cancerígeno. É um agente bactericida potente, fungicida, é ainda eficiente contra vírus e esporos bacterianos. Atua alcalinizando determinados grupos das proteínas e das purinas. Já, por outro lado, o glutaraldeído é mais eficaz e menos tóxico mas encontra-se inativo na presença de matéria orgânica. O seu mecanismo de ação baseia-se na alteração do ADN e RNA assim como, na síntese proteica dos microorganismos (Rutala & Weber, 2008).

3.3.Esterilização de hidrogéis

A esterilização dos hidrogéis para aplicações biomédicas é um requisito regulamentado para o seu uso seguro como biomaterial. Como anteriormente referido, a esterilização dos polímeros constitui um desafio uma vez que é necessário adoptar abordagens que sejam conservadoras para a estrutura do material, mantendo a sua integridade para o seu uso comercial e/ou médico. Existem várias técnicas possíveis para a esterilização dos materiais, como se viu anteriormente. Quando se fala em esterilização de polímeros tem-se como as duas técnicas de esterilização mais comuns, a esterilização química por óxido de etileno e a esterilização por radiação (Zourikadis, 2013). A esterilização por radiação, especificamente

radiação gama, é bastante utilizada tanto para a síntese dos hidrogéis, como também, eem simultâneo, para a sua esterilização tudo num só processo.

Os hidrogéis à base de PVA e PVP, materiais em voga para o fabrico de pensos utilizados para o tratamento de feridas são exemplos de hidrogéis que beneficiam deste método. Existem algumas formas comerciais destes hidrogéis preparadas segundo este método (Razzak, 2001). Também os hidrogéis à base de PEG podem ser preparados seguindo este método (Ajji, 2004). Para a irradiação destes materiais é usada a dose padrão de 25kGy (Razzak, 2001).

Os hidrogéis à base de quitosano, também utilizados como pensos no tratamento de feridas, têm uma dificuldade acrescida na etapa de esterilização uma vez que o material em questão é muito sensível e sofre facilmente alteração da sua estrutura e das suas propriedades. É altamente difícil encontrar um método adequado para este tipo de biomaterial natural, uma vez que os métodos tradicionais como a radiação gama, a autoclavagem e o calor seco são detrimenais para as suas propriedades intrínsecas. O único método onde os estudos mostraram resultados favoráveis foi o óxido de etileno, mas nem todos os autores estão de acordo e é importante realçar que os produtos esterilizados por este método terão que ser submetidos a uma etapa de segurança de quarentena antes do seu uso, para eliminação dos resíduos tóxicos, o que se traduz numa grande desvantagem. Assim, serão necessárias novas abordagens para encontrar um método mais fiável para a esterilização dos hidrogéis à base de quitosano (França et al., 2013; Szymanska & Winnicka 2015).

Na esterilização de hidrogéis para lentes de contacto está documentado na literatura a utilização do calor húmido com recurso a autoclave, submetendo a lente a temperaturas altas de 115 a 121°C durante 15 a 30 minutos sob uma pressão de 15 PSI. Este processo é efetuado aquando da altura de fabrico da lente pelo fabricante (Bennett & Weissman, 2015). Também existem patentes para a esterilização por radiação ionizante, mais especificamente radiação gama (Marmo, 2007).

A esterilização de ácido hialurónico, hidrogel utilizado tanto em engenharia dos tecidos como em medicina regenerativa e cosmética, pode ser conseguida através de calor húmido por autoclavagem das seringas contendo o respetivo material. Este método não mostrou ser

agressor para as propriedades viscoelásticas intrínsecas do material (Borzachiello et al., 2015).

Os implantes mamários à base de hidrogéis, fabricados utilizando CMC, podem sofrer esterilização terminal por autoclavagem sem haver impactos adversos na estrutura do polímero. Neste caso, tipicamente, a esterilização terminal envolve a autoclavagem da preparação aquosa (Burns, 2001)

Investigações feitas com os hidrogéis aplicáveis à engenharia dos tecidos, como por exemplo do ácido poliláctico, demonstram que a radiação gama é um método viável de esterilização, dado que foi provado em estudos *in vitro* que não altera a morfologia das fibras do hidrogel, nem induz efeitos citotóxicos nas linhagens celulares (Valente, 2016).

As técnicas tradicionais de esterilização dos hidrogéis, como a radiação gama, o óxido de etileno e a exposição a vapor ou mesmo ao formaldeído podem comprometer as suas propriedades físico-químicas e biocompatibilidade. Este facto levou à procura de novos métodos alternativos, como é o caso da esterilização por gás denso supercrítico de dióxido de carbono. Testado em hidrogéis de PEG, este método permitiu preservar a estrutura polimérica do material, a sua morfologia, e não afetar o conteúdo de água e as propriedades viscoelásticas. A esterilização por dióxido de carbono denso supercrítico demonstrou assim ser um método útil e seguro para a esterilização eficaz de hidrogéis para o uso biomédico (Karajanagi et al, 2011). O gás denso de dióxido de carbono oferece várias vantagens como agente de esterilização, entre elas, o facto de ser não-tóxico, não-reativo e ter uma excelente penetrabilidade e fácil remoção por despressurização, o que o torna numa escolha apropriada. A sua não reatividade permite a manutenção das propriedades mecânicas dos materiais poliméricos o que é essencial em diversas aplicações e em particular no caso dos hidrogéis usados em engenharia de tecidos, para enxertos ou scaffolds (Dai, 2016). O seu uso eficaz foi comprovado nos hidrogéis de alginato, contudo, investigações futuras deverão avaliar a sua reprodutibilidade noutros hidrogéis sensíveis como o quitosano (Bernhardt et al., 2015).

Nos hidrogéis usados como veículos para a libertação de fármacos, os estudos mostram que o método mais aceite para a esterilização é a radiação gama, que produz menos alterações nas propriedades deste tipo de hidrogel (Binstock et al., 2007).

Um outro método que tem sido investigado para a esterilização de hidrogéis é o ozono(Denvir, McKenzie, Rogers, Hitchens, & Andrews, 2000). Este composto é um potente germicida. É facilmente solúvel em água e altamente oxidativo, sendo por isso bastante atrativo como esterilizante(Cataldo, 2007). É capaz de eliminar vírus, bactérias, protozoários e fungos com alta eficiência e rapidez. Esta técnica já provou ser eficiente e compatível com diversos materiais para diferentes aplicações biomédicas, tais como aço inoxidável, titânio, alumínio anodizado, cerâmica, vidro, sílica, PVC, Teflon, silicone, polipropileno, polietileno e acrílatos(Rutland & Weber, 2008).O ozono não deixa resíduos tóxicos, originando apenas oxigênio. A sua utilização na esterilização de hidrogéis ainda está em desenvolvimento, pois a informação na literatura é muito escassa, embora bons resultados tenham sido obtidos com gelatina de origem animal³⁸.

Finalmente, uma outra estratégia usada para combater as dificuldades na esterilização terminal de hidrogéis é a esterilização dos seus precursores, por calor seco ou por filtração de soluções das matérias primas através de filtros com poros pequenos estéreis. Após este processo o produto é fabricado de uma maneira asséptica em condições estritas específicas. Contudo este método é difícil e nem sempre é conseguido (Russel et al., 1999)

3.4.Regulamentação sobre esterilização de hidrogéis para aplicações biomédicas

Sabendo que a esterilização de hidrogéis é um parâmetro chave para assegurar o seu uso médico de forma segura, tornando-o disponível para fins médicos de acordo com as normas vigentes, é necessário rever a regulamentação aplicável a este biomaterial. As etapas de esterilização têm que obedecer a certas normas e diretrizes das entidades reguladoras dos produtos biomédicos, tanto a nível nacional como também a nível internacional, que visam uniformizar o controlo de qualidade deste tipo de materiais.

Estas regulamentações garantem a esterilização eficaz dos biomateriais segundo métodos previamente aprovados, controlando assim os níveis de segurança microbiológicos

admitidos para que estes materiais possam ser introduzidos no mercado e seguidamente utilizados em diferentes aplicações biomédicas.

3.4.1. Principais entidades reguladoras

3.4.1.1. FDA

A FDA, sigla para *Food and Drug Administration* representa a entidade reguladora do medicamento nos Estados Unidos da América (EUA) responsável por assegurar que os alimentos, produtos cosméticos, suplementos dietéticos, vacinas, fármacos (humanos e veterinários) dispositivos médicos ou produtos biológicos intencionados para o uso humano sejam seguros e eficazes (FDA, 2016).

Como entidade reguladora, a FDA emite guias para a indústria ou seja, normas a serem seguidas, chamadas “*guidelines*” para processos de esterilização para dispositivos médicos ou produtos intencionados para o uso humano. Os produtos e dispositivos médicos fabricados nos EUA, têm que ser submetidos a métodos previamente validados por esta entidade reguladora de modo a serem classificados e rotulados como “esterilizados” pela indústria.

3.4.1.2. EMA

A EMA (European Medicines Agency) é a entidade responsável pela proteção e promoção da saúde pública e animal através da avaliação científica e pela regulação e monitorização da produção de medicamentos, assim como pelo desenvolvimento e controlo de qualidade dos mesmos. O trabalho é desenvolvido em cooperação com as várias entidades nacionais de cada país pertencente à União Europeia (UE).

Com o objetivo de proteção e segurança de saúde pública tanto a nível europeu como a nível mundial, contribuem para as atividades da EMA a Organização Mundial de Saúde, a

Farmacopeia Europeia, conferencias trilaterais (UE, EUA e Japão), entre outras. (EMA, 2016).

É a EMA a esta entidade que gere os novos pedidos de Autorização de Introdução no Mercado (AIM). Estes necessitam ser avaliados cientificamente pela EMA, que será vigente em toda a União Europeia, designado por um processo centralizado, de modo a facilitar todo o processo apresentado assim um único pedido de AIM (EMA, 2016).

3.4.1.3. INFARMED

O INFARMED (Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P.) é a autoridade competente do Ministério da Saúde em Portugal, que detem atribuições nos seguintes domínios: avaliação, autorização, disciplina, inspeção, controlo de produção, distribuição, comercialização e utilização de medicamentos de uso humano, homeopáticos, produtos de saúde e dispositivos médicos (INFARMED, 2016).

Sendo o INFARMED a autoridade competente que se responsabiliza pela segurança do fabrico e comercialização dos medicamentos e produtos médicos, emitem normas orientadoras denominadas Boas Práticas de Fabrico de Medicamentos de Uso Humano, que explicitam os princípios que devem ser seguidos aquando do fabrico de medicamentos, produtos e dispositivos médicos. Essas normas são tradução do “Eudralex – Volume 4 – *Good Manufacturing Practice Guidelines*”, referência relativa à produção de medicamentos e produtos médicos em vigor na União Europeia. Toda a produção e processamento (incluindo etapas de esterilização) medicamentoso e de produtos para uso médico deve estar em concordância com estes documentos.

3.4.2. Principais diretrizes/normas reguladoras

As normas reguladoras e diretrizes que condicionam a prática da esterilização em biomateriais advêm na sua maioria da Organização Internacional de Normalização – sigla ISO. Estas normas padronizam as especificações que garantem que os produtos, serviços ou processos são adequados ao seu propósito. Nomeadamente, asseguram que os produtos são

seguros, fiáveis e de boa qualidade, minimizando erros e reduzindo custos na sua produção (ISO, 2016).

Existem várias normas ISO aplicáveis aos métodos de esterilização usados nos produtos de saúde. Uma das normas gerais sobre esterilização é a ISO 14937:2009– *Sterilization of health care products* -que define os requisitos gerais para a caracterização de um agente esterilizante e o desenvolvimento, validação e controlo dos processos de esterilização aplicáveis aos dispositivos médicos. A tabela abaixo apresenta as diversas normas ISO para cada método de esterilização usado na indústria, aplicável aos biomateriais e em particular os hidrogeles. Não existem normas específicas, relativas à esterilização, para diferentes tipos de aplicações dos hidrogeles referidas nesta monografia.

Tabela 2 - Normas ISO que fazem referência aos vários tipos de *esterilização* (adaptado de ISO/TC 198, 1990)

Método de Esterilização	Norma ISO	TÍTULO
Calor Húmido	17665-1:2006	Esterilização dos produtos de cuidados de saúde-Calor húmido- Parte 1: Requisitos para o desenvolvimento, validação e controlo de rotina de um processo de esterilização para dispositivos médicos
	17665-2:2009	Esterilização dos produtos de cuidados de saúde- Calor húmido- Parte 2: Orientações sobre a aplicação da ISO 17665-1
	11138-3:2006	Esterilização dos produtos de cuidados de saúde- Indicadores biológicos- Parte 3: Indicadores biológicos para processos de esterilização por calor húmido
Calor Seco	20857:2010	Esterilização dos produtos de cuidados de saúde – Calor seco- Requisitos para o desenvolvimento, validação e controlo de rotina de um processo de esterilização para dispositivos médicos
	11138-4:2006	Esterilização dos produtos de cuidados de saúde- Indicadores biológicos- Parte 4: Indicadores biológicos para os processos de esterilização por calor seco

Radiação Ionizante	11137-1:2006	Esterilização dos produtos de cuidados de saúde – Radiação – Parte 1: Requisitos para o desenvolvimento, validação e controlo de rotina de um processo de esterilização para dispositivos médicos
	11137-2:2013	Esterilização dos produtos de cuidados de saúde- Radiação- Parte 2: Estabelecer a dose de esterilização
	11137-3:2006	Esterilização dos produtos de cuidados de saúde- Radiação- Parte 3 : Orientação sobre aspetos dosimétricos
Química	11135:2014	Esterilização dos produtos de cuidados de saúde – Óxido de etileno: Requisitos para o desenvolvimento, validação e controlo de rotina de um processo de esterilização para dispositivos médicos
	11138-2:2006	Esterilização dos produtos de cuidados de saúde – Indicadores biológicos- Parte 2: Indicadores biológicos para os processos de esterilização por óxido de etileno

4. Conclusão

Os hidrogeles são biomateriais cada vez mais em voga na área médica, servindo para várias aplicações retratadas ao longo desta dissertação, como a engenharia dos tecidos, a cirurgia plástica e reconstrutiva, o campo oftalmológico ou o tratamento de feridas. O conhecimento das suas propriedades, comportamento físico-químico e estabilidade dimensional é fulcral para a definição de potenciais aplicações nas diversas áreas biomédicas.

Dado que, na maior parte dos casos, as aplicações deste tipo de materiais envolvem o contacto direto com partes do corpo humano que são, em condições normais, estéreis, ou onde se pretende evitar a introdução de microorganismos estranhos, a esterilização dos dispositivos assume um papel crucial.

Os métodos de esterilização, quando escolhidos corretamente, deverão permitir que os dispositivos sejam usados de forma segura, do ponto de vista microbiológico, cumprindo de forma eficaz o seu propósito, isto é, a esterilização não deverá comprometer as propriedades dos materiais.

Apesar da existência métodos de esterilização, físicos e químicos, a esterilização dos hidrogeles constitui um grande desafio, uma vez que é difícil manter as propriedades destes materiais inalteradas quando submetidos a processos de esterilização.

Os métodos de esterilização mais comuns e tradicionais para os hidrogéis são a esterilização química por óxido de etileno, a esterilização por radiação gama e por calor húmido. Outros métodos têm sido desenvolvidos como alternativas para materiais sensíveis ao calor ou à radiação: por exemplo a esterilização com recurso a dióxido de carbono supercrítico ou a ozono, que provaram ser eficazes na conservação da estrutura e propriedades de diversos polímeros. A escolha dos métodos depende da natureza e características dos hidrogeles, não se podendo definir métodos *standard* para os diferentes tipos de aplicações.

Os métodos de esterilização empregues em dispositivos médicos estão sujeitos a normas emitidas por autoridades regulamentadoras nacionais e internacionais, que validam e tornam legal tanto os métodos de esterilização como a classificação da esterilidade destes produtos.

É importante que se desenvolvam mais investigações no âmbito da esterilização de produtos críticos como é o caso dos hidrogéis. A variabilidade das propriedades destes materiais, em particular da sua resistência aos diferentes agentes de esterilização, torna pertinente estudar novos métodos que sejam apropriados para a esterilização destes materiais e não afetem negativamente as suas propriedades intrínsecas. Mais importante ainda se torna, se considerarmos que a utilização destes materiais continuará em tendência crescente nos próximos anos.

A esterilização será sempre uma etapa central e indispensável na produção e distribuição dos biomateriais.

Referências Bibliográficas

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2015). *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System*: Elsevier.
- Aguilar, M. R., & Román, J. S. (2014). *Smart Polymers and their Applications*: Elsevier Science.
- Agrawal, C. M., Ong, J., Appleford, M., & Mani, G. (2014). *Introduction to biomaterials: Basic theory with engineering applications*. New York: Cambridge University Press.
- Ågren, M. S. (2016). *Wound Healing Biomaterials (Vol. 2)*. Woodhead Publishing.
- Ahmed, E. M. (2015). Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *J Adv Res*, 6(2), 105-121. doi:10.1016/j.jare.2013.07.006
- Ajji, Z., Othman, I., & Rosiak, J. M. (2005). Production of hydrogel wound dressings using gamma radiation. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 229(3–4), 375-380. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.nimb.2004.12.135
- BBC. (2014). BBC. Acesso em outubro de 2016, disponível em http://www.bbc.co.uk/schools/gcsebitesize/science/add_gateway_pre_2011/radiation/treatm entrevist2.shtml
- Bennett, E. S., & Weissman, B. A. (2015). *Clinical Contact Lens Practice*: Lippincott Williams & Wilkins.
- Bernhardt A, Wehrl M, Paul B, Hochmuth T, Schumacher M, et al. (2015). Improved Sterilization of Sensitive Biomaterials with Supercritical Carbon Dioxide at Low Temperature. *PLOS ONE* 10(6): e0129205. doi: 10.1371/journal.pone.0129205
- Block, S. S. (2000). *Disinfection, Sterilization, and Preservation*: Lippincott Williams & Wilkins.
- Borzacchiello, A., Russo, L., Malle, B. M., Schwach-Abdellaoui, K., & Ambrosio, L. (2015). Hyaluronic Acid Based Hydrogels for Regenerative Medicine Applications. *Biomed Res Int*, 2015, 12. doi:10.1155/2015/871218

- Brunner, C. A., & Groner, R. W. (2006). Carboxy-methyl-cellulose hydrogel-filled breast implants - an ideal alternative? A report of five years' experience with this device. *Can J Plast Surg*, 14(3), 151-154.
- Burns, J. W., & Miller, R. J. (2001). Low molecular weight polymeric compositions: Google Patents.
- Caló, E., & Khutoryanskiy, V. V. (2014). Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *European Polymer Journal*, 65, 252-267. doi:10.1016/j.eurpolymj.2014.11.024
- Cataldo, F. (2007). On the action of ozone on gelatin. *International Journal of Biological Macromolecules*, pp. 201-216.
- Chang, C., Peng, N., He, M., Teramoto, Y., Nishio, Y., & Zhang, L. (2013). Fabrication and properties of chitin/hydroxyapatite hybrid hydrogels as scaffold nano-materials. *Carbohydr Polym*, 91(1), 7-13. doi:10.1016/j.carbpol.2012.07.070
- Chirani, N., Yahia, L., Gritsch, L., Motta, F., Chirani, S., & Fare, S. (2015). History and Applications of Hydrogels. *Journal of Biomedical Sciences*.
- Choi, B., Loh, X. J., Tan, A., Loh, C. K., Ye, E., Joo, M. K., & Jeong, B. (2015). Introduction to In Situ Forming Hydrogels for Biomedical Applications. In X. J. Loh (Ed.), *In-Situ Gelling Polymers: For Biomedical Applications* (pp. 5-35). Singapore: Springer Singapore.
- Christensen, L. H., Breiting, V. B., Aasted, A., Jorgensen, A., & Kébuladze, I. (2003). Long-term effects of polyacrylamide hydrogel on human breast tissue. *Plast Reconstr Surg*, 111(6), 1883-1890. doi:10.1097/01.PRS.0000056873.87165.5A
- Corkhill, P. H., Hamilton, C. J., & Tighe, B. J. (1989). Synthetic hydrogels. VI. Hydrogel composites as wound dressings and implant materials. *Biomaterials*, 10(1), 3-10.
- Czaja, W. K., Young, D. J., Kawecki, M., & Brown, R. M., Jr. (2007). The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. *Biomacromolecules*, 8(1), 1-12. doi:10.1021/bm060620d

- Dai, Z., Ronholm, J., Tian, Y., Sethi, B., & Cao, X. (2016). Sterilization techniques for biodegradable scaffolds in tissue engineering applications. *J Tissue Eng*, 7, 2041731416648810. doi:10.1177/2041731416648810
- Denvir, A., McKenzie, K., Rogers, T., Hitchens, G., & Andrews, C. (2000). Apparatus and method of food decontamination by treatment with ozone. U.S. Patent.
- Dhivya, S., Padma, V. V., & Santhini, E. (2015). Wound dressings - a review. *Biomedicine (Taipei)*, 5(4), 22. doi:10.7603/s40681-015-0022-9
- Dimitriu, S. (1994). *Polymeric Biomaterials*. New York: Marcel Dekker.
- Dumbleton, K. (outubro de 2002). The physical and clinical characteristics of silicone hydrogel lenses: How they work? Ontario.
- Dumbleton, K. A., Woods, C. A., Jones, L. W., & Fonn, D. (2008). Comfort and adaptation to silicone hydrogel lenses for daily wear. *Eye Contact Lens*, 34(4), 215-223. doi:10.1097/ICL.0b013e31816499dc
- Dumville, J. C., O'Meara, S., Deshpande, S., & Speak, K. (2011). Hydrogel dressings for healing diabetic foot ulcers. *Cochrane Database Syst Rev*(9), CD009101. doi:10.1002/14651858.CD009101.pub2
- EMA. (2016). European Medicines Agency. Acesso em: outubro de 2016, disponível: <http://www.ema.europa.eu/ema/>
- Evstatiev, D. (2004). Late complications after injections of hydrogel in the breast. *Plast Reconstr Surg*, 113(6), 1878; author reply 1878-1879.
- Finnegan, S., & Percival, S. L. (2015). Clinical and Antibiofilm Efficacy of Antimicrobial Hydrogels. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 4(7), 398-406. doi:10.1089/wound.2014.0556
- FDA. (2016). U.S. Food and Drug Administration. Acesso em: outubro de 2016, disponível em About FDA: <http://www.fda.gov/AboutFDA/default.htm>

- Fraise, A., Lambert, P., & Mailard, J.-Y. (2013). Principles and Practice of Desinfection, Preservation & Sterilization (5^a ed.). Chichester, West Sussex: John Wiley&Sons
- Franca, R., Mbeh, D. A., Samani, T. D., Le Tien, C., Mateescu, M. A., Yahia, L., & Sacher, E. (2013). The effect of ethylene oxide sterilization on the surface chemistry and in vitro cytotoxicity of several kinds of chitosan. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. doi:10.1002/jbmb.32964
- French, K., & Jones, L. (2008). A decade with silicone hydrogels: Part 1. Optometry Today, 42-46.
- Gan, J., Guan, X., Zheng, J., Guo, H., Wu, K., Liang, L., & Lu, M. (2016). Biodegradable, thermoresponsive PNIPAM-based hydrogel scaffolds for the sustained release of levofloxacin. RSC Adv., 6(39), 32967-32978. doi:10.1039/c6ra03045a
- Guillon, M. (2013). Are silicone hydrogel contact lenses more comfortable than hydrogel contact lenses? Eye Contact Lens, 39(1), 86-92. doi:10.1097/ICL.0b013e31827cb99f
- Hafner, J. (1999). Management of leg ulcers. New York: Karger.
- Hartmann. (2016). Acesso em setembro de 2016, disponível em <http://pt.catalog.hartmann.info/hartmannshop/assortment/product.html?number=19214>
- Hoffman, A. S. (2002). Hydrogels for Biomedical Applications. Advance Drug Delivery Reviews , 43, pp. 3 - 12.
- INFARMED. (agosto de 2012). Acesso em setembro de 2016, disponível em (http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/PUBLICACOES/TEMATICOS/SAIBA_MAIS_SOBRE/SAIBA_MAIS_ARQUIVO/49_Implantes_Mamarios.pdf)
- ISO 14397:2009. Sterilization of health care products - General requirements for characterization of a sterilizing agent and the development, validation and routine control of a sterilization process for medical devices. (2009). Switzerland
- ISO/TC 198. Sterilization of health care products. (1990). Switzerland
- Jacob, L. M. (janeiro de 2016). Contact lenses

- Jones, V., Grey, J. E., & Harding, K. G. (2006). Wound dressings. *BMJ*, 332(7544), 777-780. doi:10.1136/bmj.332.7544.777
- Kamoun, E. A., Chen, X., Mohy Eldin, M. S., & Kenawy, E.-R. S. (2015). Crosslinked poly(vinyl alcohol) hydrogels for wound dressing applications: A review of remarkably blended polymers. *Arabian Journal of Chemistry*, 8(1), 1-14. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.07.005
- Kappel, R. M., & Pruijn, G. J. (2012). The monobloc hydrogel breast implant, experiences and ideas. *Eur J Plast Surg*, 35(3), 229-233. doi:10.1007/s00238-011-0591-0
- Karajanagi, S. S., Yoganathan, R., Mammucari, R., Park, H., Cox, J., Zeitels, S. M., . . . Foster, N. R. (2011). Application of a dense gas technique for sterilizing soft biomaterials. *Biotechnol Bioeng*, 108(7), 1716-1725. doi:10.1002/bit.23105
- Kausch, H. H., & Anjum, N. (2003). Radiation effects on polymers for biological use. Berlin: Springer.
- Kopecek, J. (2007). Hydrogel biomaterials: a smart future? *Biomaterials*, 28(34), 5185-5192. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.07.044
- Leonard, P. C. (2014). Quick & easy medical terminology. Maryland Heights, MO: Saunders Elsevier.
- Lerouge, S., & Simmons, A. (2012). Sterilisation of biomaterials and medical devices.
- Li, Y., Rodrigues, J., & Tomas, H. (2012). Injectable and biodegradable hydrogels: gelation, biodegradation and biomedical applications. *Chem Soc Rev*, 41(6), 2193-2221. doi:10.1039/c1cs15203c
- Madhally, S. V. (2010). Principles of biomedical engineering. Boston: Artech House.
- Ma, P. X., & Elisseeff, J. H. (2005). Scaffolding in tissue engineering. Boca Raton: Taylor & Francis.
- Marmo, J. C., & Browning, J. H. D. (2007). Method of sterilizing silicone hydrogel contact lenses: Google Patents.

- Mayet, N., Choonara, Y. E., Kumar, P., Tomar, L. K., Tyagi, C., Du Toit, L. C., & Pillay, V. (2014). A comprehensive review of advanced biopolymeric wound healing systems. *J Pharm Sci*, 103(8), 2211-2230. doi:10.1002/jps.24068
- McDonnell, G. E. (2007). *Antisepsis, Disinfection, and Sterilization*. Washington, USA: ASM Press.
- McDonnell, G., & Russel, A. (janeiro de 1999). Antiseptics and desinfectants: activity, action and resistance. PubMed .
- Méijome, J. M. G., González - Pérez, J., Fernandes, P. R. B., Ferreira, D. P. L., Mollá, S., & Compañ, V. (2014). Silicone Hydrogels Materials for Contact Lens Applications Concise Encyclopedia of High Performance Silicones (pp. 293-308): John Wiley & Sons, Inc.
- Moore, J. E., & Maitland, D. J. (2014). *Biomedical technology and devices*. Boca Raton: CRC Press.
- Nagaraja, Prem Anand. *Hospital Sterilization*. New Delhi, India: Jaypee Brothers Medical, 2011. Print.
- Niimi, K., & Fujishiro, M. (outubro de 2009). PubMed. Acesso em setembro de 2016
- Patrick, C. W., Mikos, A. G., & McIntire, L. V. (1998). *Frontiers in tissue engineering*. Oxford, U.K.: Pergamon.
- Paul, W., & Sharma, C. (2004). Chitosan and Alginate Wound Dressings: A Short Review. *Trends in Biomaterials & Artificial Organs*, 18(1).
- Pinto, T. d., Kaneko, T. M., & Pinto, A. F. (2015). 'Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos' (4ª ed.). São Paulo: Manole.
- Possari, J. (2003). *Desinfecção e esterilização química de artigos médico-hospitalares*. Iátria.
- Rajendran, S. (2009). *Advanced Textiles for Wound Care*: Elsevier Science.
- Nicolson, P. C., & Vogt, J. (2001). Soft contact lens polymers: an evolution. *Biomaterials*, 22(24), 3273-3283.

- Razzak, M. T., Darwis, D., Zainuddin, & Sukirno. (2001). Irradiation of polyvinyl alcohol and polyvinyl pyrrolidone blended hydrogel for wound dressing. *Radiation Physics and Chemistry*, 62(1), 107-113. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0969-806X\(01\)00427-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0969-806X(01)00427-3)
- Rohrich, R. J., Ghavami, A., & Crosby, M. A. (2007). The role of hyaluronic acid fillers (Restylane) in facial cosmetic surgery: review and technical considerations. *Plast Reconstr Surg*, 120(6 Suppl), 41S-54S. doi:10.1097/01.prs.0000248794.63898.0f
- Roy, N., Saha, N., Kitano, T., & Saha, P. (2010). Development and Characterization of Novel Medicated Hydrogels for Wound Dressing. *Soft Materials*, 8(2), 130-148. doi:10.1080/15394451003756282
- Rutala WA., & Weber DJ. (2008). Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities . Centers for Disease Control and Prevention.
- Rutland, W., & Weber. (2008). guidelines for disinfection and sterilization in healthcare facilities infections.
- Sannino, A., Demitri, C., & Madaghieri, M. (2009). Biodegradable Cellulose-based Hydrogels: Design and Applications. *Materials*, 2(2), 353-373. doi:10.3390/ma2020353
- Segre, L. (setembro de 2016). Contact Lens Basics. Acesso em setembro de 2016, disponível em Allaboutvision.Com: http://www.allaboutvision.com/contacts/contact_lenses.htm
- Shai, A., & Maibach, H. I. (2005). Wound healing and ulcers of the skin: Diagnosis and therapy: The practical approach. Berlin: Springer.
- Sherbiny, I. M., & Yacoub, M. H. (2013). Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges. *Glob Cardiol Sci Pract*, 2013(3), 316-342. doi:10.5339/gcsp.2013.38
- Sherman, M. (1998). Medical device packaging handbook. New York: Marcel Dekker.
- Shi, J., Xing, M. M., & Zhong, W. (2012). Development of hydrogels and biomimetic regulators as tissue engineering scaffolds. *Membranes (Basel)*, 2(1), 70-90. doi:10.3390/membranes2010070

- Shintani, H. (2011). Validation of sterilization procedures and usage of biological indicators in the manufacture of healthcare products. *Biocontrol Science* .
- Spiller, K. L., Maher, S. A., & Lowman, A. M. (2011). Hydrogels for the repair of articular cartilage defects. *Tissue Eng Part B Rev*, 17(4), 281-299. doi:10.1089/ten.TEB.2011.0077
- Szycher, M., & Sharma, C. P. (1991). *Blood Compatible Materials and Devices: Perspectives Towards the 21st Century*: Taylor & Francis.
- Szymanska, E., & Winnicka, K. (2015). Stability of chitosan-a challenge for pharmaceutical and biomedical applications. *Mar Drugs*, 13(4), 1819-1846. doi:10.3390/md13041819
- Thurauf, J. E. (1999). *International Archives of occupational and enviromental health*. (S. Link, Ed.) Alemanha .
- Torok, E., Moran, E., & Cooke, F. (2009). *Oxford Handbook of Infectious Diseases and Microbiology*: OUP Oxford.
- Valente, T. A., Silva, D. M., Gomes, P. S., Fernandes, M. H., Santos, J. D., & Sencadas, V. (2016). Effect of Sterilization Methods on Electrospun Poly(lactic acid) (PLA) Fiber Alignment for Biomedical Applications. *ACS Appl Mater Interfaces*, 8(5), 3241-3249. doi:10.1021/acsami.5b10869
- Van Doornmalen, J., & Kopinga, K. (2009). Temperature dependence of F-, D, and Z-values used in steam sterilization processes. *Journal of Applied Microbiology* .
- Vilela, C. A., Correia, C., Oliveira, J. M., Sousa, R. A., Espregueira-Mendes, J., & Reis, R. L. (2015). Cartilage Repair Using Hydrogels: A Critical Review of in Vivo Experimental Designs. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 1(9), 726-739. doi:10.1021/acsbiomaterials.5b00245
- Wang, X., Wang, J., Guo, L., Wang, X., Chen, H., Wang, X., . . . Wu, Y. (2016). Self-assembling peptide hydrogel scaffolds support stem cell-based hair follicle regeneration. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 12(7), 2115-2125. doi:10.1016/j.nano.2016.05.021

- Wang, Z., Li, S., Wang, L., Zhang, S., Jiang, Y., Chen, J., & Luo, D. (2012). Polyacrylamide hydrogel injection for breast augmentation: another injectable failure. *Med Sci Monit*, 18(6), CR399-408.
- Wasiak, J., Cleland, H., Campbell, F., & Spinks, A. (2013). Dressings for superficial and partial thickness burns. *Cochrane Database Syst Rev*(3), CD002106. doi:10.1002/14651858.CD002106.pub4
- Waugh, D. G., & Lawrence, J. (2014). Laser surface treatment of a polymeric biomaterial wettability characteristics and osteoblast cell response modulation. Paris: Éditions des archives contemporaines.
- Weiss, P., Fatimi, A., Guicheux, J., & Vinatier, C. (2010). Hydrogels for Cartilage Tissue Engineering. In R. M. Ottenbrite, K. Park, & T. Okano (Eds.), *Biomedical Applications of Hydrogels Handbook* (pp. 247-268). New York, NY: Springer New York.
- Xinming, L., Yingde, C., Lloyd, A. W., Mikhalovsky, S. V., Sandeman, S. R., Howel, C. A., & Liewen, L. (2008). Polymeric hydrogels for novel contact lens-based ophthalmic drug delivery systems: a review. *Cont Lens Anterior Eye*, 31(2), 57-64. doi:10.1016/j.clae.2007.09.002
- Zhao, W., Jin, X., Cong, Y., Liu, Y. and Fu, J. (2013), Degradable natural polymer hydrogels for articular cartilage tissue engineering. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 88: 327–339. doi:10.1002/jctb.3970
- Zouridakis, G., Moore, J. E., & Maitland, D. J. (2013). *Biomedical Technology and Devices*, Second Edition: CRC Press.