

CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO EM CONTROLE DA QUALIDADE DE PRODUTOS,
AMBIENTES E SERVIÇOS VINCULADOS À VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Cleuza Sodré Ribeiro

**AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS DA CITOTOXICIDADE *IN VITRO* DE
PRESERVATIVOS MASCULINOS A BASE DE LÁTEX DE BORRACHA NATURAL
ATRAVÉS DO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR**

Rio de Janeiro

2015

Cleuza Sodré Ribeiro

**AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS DA CITOTOXICIDADE *IN VITRO* DE
PRESERVATIVOS MASCULINOS A BASE DE LÁTEX DE BORRACHA NATURAL
ATRAVÉS DO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR**

Trabalho de conclusão de Curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária

Orientadora: Shirley de Mello Pereira Abrantes
Colaboradora: Mirian Noemi Pinto Vidal

Rio de Janeiro

2015

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Ribeiro, Cleuza Sodré

Avaliação dos resultados da citotoxicidade *in vitro* de preservativos masculinos a base de látex de borracha natural através do método de difusão em ágar/ Cleuza Sodré Ribeiro - Rio de Janeiro: INCQS/ FIOCRUZ, 2015.

46 f.,il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. 2015.

Orientadoras: Shirley de Mello Pereira Abrantes, Mirian Noemi Pinto Vidal

1. Preservativos masculinos. 2. Látex de Borracha Natural.
3. Citotoxicidade. 4. Vigilância Sanitária. I. Título

Cleuza Sodré Ribeiro

**AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS DA CITOTOXICIDADE *IN VITRO* DE
PRESERVATIVOS MASCULINOS A BASE DE LÁTEX DE BORRACHA NATURAL
ATRAVÉS DO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR**

Trabalho de conclusão de Curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária

Aprovado em 05 de outubro de 2015

BANCA EXAMINADORA

Joana Angélica Barbosa Ferreira (Mestre)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Janete Teixeira Duarte (Mestre)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Fábio Silvestre Bazilio (Mestre)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Shirley de Mello Pereira Abrantes (Doutora) – Orientadora
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Dedico este trabalho a minha filha Micaela por seu amor e, por apoiar minhas iniciativas pessoais e profissionais.

AGRADECIMENTOS

A Deus agradeço por ter me dado a chance de encontrar pessoas que me fizeram voltar a acreditar que nunca é tarde para estudar, e que nunca devemos desistir de nossos sonhos.

Aos meus pais pela educação.

A minha amada filha Micaela pelo estímulo e compreensão.

Aos meus amigos Ana Cláudia Trompowsky, Claudete Ribeiro, Debora Helena Vieira, Renata Calil, Taline Conde e João Veras pelo estímulo pessoal e profissional, pela força e paciência. Em especial aos amigos Izabela Gimenes e Ronald Silva que além de tudo que já mencionei, também ajudaram na correção, elaboração e execução do trabalho. Não esquecendo o meu agradecimento especialíssimo ao Arthur que está chegando, e que mesmo ainda não tendo nascido já ajudou muito na execução do trabalho.

Aos meus chefes Helena Zamith, Karen Friedrich, João Martins, Fernando Fíngola, Reginaldo Miller e Roseli Domingos pelo apoio, compreensão e paciência.

Aos colegas de trabalho Ana Lúcia Barros, Érika Gavião, Jussara Bravin, Marcos Santos, Maria Betânia e a todos que participaram direta ou indiretamente no desenvolvimento deste estudo.

Ao INCQS que permitiu e proporcionou a realização desta especialização e, principalmente aos colegas que se dispuseram a fornecer informações necessárias ao desenvolvimento deste trabalho.

Aos coordenadores, professores e pessoal de apoio do Programa de Pós-Graduação do INCQS.

As minhas orientadoras Shirley Abrantes e Mirian Vidal.

A Janete Duarte por ter acreditado em mim, pelo incentivo e por ter plantado a semente do interesse por este estudo.

Aos colegas da biblioteca do INCQS em especial ao Alexandre pela atenção e ajuda nas pesquisas e bibliografias.

Aos colegas de classe pelos momentos vividos de muito aprendizado e companheirismo.

Aos participantes da banca examinadora.

Houve um incêndio na floresta e enquanto todos os bichos corriam apavorados, um pequeno beija-flor ia do rio para o incêndio levando gotinhas de água em seu bico.

O leão, vendo aquilo, perguntou para o beija-flor: "Ô beija-flor, você acha que vai conseguir apagar o incêndio sozinho?"

E o beija-flor respondeu:

"Eu não sei se vou conseguir, mas estou fazendo a minha parte".

(Fábula utilizada por Betinho como metáfora de solidariedade)

RESUMO

A política de Saúde Pública no Brasil considera os preservativos masculinos como um método na prevenção de doenças sexualmente transmissíveis e evitar a gravidez precoce, por isso seu uso vem sendo intensamente recomendado nas campanhas publicitárias do Ministério da Saúde. Os preservativos são produzidos a partir do látex de borracha natural, que está intimamente relacionada a ocorrência de reações alérgicas. A resolução da diretoria colegiada da Agência de Vigilância Sanitária nº. 62/2008 estabelece os requisitos mínimos que os preservativos devem atender, quanto as características físicas e rotulagem, no entanto não exige parâmetros que aumentariam a segurança de uso desses artigos. Entendendo que o látex é um material muito estudado em todo mundo com aprovação de órgãos governamentais de diversos países com as mais rigorosas legislações nas áreas da Saúde e Ambiental, como, Alemanha, Estados Unidos e Grã-Bretanha, e que o controle de qualidade de produtos vinculados à Vigilância Sanitária é de relevância Nacional. E reconhecendo, também, a saúde como produção social complexa e não mera contingência biológica. O objetivo deste estudo foi avaliar os resultados de testes de citotoxicidade dos preservativos masculinos de látex de borracha natural. Trinta e sete diferentes amostras de preservativos masculinos de fabricantes nacionais e importados foram avaliados. As amostras foram testadas quanto ao grau de citotoxicidade em células de fibroblastos de camundongos da linhagem L929, utilizando método de difusão em ágar, descrito pela Farmacopeia Americana, 37ª edição. Das amostras analisadas, verificamos que 25 amostras (67,6%) apresentaram citotoxicidade branda, 11 amostras (29,7%) apresentaram citotoxicidade moderada e uma amostra (2,7%) apresentou citotoxicidade severa. Nenhuma amostra foi classificada com citotoxicidade ausente. Quando os dados foram analisados com relação ao grau de citotoxicidade das amostras sem adição de ingredientes (compostas de látex e presença de lubrificante) e com adição de ingredientes (composta de látex, presença de lubrificante, aromatizante e/ou corantes) observamos que dos preservativos sem adição de ingredientes 15% foram citotóxicos e 85% foram não citotóxicos. Das amostras com adição, 53% foram citotóxicos e 47% foram não citotóxicos. Ao comparar os resultados do grau de citotoxicidade das amostras nacionais e importadas verificamos que, das amostras nacionais 6% foram citotóxicas e 94% não citotóxicas. Das amostras importadas,

48% foram citotóxicas e 52% forma não citotóxicas. De acordo com os resultados concluímos que os preservativos masculinos comercializados no Brasil possuem citotoxicidade branda. Além disso, também concluímos que os preservativos masculinos que possuem adição de outros ingredientes (aromatizantes e/ou corantes) tendem apresentar um grau de citotoxicidade maior.

Palavras-chave: Preservativos Masculinos, Látex de Borracha Natural, Citotoxicidade, Vigilância Sanitária.

ABSTRACT

The Public Health policy in Brazil considers male condoms as a method to prevent sexually transmitted diseases and avoid early pregnancy, therefore, the use has been strongly recommended in the advertising campaigns of the Ministry of Health. The condoms are made from latex natural rubber, which is closely related to the occurrence of allergic reactions. The resolution of the executive board of the Health Surveillance Agency no. 62/2008 establishes the minimum requirements that condoms must meet, as the physical characteristics and labeling, however does not require parameters that would enhance the safety of these items. Understanding that the latex is a material very studied worldwide with approval of government agencies from different countries with the strictest legislation in the areas of the Health and of the Environment, as Germany, the United States and Great Britain, and that the quality control of products linked to the Health Surveillance is of national relevance. And also recognizes health as a complex social production and not mere biological contingency. The aim of this study was to evaluate the results of cytotoxicity assays of the male condoms of natural rubber latex. Thirty-seven different samples of male condoms of domestic and imported manufacturers were evaluated. The samples were tested for degree of cytotoxicity in L929 cell line of mouse fibroblasts, using the agar diffusion method, described by the US Pharmacopoeia, 37th edition. Of the samples analyzed, we found that 25 samples (67.6%) had mild cytotoxicity, 11 samples (29.7%) had moderate cytotoxicity and one sample (2.7%) had severe cytotoxicity. None sample was classified as absent cytotoxicity. When the data were analyzed with regard to degree of cytotoxicity of the samples without added ingredients (latex and presence of lubricant) and adding ingredients (consisting of latex, the presence of lubricant, flavoring and / or coloring) observed that condoms no added ingredients 15% were cytotoxic and 85% were not cytotoxic. Samples with addition, 53% were cytotoxic and 47% were not cytotoxic. When comparing the results of the degree of cytotoxicity of national and imported samples, we found that 6% of the national samples were cytotoxic and 94% non-cytotoxic. Of the imported samples, 48% were cytotoxic and 52% were not cytotoxic. According to the results, we concluded that male condoms sold in Brazil have mild cytotoxicity. In addition, we

also found that condoms, which have added other ingredients (flavorings and/or dyes) tend to present a higher degree of cytotoxicity.

Keywords: Male Condoms, Natural Rubber Latex, Cytotoxicity, Health Surveillance.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	a) extração do látex da <i>Hevea brasiliensis</i> e b) ilustração de caracteres morfológicos da planta.....	20
FIGURA 2	Bés, o Deus dos prazeres.....	24
FIGURA 3	Fotomicrografia da linhagem celular L929 a) baixa densidade e b) alta densidade de células.....	35
FIGURA 4	Esquema da sequência de procedimentos realizados durante o ensaio de citotoxicidade por difusão em ágar.....	36
FIGURA 5	Percentual da Classificação do grau de Citotoxicidade dos preservativos masculinos de látex de borracha natural.....	39
FIGURA 6	Percentual das amostras citotóxicas e não citotóxicas com aditivos e sem aditivos.....	41
FIGURA 7	Percentual das amostras citotóxicas e não citotóxicas nacionais e importadas.....	41

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Descrição das amostras de preservativos masculinos quanto a sua composição.....	31
TABELA 2	Graus de Citotoxicidade pelo método de difusão em ágar.....	37
TABELA 3	Resultado da classificação do grau de citotoxicidade dos preservativos masculinos de látex de borracha natural por amostra.....	38

LISTA DE SIGLAS

AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i> Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
DST	Doenças Sexualmente Transmissíveis
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i> Ácido etilenodiamino tetra-acético
EUA	<i>United States of America</i> Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> Orgão governamental dos Estados Unidos da América responsável pelo controle dos alimentos e drogas
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> Vírus da Imunodeficiência Humana
INCQS	Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e tecnologia
LBN	Látex de Borracha Natural
MEM	Meio Mínimo de Eagle
MS	Ministério da Saúde
PN-DST/AIDS	Programa Nacional de DST e AIDS
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SBAC	Sistema Brasileiro de Avaliação da Conformidade
SFB	Soro Fetal Bovino
USP	<i>United States Pharmacopeia</i> Farmacopéia Americana
VISAS	Vigilâncias Sanitárias

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	LÁTEX.....	19
1.1.1	Breve histórico.....	20
1.1.2	Processamento do látex.....	22
1.1.3	Preservativos.....	23
1.2	A UTILIZAÇÃO DE PRESERVATIVOS MASCULINOS.....	24
1.2.1	Legislação.....	26
1.3	TESTE DE CITOTOXICIDADE <i>in vitro</i> PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR.....	27
2	JUSTIFICATIVA.....	29
3	OBJETIVOS.....	30
3.1	OBJETIVOS GERAIS.....	30
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
4	METODOLOGIA.....	31
4.1	AMOSTRAS.....	31
4.2	CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR.....	34
4.2.1	Interpretação dos resultados e determinação da validade dos ensaios....	37
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
6	CONCLUSÃO.....	42
7	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	43
	REFERÊNCIAS	44

1. INTRODUÇÃO

A Vigilância Sanitária atua sobre fatores de risco associados a produtos, insumos, e serviços relacionados com a saúde, com o meio ambiente e o ambiente de trabalho (ROZENFELD, 2000). Nas últimas décadas a disseminação de ações governamentais e os mecanismos criados para proteger os direitos dos consumidores resultaram em crescentes esforços para garantir a qualidade e confiabilidade dos produtos.

O desenvolvimento de pesquisa em produtos, principalmente de uso para a proteção da saúde da população, é considerado de extrema importância quando engloba a área de Vigilância Sanitária. Dentre estes se incluem, os materiais confeccionados a partir do Látex de Borracha Natural (LBN), que podem entrar em contato com o corpo humano. Como exemplo pode citar os preservativos masculinos.

O uso de preservativos masculinos vem sendo cada vez mais divulgado em campanhas do Ministério da Saúde (MS). Essas ações fazem parte de um conjunto de medidas que têm como objetivo informar e educar a sociedade quanto aos cuidados preventivos que se devem ter no que se refere à gravidez precoce e Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST), incentivando assim a adoção de hábitos saudáveis (ANVISA, 2010).

A política de Saúde Pública do governo brasileiro, desde a metade da década de 1980, vem seguindo as mesmas preocupações mundiais advindas do aparecimento de uma nova doença, contagiosa e letal, a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e as demais doenças sexualmente transmissíveis. O Ministério da Saúde informa sobre o alcance da resposta brasileira no controle da epidemia da AIDS através Programa Nacional de DST e AIDS (PN-DST/AIDS), que foi considerado em 2003 como referência mundial por diversas agências de cooperação internacional. Desde o início da década de 90, o PN-DST/AIDS reconheceu o preservativo masculino de borracha natural como peça central da política governamental de prevenção à AIDS e às outras DSTs.

Os preservativos masculinos de uso único, feitos de LBN impermeável, são envoltórios projetados para cobrir o órgão sexual masculino, com a finalidade de impedir a passagem de fluidos do corpo humano (sêmen) durante a relação sexual,

como também auxiliar na prevenção da concepção e prevenir as DSTs, bem como, da AIDS pelo vírus da síndrome da imunodeficiência humana (HIV) (ANVISA, 2008).

A borracha natural é um produto altamente processado, derivado do citosol, ou látex, que é um líquido leitoso obtido da seringueira *Hevea brasiliensis*, da família *Euphorbiaceae*. O látex, que é atualmente a matéria-prima mais comumente utilizada na produção de produtos e artigos destinados à aplicação biomédica de uso médico-hospitalar e na prevenção contraceptiva, requer na sua manufatura a utilização de substâncias químicas na sua dispersão, como antioxidantes e aceleradores de vulcanização (PEREIRA, 2005).

Entre 1988 a 1995 foram reportados ao *Food and Drug Administration* (FDA) mais de 1.600 casos de reações alérgicas relacionadas à utilização de produtos de uso médico contendo látex natural. Estudos estatísticos indicam que cerca de 1% da população mundial e 10% dos trabalhadores da área médica são alérgicos a produtos do látex natural (POTTER, 1996). As reações ao látex ocorrem por mecanismos de hipersensibilidade do tipo I ou imediata e tipo IV ou de fase tardia. Há três tipos de manifestações clínicas e patológicas de hipersensibilidade do tipo I. Tais manifestações podem ser cutâneas, pulmonares ou sistêmicas; as quais causam patologias como: rinite, conjuntivite, urticária, asma bronquial, angioedema e anafilaxia, podendo chegar à restrição das vias respiratórias ao ponto de asfixia e produzir um colapso cardiovascular levando a óbito (ROJIDO, 1993; ABBAS et al., 1998 apud MARIN, 2002). Essas reações alérgicas como a de hipersensibilidade imediata e a de dermatite de contato irritante, se devem ao fato do látex tratar-se de um produto natural originado da sangria da seringueira, e apresentar em sua composição determinados tipos de proteínas tais como globulinas, albuminas indutoras de anticorpos e enzimas (GOTTLUBER, 2000).

A reação de dermatite de contato alérgica à borracha é causada por resíduos de produtos químicos usados na fabricação do produto de borracha. Também conhecidas como reações alérgicas do tipo IV, ou seja, reações de hipersensibilidade do tipo tardia ocasionam manifestações cutâneas como: eczema de contato (por luvas), dermatite de contato (por roupas ou preservativos) e estomatite de contato (por utensílios odontológicos), desencadeadas por substâncias químicas de baixo peso molecular. Estas substâncias químicas específicas são: o enxofre, os tiazóis, os carbamatos e os tiurans e estão frequentemente entre os aditivos da vulcanização suspeitos de serem responsáveis

pelas reações alérgicas (BERGENDORFF, 2007). Os estudos sobre a prevalência das reações alérgicas ao látex variam muito, dependendo da população estudada e dos métodos utilizados para estabelecer a sensibilidade ao antígeno (TSA et al., 2003).

Estudos recentes estão demonstrando que pacientes alérgicos ao látex desenvolvem concomitantemente sensibilização a certos alimentos de origem vegetal, especialmente frutas como: papaia, figo, banana, abacate, kiwi, pêssego, abacaxi, melão e castanha, acreditando-se numa provável ocorrência de reações cruzadas entre os alérgenos do látex e dessas frutas (MARIN, 2002). Foram descritos no Brasil, dois casos de reação alérgica após a ingestão de mandioca em pacientes previamente alérgicos ao látex da borracha natural. Os dois pacientes apresentaram reações sistêmicas, com sintomas cutâneos e respiratórios minutos a horas após exposição ao látex e também após a ingestão de mandioca. Sabe-se que a mandioca (*Manihot utilissima*), também chamada de tapioca, é um alimento importante nas regiões tropicais, sendo particularmente consumido em condições de baixa disponibilidade de nutrientes. A mesma é um alimento largamente consumido no Brasil como fonte de carboidratos, porém tem sido observado um aumento dos casos deste tipo de alergias em ambulatórios. Portanto, os resultados obtidos reforçam que a mandioca deve ser adicionada à crescente lista de alimentos que apresentam reação cruzada com o látex da borracha, fazendo-se necessário uma maior atenção dos médicos para esse problema (GALVÃO, 2010).

Os preservativos masculinos disponíveis no Brasil, tanto nacionais quanto os importados têm sua produção regida por rigorosos critérios, que abrangem aspectos que vão da qualidade do látex até as especificações para as embalagens primárias, do consumo e transporte (ANVISA, 2008; DUARTE, 2011).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), apenas o Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde (INCQS) realiza análises fiscais em preservativos masculinos para apuração de riscos ou agravos à Saúde Pública. As análises são realizadas de acordo com o relatório das denúncias encaminhadas pelas Vigilâncias Sanitárias - VISAS (ANVISA, 2003).

1.1 LÁTEX

1.1.1 Breve histórico

A borracha já era conhecida dos índios antes do descobrimento da América. Em 1525, o cronista espanhol Pietro d'Anghieria relatou ter visto os índios mexicanos jogarem com bolas elásticas. Charles de La Condamine foi o primeiro a fazer um estudo científico sobre a borracha. Em 1736, La Condamine coletou amostras de borracha da Castilla ou Castüloa no Equador, onde era chamada *caoutchouc* ou *hévé* (DEAN, 1989 apud CAMPOS, 1997). Em 1775 outro naturalista francês, Fusée Aublet, publicou uma descrição acurada de uma árvore produtora de borracha, nativa das Guianas, que batizou de *Hevea guianensis* (DEAN, 1989 apud CAMPOS, 1997).

Em meados do século XIX a cidade de Belém, perto da foz do Amazonas, atraiu a atenção das autoridades coloniais portuguesas com outro tipo de borracha, chamada "seringa". Por volta de 1839, Belém realizava um comércio ativo de sapatos feitos de "seringa". A Borracha Natural é o produto sólido obtido pela coagulação de látices de determinados vegetais, sendo o principal a *Hevea brasiliensis* (Figura 1). Essa matéria-prima vegetal, proveniente da planta conhecida vulgarmente como seringueira, é nativa da Amazônia, e genuinamente brasileira (DEAN, 1989 apud CAMPOS, 1997). No mesmo período, Charles Goodyear, ampliara muitíssimo as aplicações potenciais da borracha graças à descoberta da possibilidade dela ser estabilizada quimicamente com a mistura de enxofre em presença de calor, que é um processo conhecido sob o nome de vulcanização (BRASIL, 1993 apud CAMPOS).

A palavra borracha teve sua origem numa das primeiras aplicações úteis deste produto, dada pelos portugueses, quando foi utilizada para a fabricação de botijas, em substituição às chamadas borrachas de couro que os portugueses usavam no transporte de vinhos. Obtinham-se essa borracha a partir do látex de árvores do gênero Castilla. Colhida na selva, a borracha da Castilla, ou caucho, constituiu um modesto artigo do comércio internacional até meados do século XVIII. Por volta do século XIX, a transferência de plantas exóticas e a busca de plantas

selvagens passíveis de "domesticação" (um processo gradual e em parte acidental de seleção e hibridação) eram atividades que se tornavam racionalizadas, organizadas e postas a serviço do capitalismo industrial.

Figura 1 - a) extração do látex da *Hevea brasiliensis* e b) ilustração de caracteres morfológicos da planta.



Fonte: <http://www.humanjourney.us/1493.html>

A Europa mandava pesquisadores à procura de espécies desconhecidas que pudessem servir como matéria prima, remédio ou ornamento. Naquela época a "domesticação" das árvores produtoras de borracha foi uma grande descoberta botânica.

Em 1854, chegaram ao Jardim Botânico Real de Kew em Londres, espécimes completos de pau-seringa, quando Richard Spruce voltou de suas longas viagens pela América do Sul (DEAN, 1989 apud CAMPOS, 1997). Em 1865, Jean Mueller von Argau publicou uma monografia em Linnaea, suprimindo o nome genérico

alternativo *Siphonia* e aplicando *Hevea brasiliensis* à espécie levada de Belém por F. G. Sieber, que parecia ser da verdadeira "seringa" do comércio (DEAN, 1989 apud CAMPOS, 1997). Enfim, a árvore da borracha havia recebido uma designação científica estável e os futuros pesquisadores teriam condições de saber mais ou menos o que estavam buscando.

A borracha tornou-se o material preferido para a confecção de gaxetas para máquinas a vapor. Assim, essa matéria prima, acompanhou o ferro e o aço onde quer que se instalassem máquinas industriais, bombas de minas e ferrovias. A borracha também era essencial nas correias e tubos de máquinas e em 1874 começou a ser aplicada nos fios telegráficos. Não demorou muito para que se concebesse a ideia de "domesticar" as árvores produtoras de borracha. Os ingleses haviam contrabandeado sementes de *Hevea Brasiliensis* da Amazônia para o Jardim Botânico de Londres. Lá, por meio de enxertos, desenvolvem variedades mais resistentes, que posteriormente são enviadas para suas colônias na Ásia: Malásia, Ceilão e Cingapura – onde tem início uma exploração intensiva da borracha natural. A diferença técnica de plantio e extração do látex no Brasil e na Ásia foi determinante para os resultados da exploração como negócio. No Brasil, o governo resistia a mudar os métodos, a relativa imobilidade custou para o país que as exportações brasileiras perdessem mercado. Não suportaram a concorrência da borracha extraída na Ásia, muito mais barata. Como consequência, a produção entrou em declínio (FRANTA, 1989 apud CAMPOS, 1997).

No Extremo Oriente, as plantações de seringueira tiveram início a partir de 70.000 sementes daqui levadas por Henry Wickham e plantadas no Kew Gardens, em Londres (FRANTA, 1989 apud CAMPOS, 1997). Dessas sementes vingaram cerca de 2.000, sendo que a maioria das mudas foi transplantada no Ceilão, onde se aclimataram perfeitamente.

Com a invenção do pneumático e a expansão da indústria automobilística nos Estados Unidos, os preços do látex extraído das seringueiras da Amazônia explodiram e a produção brasileira cresceu rapidamente. Por quase cinquenta anos, da segunda metade do século XIX até a segunda década do século XX, a borracha natural sustentou um dos mais importantes ciclos de desenvolvimento do Brasil. Naquela época, a revolução industrial se expandia velozmente e o mundo vivia período histórico de prosperidade e descobertas que se refletiam em todos os setores. Interessadas na exploração dos seringais amazônicos, grandes empresas e

bancos estrangeiros instalam-se nas cidades de Belém e Manaus. A capital amazonense torna-se o centro econômico do país. Milhares de imigrantes, principalmente nordestinos fugidos da seca, invadem a floresta para recolher o látex e transformá-lo em borracha. Dadas a produção de múltiplos produtos para diferentes usos, fez com que sua demanda crescesse rapidamente a partir de 1900 e mesmo com a descoberta da borracha sintética, anos mais tarde um substituto parcial, sua demanda continuou crescendo, estimulando a expansão de seringais no Sudeste Asiático e na África (MARTIN; ARRUDA, 1993).

Em 1907, a borracha já é responsável por 23% do valor das exportações brasileiras. O recorde ocorre em 1912 quando são exportadas 42 mil toneladas de borracha. A partir de 1910, no entanto, holandeses e ingleses desenvolvem plantações planejadas e com grande produtividade na Indonésia, Ceilão e Malásia (DEAN, 1989 apud CAMPOS, 1997). Em 1919 a borracha asiática já inunda o mercado internacional, onde, das 423 mil toneladas comercializadas, apenas 34 mil toneladas são brasileiras. Consequentemente, a produção da Amazônia definha e toda a região entra em decadência (DEAN, 1989 apud CAMPOS, 1997). O Brasil com sua produção de 29,6 mil toneladas em 1991 é um produtor inexpressivo no contexto mundial, apesar de ser o país da origem da seringueira, hoje cultivada em inúmeros países, onde se viabilizou como uma atividade agrícola importante (Martin e Arruda, 1993).

Países como a Malásia, Ceilão, Sumatra e Java tornaram-se imensos campos de investimento e em 1995 a Tailândia, a Malásia, e a Indonésia tornam-se os principais produtores de borracha natural (IRSG, 1995 apud CAMPOS, 1997).

1.1.2 Processamento do látex

O LBN está contido no sistema de vasos laticíferos situados no córtex da árvore, formando um feixe helicoidal ascendente, que leva o alimento para partes superiores da árvore. Para se efetuar a extração da borracha, remove-se uma película de casca ao longo da superfície do corte, para seccionar os vasos laticíferos e permitir o escoamento do LBN para o exterior (BERNADES, 1990 apud CAMPOS, 1997). O mesmo corte é reaberto a cada extração pela retirada de mais uma

camada delgada de casca, o que propicia o novo fluxo de LBN. A inclinação do corte possibilita o escoamento do LBN até uma tigela onde será depositado (CAMPOS, 1997).

A matéria prima principal da fabricação de preservativos de maior uso é o látex poli (1,4–cis-isopreno). Pode ser encontrado na natureza em mais de 2.500 espécies de árvores, sendo a *Hevea brasiliensis* a única com importância comercial. (DUARTE, 2011).

A vulcanização pode ser definida como o processo que provoca a transformação das propriedades plásticas da borracha, para elásticas. O processo convencional, consiste da reação do enxofre com a borracha na presença de calor, enquanto que, o processo alternativo consiste na vulcanização ou reticulação do LBN induzida com radiação ionizante, que ocorre à temperatura ambiente. Ambos os processos promovem transformações nas propriedades do polímero, que concedem ao produto acabado melhores propriedades (CAMPOS, 1997).

1.1.3 Preservativos

No Brasil, durante muitos anos, somente o preservativo padrão era disponibilizado; no entanto, nos últimos anos, diferentes tamanhos estão disponíveis no mercado e a distribuição gratuita feita pelo Ministério da Saúde.

Na fabricação de preservativos, uma mistura de ingredientes (dispersão) é adicionada ao látex centrifugado para gerar o látex composto, maturado por algum tempo, tipicamente entre um e cinco dias, em condições de temperaturas controladas em torno de 30 a 60°C. Nesta etapa do processo ocorre a pré-vulcanização, cujo grau depende da tecnologia utilizada. Uma dispersão típica é constituída por:

- Enxofre coloidal 95 (como agente de vulcanização);
- Óxido de zinco (ativador da vulcanização);
- Um ou mais aceleradores;
- Um ou mais estabilizadores (tipo laurato de potássio);
- Antioxidante e pigmento, caso o produto seja colorido.

Outros aditivos podem estar dispersos, dependendo de cada fabricante (DUARTE, 2011).

1.2 A UTILIZAÇÃO DE PRESERVATIVOS MASCULINOS

A utilização de envoltório sobre o pênis é referida há séculos, com as mais variadas finalidades, entre elas a prevenção contra doenças tropicais ou picadas de insetos, representando distinção de classes ou “status”, amuletos de promoção da fertilidade, decorativo ou, simplesmente, como medida de pudor (HIMES, 1963 apud GIR et al., 1996).

O emprego destes acessórios pode ser comprovado através da arte no antigo Egito que utilizavam várias formas de protetores para o pênis, representados através de figuras de homem e até de divindade, como Bés, o Deus dos prazeres (Figura 2) (KRANZ, 1990 apud GIR et al., 1996).

Figura 2 - Bés, o Deus dos prazeres.



Fonte: <https://jonasabramelin.wordpress.com/2010/02/>.

Em 1564 surgiu o primeiro registro escrito sobre envoltório peniano no trabalho do anatomista italiano Gabriello Fallopio, intitulado *De Morbo Galico*, no qual afirmava que “um envoltório de linho sobre o pênis durante o ato sexual, impedia a disseminação de doenças, especialmente a sífilis”. Fallopio considerava o método eficaz contra a disseminação de doenças e viável podendo ser transportado

no bolso e de fácil ajuste à glânde e ao prepúcio (GREGERSEN, 1983 apud GIR et al., 1996).

Apesar de o primeiro registro escrito ser de Fallopio, não é unânime a opinião acerca da origem do termo “condom”, oficialmente atribuída ao médico inglês da corte de Charles II, monarca do Reino Unido (1660-1685), Dr. Condom (SHERRIS et al., 1983 apud GIR et al., 1996).

Etimologicamente, condom originou da palavra latina “condus” que significa receptáculo e que foi derivada, do vocábulo persa “Kendu” ou “Kondu”, que significa vaso comprido para armazenamento, feito de intestino de animal (SHERRIS et al., 1983 apud GIR et al., 1996).

Em Português, os termos correspondentes são: preservativo, no meio médico e/ou camisinha, no meio popular.

No século XVII, o condom era conhecido principalmente pelos nobres da época e pela elite francesa. O material era feito de membranas de intestino (ceco) de carneiro e eram relativamente caros (KRANZ, 1990 apud GIR et al., 1996). Seu uso se dava nos prostíbulo europeus como preventivos contra doenças sexualmente transmissíveis.

Por volta de 1840, com o processo de vulcanização da borracha, o condom deixou de ser privilégio da nobreza, sendo o custo reduzido, nos Estados Unidos e na Inglaterra (1844), facilitando o acesso à população. Posteriormente no século XVIII, a ênfase de sua utilização foi na contracepção.

Por volta de 1930, mais de 300 milhões de unidades de preservativos de látex, foram vendidas nos Estados Unidos. A introdução do preservativo no mercado americano constituiu-se em outra revolução na indústria, a exemplo da borracha (SHERRIS et al., 1983 apud GIR et al., 1996).

A partir de meados da década de 80, quando a AIDS passa a ser considerada como uma pandemia mundial, o uso da camisinha vem crescendo de forma significativa (SILVA; DELPECH, 2005).

Com a mudança do comportamento sexual devido ao advento de novos métodos contraceptivos e tratamentos terapêuticos eficazes para as infecções sexualmente transmissíveis, a preocupação em prevenir essas doenças foi reduzida (GIR et al., 1996).

Desde 1987, a qualidade dos preservativos disponíveis no Brasil tem sido bastante discutida como produtos da área de saúde, ficando na jurisdição da

Secretaria de Vigilância do Ministério da Saúde. Em alguns momentos, dependendo do órgão encarregado da realização dos testes e, das amostras e lotes selecionados, foi demonstrado que os preservativos estariam aquém dos padrões de qualidade exigidos para a segurança e eficácia em seu uso, tanto na função anticonceptiva quanto como preventiva em relação às doenças sexualmente transmissíveis (SCHIAVO, 1997).

No início da década de 90, o PN-DST/AIDS reconheceu o preservativo masculino de borracha natural como peça central da política governamental de prevenção à AIDS e às outras DST(s). A borracha natural é amplamente utilizada na fabricação de preservativos masculinos devido à combinação de suas propriedades como resistência à tração, à abrasão e ao rasgamento (SILVA; DELPECH, 2005).

Atualmente o Departamento de DST, Aids e Hepatites virais estima aproximadamente 734 mil pessoas vivendo com HIV/Aids no Brasil no ano de 2014, correspondendo a uma prevalência de 0,4% da população (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014)

1.2.1. Legislação

Os preservativos são produtos para a saúde, no regime da Vigilância Sanitária, devendo as empresas que os produzem serem registradas na Anvisa, assim como seus produtos e seguir as regras estabelecidas na Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 185/2001 e na RDC 62/2008 (ANVISA, 2001; ANVISA, 2008). A RDC 185/2001 considera a necessidade de atualizar os procedimentos para registro de produtos “correlatos”, que se equiparam aos produtos médicos para fins de aplicação desta Resolução. Nesta Resolução também estabelece que o importador do produto médico deva apresentar à Anvisa os documentos para registro, alteração, revalidação ou cancelamento de registro.

A RDC nº 62/2008, considera a necessidade de se estabelecer critérios adequados e específicos aos preservativos masculinos de forma a garantir a segurança, a eficácia e a qualidade dos mesmos para a população, e também estabelece os requisitos mínimos a serem obedecidos pelos fabricantes de

Preservativos Masculinos de LBN. Define desde a composição, embalagem e rotulagem, designando o que deve constar na mesma, como: a) nome e marca do produto; b) número do lote, data de fabricação e vencimento; c) marca de conformidade a este regulamento, quando disponível; d) origem do produto, informando o nome do fabricante; e) largura nominal em milímetros; f) número de registro junto a autoridade Sanitária; g) dizeres: “produto de uso único” e “abrir na hora do uso”; h) indicar se o preservativo é lubrificado, com espermicida ou presença de outro aditivo e i) telefone do serviço de atendimento ao consumidor. Estabelece ainda que os preservativos devam ser certificados no âmbito do Sistema Brasileiro de Avaliação da Conformidade (SBAC) com as prescrições do Regulamento Técnico indicado, antes de sua venda ou distribuição gratuita aos consumidores, em programas de prevenção de doenças, como a AIDS, organizados pelo governo (ANVISA, 2008). E ainda deve conter uma nota com os dizeres: Os espermicidas, lubrificantes, aromatizantes, corantes, material antisséptico ou pó, aplicados ao preservativo, não devem conter nem liberar substâncias em quantidades tóxicas, localmente irritantes ou de outra forma prejudiciais em condições normais de uso, não sendo estes produtos objeto desta regulamentação. A autoridade de saúde competente, ou um comprador, pode exigir que o fabricante forneça um certificado sobre a composição ou outras propriedades.

Além de cumprir os requisitos destas resoluções, os preservativos masculinos de LBN deverão ser certificados compulsoriamente conforme estabelecido pela Portaria nº 50/2002 (INMETRO, 2002), com a finalidade de atestar a segurança do produto (ANVISA, 2010).

1.3 TESTE DE CITOTOXICIDADE *IN VITRO* PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR

Os testes de citotoxicidade consistem em colocar o material a ser testado direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células e em tempo apropriado, observar as alterações celulares que este material ocasionou. As alterações celulares podem ser observadas de diferentes modos, como por exemplo, a incorporação de corantes vitais ou a inibição da formação de colônias celulares

provocadas pela ação de certas substâncias. O parâmetro mais utilizado para se testar a toxicidade de um material é a avaliação da viabilidade celular que uma cultura de células apresenta após permanecer em contato com este material. Esta viabilidade só poderá ser detectada caso seja incorporada ao meio de cultura um corante vital, que no caso do método de difusão em ágar é o corante vermelho neutro. Este corante é captado rapidamente pelas células vivas, atravessa a membrana celular fixando-se em compartimentos lisossomais, corando as células. Quando os materiais testados apresentam-se nocivos às culturas, estas entram em processo de lise ocorrendo o rompimento de sua membrana, e conseqüentemente, liberam o corante. Este processo determina ao redor e sob o material uma região com células mortas descoradas denominadas de “halo de inibição”. Deste modo é possível diferenciar as células vivas das mortas pela intensidade ou ausência de coloração que a célula apresenta ao final do ensaio (CIAPETTI et al, 1996).

O estudo *in vitro* utilizando culturas de células tem se mostrado preferencial devido à homogeneidade das amostras e à facilidade de uma padronização, pois é possível o controle de fatores tais como: pH, temperatura, pressão osmótica, tensão de CO₂ e de O₂ (FRESHNEY, 1990).

O emprego de ensaios em cultura de células de mamífero para avaliação biológica de dispositivos médicos foi inicialmente descrito em 1965 por Rosenbluth e colaboradores. Métodos adicionais foram publicados por Guess e colaboradores no mesmo ano. Northup em 1986, revendo essas e outras publicações subseqüentes enfatizou a sensibilidade e a correlação dos ensaios em culturas de células em relação aos ensaios de reatividade biológica *in vivo* para avaliação biológica de plásticos. A partir da 22ª revisão da Farmacopeia Americana, o ensaio de difusão em ágar foi introduzido como teste de reatividade biológica *in vitro* para avaliação de segurança de materiais plásticos de uso médico (ROSENBLUTH et al, 1965; GUESS et al, 1965; NORTHUP, 1986; USP, 1989).

Atualmente, a RDC nº 62, de 2008, que estabelece os requisitos mínimos a que devem atender os preservativos masculinos de LBN não preconiza testes químicos e biológicos para avaliação de segurança destes produtos. Cabe ao INCQS como unidade de referência nacional no controle de qualidade em saúde, desenvolver, adequar e/ou implantar metodologias analíticas aplicadas à verificação da qualidade de produtos.

2 JUSTIFICATIVA

Dentre todos os produtos de saúde feitos com o látex, os preservativos masculinos são aqueles em que o controle de qualidade deveria ser o mais rigoroso, em função das normas determinadas pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normatização e Qualidade Industrial (INMETRO) e pelo Ministério da Saúde (INMETRO, 2002).

Devido ao fato de que uma grande variedade de produtos de saúde vem sendo continuamente desenvolvida e uma importante incidência de não conformidade principalmente nas análises de preservativos masculinos torna-se necessária uma avaliação de sua segurança biológica, empregando ensaios *in vitro* ao invés de *in vivo* com animais de laboratório (ISO, 1992).

Os métodos *in vitro* apresentam vantagens em relação aos *in vivo* por levarem à redução no número de animais de experimentação, pela obtenção de dados significativos mais facilmente, além do período de teste ser, em muitos casos, mais curtos. Estudos empregando métodos alternativos *in vitro* em culturas de células, em substituição aos métodos *in vivo* podem ser utilizados com sucesso, pois são reprodutíveis, rápidos, sensíveis e financeiramente acessíveis.

O ensaio de citotoxicidade *in vitro* pelo método de difusão em ágar se enquadra perfeitamente na regra dos 3Rs que preconiza o Refinamento (Refinement), a Redução (Reduction) e a eventual Substituição (Replacement) de testes *in vivo* por ensaios *in vitro* em culturas de células sendo de rápida execução, alta reprodutibilidade, baixo custo, e que apresentam alta sensibilidade, reproduzindo o máximo possível as condições fisiológicas *in vivo* (VIDAL, 2010).

Deste modo, o estudo de possíveis efeitos tóxicos induzidos por esses produtos de saúde deve merecer a atenção da Vigilância Sanitária no sentido de minimizar e proibir seu uso ao máximo, caso venham a apresentar comprovadamente efeitos citotóxicos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial citotóxico em células murinas L929 pelo método de difusão em ágar, das amostras de preservativos masculinos.

3.2 Objetivos específicos

- a) Realizar ensaio de citotoxicidade em amostras de preservativos masculinos nacionais e importados;
- b) Comparar o resultado do ensaio ao efeito citotóxico das amostras sem ingredientes adicionais (composta de látex e presença de lubrificante) e com ingredientes adicionais (composta de látex, presença de lubrificante, aromatizante e/ou corante);
- c) Comparar o resultado do ensaio ao efeito citotóxico das amostras nacionais e amostras importadas.

4 METODOLOGIA

4.1 AMOSTRAS

Neste estudo foram utilizadas 37 (trinta e sete) amostras de preservativos masculinos de diferentes fabricantes e origens, dentre elas: Malásia, Brasil, Vietnã, Tailândia, Índia, Japão e Espanha. As amostras de mesma origem, não necessariamente foram fabricadas pelo mesmo fabricante.

Por questões de confidencialidade e imparcialidade, marcas, números dos lotes, nomes dos fabricantes e importadores não serão divulgadas nesse estudo. A composição, procedência, data de fabricação e validade de cada preservativo analisado está descrita na Tabela 1.

Essas amostras foram analisadas pelo ensaio biológico de citotoxicidade pelo método de difusão em ágar.

Tabela 1 - Descrição das amostras de preservativos masculinos quanto a sua composição.

Nº da amostra	Descrição da amostra	Data de Fabricação	Data de Validade	Composição	Procedência
1	Lubrificado Uva	11/2009	10/2014	Borracha natural vulcanizada. Com óleo de silicone aromatizante e sabor artificial de uva (contém sucralose)	Malásia
2	Lubrificado Ultra resistente	01/2013	12/2017	Borracha de látex natural vulcanizada. Com óleo de silicone	Malásia
3	Lubrificado Ultra sensível	08/2013	07/2018	Borracha de látex natural vulcanizada. Com óleo de silicone	Malásia
4	Aromatizado de uva	12/2013	12/2017	Borracha de látex natural com óleo de silicone aromatizante artificial de uva	Brasil

Continua

					Continuação
Nº da amostra	Descrição da amostra	Data de Fabricação	Data de Validade	Composição	Procedência
5	Aromatizado de Menta	09/2013	09/2017	Borracha de látex natural com óleo de silicone aromatizante artificial de menta	Brasil
6	Aromatizado de Morango	10/2013	10/2017	Borracha de látex natural com óleo de silicone aromatizante artificial morango	Brasil
7	Aromatizado Morango	10/2013	10/2017	Borracha de látex natural com óleo de silicone e aromatizante	Brasil
8	Aromatizado Menta	10/2013	10/2017	Borracha de látex natural com óleo de silicone aromatizante artificial de menta	Brasil
9	Aromatizado Uva	10/2013	10/2017	Borracha de látex natural com óleo de silicone aromatizante artificial de uva	Brasil
10	Lubrificado	16/06/14	16/06/17	Borracha de látex natural com silicone	Brasil
11	Premium Lubrificado	11/2009	10/2014	Borracha de látex natural com lubrificante	Vietnã
12	Lubrificado	18/12/2013	18/12/2016	Borracha de látex natural vulcanizada com enxofre.Com óleo de silicone	Brasil
13	Lubrificado	07/06/2014	07/06/2017	Borracha de látex natural com lubrificante de silicone	Brasil
14	HOT c/ lubrificante que esquenta	18/02/2014	18/02/2017	Borracha de látex natural agentes umectante	Brasil
15	Lubrificado	04/2013	03/2018	Borracha de látex natural com lubrificante	Índia

Continua

					Continuação
Nº da amostra	Descrição da amostra	Data de Fabricação	Data de Validade	Composição	Procedência
17	Lubrificado	16/06/2014	16/06/2017	Borracha de látex natural com lubrificante de silicone	Brasil
18	Lubrificado EXTRA GRANDE	02/2013	01/2018	Borracha de látex natural vulcanizada com lubrificante de silicone	Malásia
19	Fusi látex lubrificante fosforescente	05/2012	05/2015	Látex de borracha natural com óleo de silicone, luminova e corante	Japão (Tóquio)
20	Lubrificante Caipirinha	04/2014	03/2019	Borracha de látex natural vulcanizada com lubrificante de silicone aromatizante e sabor de caipirinha contém sucralose	Malásia
21	Lubrificado	10/06/2014	10/06/2017	Borracha de látex natural com lubrificante de silicone	Brasil
22	Lubrificante Sensitive	12/05/2012	12/05/2015	Borracha de látex natural com lubrificante	Brasil
23	Morango	21/04/2014	21/04/2017	Borracha de látex natural com óleo de silicone aromatizante artificial morango edulcorante	Brasil
24	Lubrificante fosforescente	-	01/2019	Látex natural e lubrificante	Tailândia
25	STRAWBERRY	-	11/2018	Látex natural e lubrificante	Tailândia
26	Lubrificado	05/2012	04/2017	Borracha de látex natural com lubrificante	Tailândia
27	Ultra resistente	-	12/2016	Látex natural e lubrificante	Tailândia
28	Banana	-	11/2018	Látex natural e lubrificante	Tailândia
29	Ultra sensível	-	03/2019	Látex natural e lubrificante	Tailândia

Continua

Continuação

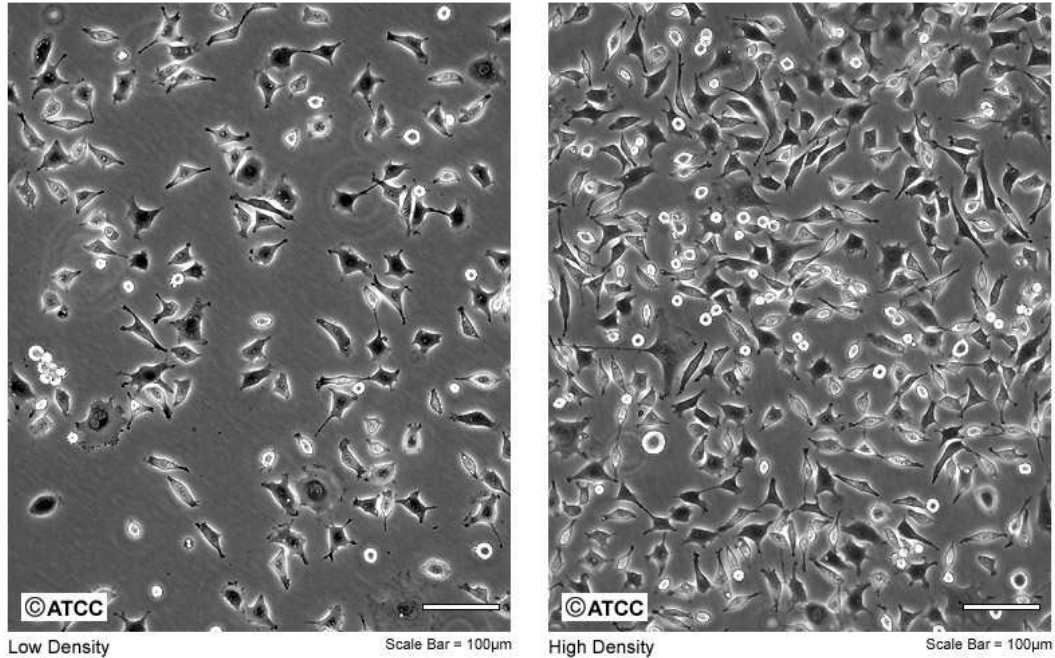
Nº da amostra	Descrição da amostra	Data de Fabricação	Data de Validade	Composição	Procedência
30	Baunilha	-	11/2018	Látex natural e lubrificante	Tailândia
31	Lubrificado Laranja	-	11/2018	Látex natural e lubrificante	Malásia
32	Lubrificado Verde	-	11/2018	Látex natural e lubrificante	Malásia
34	Lubrificado	16/06/14	16/06/17	Látex natural e lubrificante	Brasil
35	Lubrificado	10/06/14	10/06/17	Látex natural e lubrificante	Tailândia
36	Lubrificado Nonoxynol-9	-	11/2018	Borracha natural látex e lubrificante	Malásia
37	Lubrificado Nonoxynol-9 5%	10/2010	10/2015	Borracha natural látex e lubrificante contém benzocaína 4,5%	Espanha

4.2 CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR

Foi utilizada a linhagem celular L-929 proveniente do Banco de células do INCQS (Figura 3), fibroblasto de camundongo. A mesma foi cultivada em Meio Mínimo de Eagle (MEM), suplementado com 0,1 mM de aminoácidos não essenciais, 5% de Soro Fetal Bovino (SFB), com antibióticos penicilina e estreptomicina. A dispersão da monocamada celular foi efetuada utilizando uma associação de tripsina 0,20% e EDTA 0,02%. Após a dispersão, as células foram novamente suspensas em meio de cultura e distribuídas em placas de seis poços, que foram utilizadas durante a realização dos ensaios (FRESHNEY, 1990; DOYLE et al., 1994).

Figura 3 - Fotomicrografia da linhagem celular L929 a) baixa densidade e b) alta densidade de células.

ATCC Number: **CCL-1**
Designation: **NCTC clone 929**



Fonte: *American Type Culture Collection (2015).*

O esquema do ensaio é apresentado na Figura 4. Quatro mililitros das células foram distribuídos nas placas de seis poços na concentração de $1,0 \times 10^5$ céls/mL. A incubação foi realizada por 48 horas a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

No ensaio foram utilizadas as culturas que apresentaram uma camada celular uniforme e com confluência de aproximadamente 80%.

Figura 4 - Esquema da sequência de procedimentos realizados durante o ensaio de citotoxicidade por difusão em ágar.



Após este período, com a monocamada de células já formadas, o meio de cultura foi desprezado e adicionado volume de 1 mL de meio de cobertura, em cada poço da placa. Este meio é composto de partes iguais de MEM duas vezes concentrado e ágar a 1,8% contendo 0,01% de vermelho neutro, como corante vital. Na aplicação das amostras, os preservativos masculinos foram totalmente desenrolados e em seguida cortados em pedaços pequenos não maiores que áreas de aproximadamente de 0,25 cm² (0,5 cm X 0,5 cm) para o implante na camada de ágar sobre as culturas celulares mantidas em placas com 3,5 cm de diâmetro. As amostras foram posicionadas sobre a camada de ágar, antes de sua solidificação completa, sendo um quadrado de amostra por poço e cada amostra realizada em duplicata. As placas foram incubadas novamente em estufa com 5% de CO₂ a 37 °C por 24 horas (GUESS et al, 1965; USP, 1989; ISO, 1992). Como controle positivo foi utilizado fragmento de látex de torniquete Lemgruber 200 (Brasil) e como controle negativo foi utilizado uma referência de plástico *United States Pharmacopeia* - USP (EUA - Estados Unidos da América), Lote G-8, respeitando a dimensão de 0,5 cm de lado para ambos. As amostras foram avaliadas em duplicata para cada linhagem celular.

As placas foram analisadas macroscópica e microscopicamente e a citotoxicidade foi constatada pela presença de um halo claro sob ou ao redor da amostra testada. Os diâmetros destes halos, quando presentes foram cuidadosamente medidos empregando paquímetro calibrado.

4.2.1 Interpretação dos resultados e determinação da validade dos ensaios:

A validade dos ensaios foi testada a partir das respostas das células ao tratamento pelo controle negativo e pelo controle positivo. O controle negativo deverá mostrar ausência de reação citotóxica (grau 0). O controle positivo deverá mostrar uma nítida reação citotóxica (igual ou superior ao grau 3).

De acordo com a interpretação dos resultados, as amostras foram consideradas satisfatórias se nenhuma cultura exposta à amostra-teste apresentar citotoxicidade igual ou superior ao grau 2 (citotoxicidade branda). As análises da citotoxicidade foram, portanto, realizadas através da medida das áreas descoradas com o auxílio de um paquímetro digital, sensibilidade de 0,01 mm a 150 mm. Os graus de citotoxicidade foram quantificados numa escala de 0 a 4, de acordo com a classificação da Tabela 2.

Tabela 2 - Graus de citotoxicidade pelo método de difusão em ágar.

Grau	Citotoxicidade	Descrição da Zona de Citotoxicidade
0	Ausência	Ausência de descoramento ao redor ou sob a amostra.
1	Leve	Zona de descoramento limitada à área sob a amostra.
2	Branda	Tamanho da zona de descoramento a partir da amostra menor que 0,45 cm.
3	Moderada	Tamanho da zona de descoramento a partir da amostra compreendido entre 0,45 cm a 1,0 cm.
4	Severa	Tamanho da zona de descoramento a partir da amostra maior que 1,0 cm, porém não envolvendo a placa inteira.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises e a classificação das amostras dos 37 (trinta e sete) preservativos masculinos estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Resultado da classificação do grau de citotoxicidade dos preservativos masculinos de látex de borracha natural por amostra.

Amostras	Grau de Citotoxicidade	Classificação	Conclusão
1	0,39	Branda	Satisfatório
2	0,48	Moderada	Insatisfatório
3	0,27	Branda	Satisfatório
4	0,13	Branda	Satisfatório
5	0,1	Branda	Satisfatório
6	0,14	Branda	Satisfatório
7	0,16	Branda	Satisfatório
8	0,16	Branda	Satisfatório
9	0,18	Branda	Satisfatório
10	0,36	Branda	Satisfatório
11	0,16	Branda	Satisfatório
12	0,18	Branda	Satisfatório
13	0,33	Branda	Satisfatório
14	0,24	Branda	Satisfatório
15	0,31	Branda	Satisfatório
16	0,34	Branda	Satisfatório
17	0,49	Moderada	Insatisfatório
18	0,36	Branda	Satisfatório
19	1,13	Severa	Insatisfatório
20	0,54	Moderada	Insatisfatório
21	0,39	Branda	Satisfatório
22	0,28	Branda	Satisfatório
23	0,34	Branda	Satisfatório
24	0,37	Branda	Satisfatório
25	0,33	Branda	Satisfatório
26	0,35	Branda	Satisfatório
27	0,49	Moderada	Insatisfatório

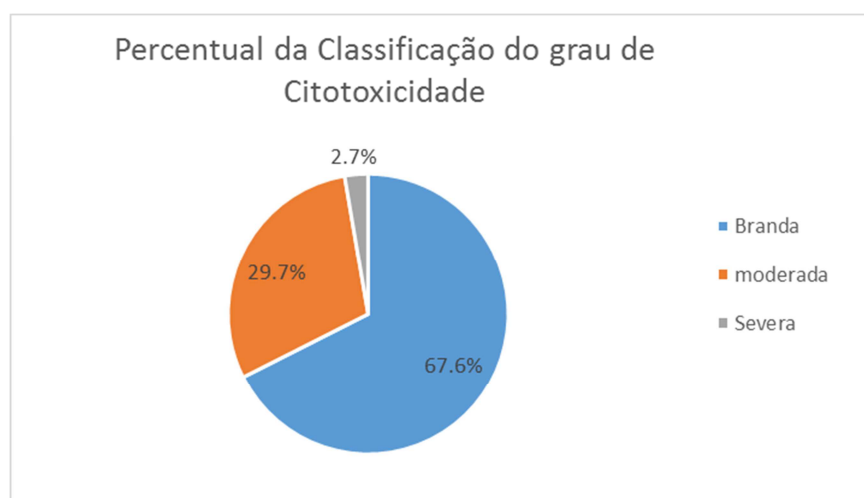
Continua

Continuação

Amostras	Grau de Citotoxicidade	Classificação	Conclusão
28	0,58	Moderada	Insatisfatório
29	0,43	Branda	Satisfatório
30	0,51	Moderada	Insatisfatório
31	0,49	Moderada	Insatisfatório
32	0,5	Moderada	Insatisfatório
33	0,54	Moderada	Insatisfatório
34	0,34	Branda	Satisfatório
35	0,3	Branda	Satisfatório
36	0,46	Moderada	Insatisfatório
37	0,45	Moderada	Insatisfatório

Do total das 37 amostras analisadas, foi verificado que 25 amostras (67,6%) apresentaram citotoxicidade de Grau 2 (Branda), 11 amostras (29,7%) apresentaram citotoxicidade de Grau 3 (Moderada) e uma amostra (2,7%) apresentou citotoxicidade de Grau 4 (Severa). Nenhuma amostra foi classificada como Grau Zero (Ausência) (Figura 5).

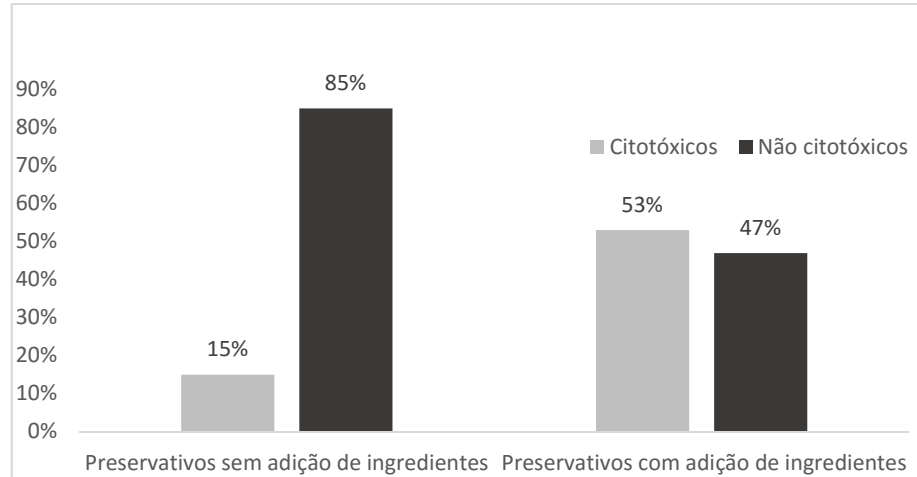
Figura 5 - Percentual da Classificação do grau de Citotoxicidade dos preservativos masculinos de látex de borracha natural.



O látex, recém-extraído, contém mais de 150 polipeptídios, dos quais 56 já foram identificados como tóxicos (NEL; GUJULUVA, 2010; apud SÁ, et al., 2010). Quando ocorre o processo de vulcanização, para produção do filme de borracha natural vulcanizada, ocorre um incremento na toxicidade, devido à adição de outras substâncias químicas. Campos e colaboradores mostraram que o método de vulcanização com radiação ionizante promove efeitos toxicológicos menores que aqueles vulcanizados pelo processo convencional com enxofre (1997). A diferença do processo de vulcanização, entre os diversos fabricantes, pode explicar as diferenças dos graus de citotoxicidade encontrados entre as marcas de preservativos masculinos testados.

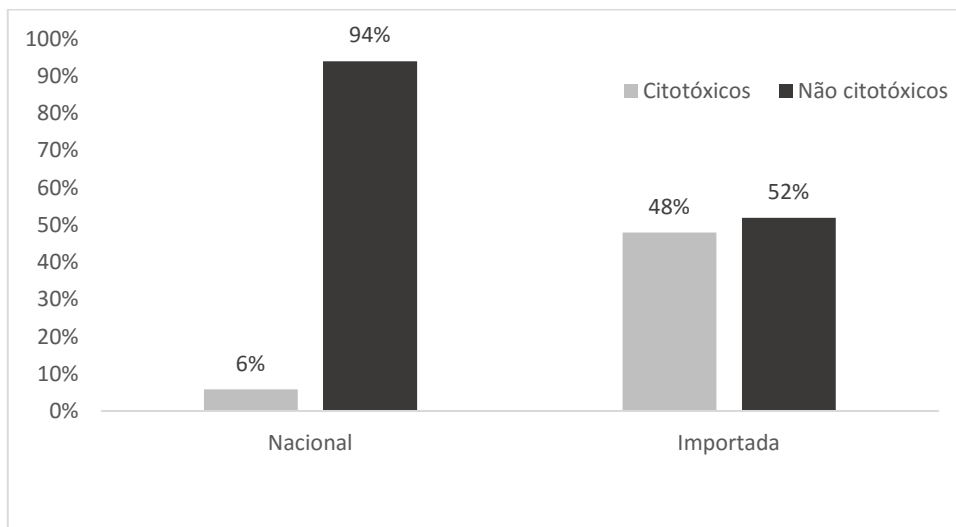
Ao comparar os resultados do grau de citotoxicidade das amostras sem adição de ingredientes (composta de látex e presença de lubrificante) e com adição de ingredientes (composta de látex, presença de lubrificante, aromatizante e/ou corante) foi observado que, dos preservativos sem adição, 15% foram citotóxicos e 85% foram não citotóxicos. Das amostras com adição, 53% foram citotóxicos e 47% foram não citotóxicos (Figura 6). Os dados demonstram que os preservativos com adição apresentaram um número maior de resultados insatisfatórios se comparados com os preservativos que não os possuem. O trabalho de MOTSOANE et al (2003) demonstrou a necessidade de analisar também o tipo e a quantidade de ingredientes adicionados, assim como determinar os resíduos dos aceleradores de vulcanização presentes, para correlacionar os resultados dos testes químicos com os achados nos testes biológicos e assim definir ações para evitar a ocorrência de agravos à Saúde.

Figura 6 - Percentual das amostras citotóxicas e não citotóxicas com adição e sem adição de corante e/ou aromatizante.



Ao comparar os resultados do grau de citotoxicidade das amostras nacionais e amostras importadas foi verificado que, das amostras nacionais 6% foram citotóxicos e 94% foram não citotóxicos. Das amostras importadas, 48% foram citotóxicos e 52% foram não citotóxicos (Figura 7).

Figura 7 - Percentual das amostras citotóxicas e não citotóxicas nacionais e importadas.



6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos nas análises realizadas nas 37 amostras, foi concluído que os preservativos masculinos comercializados no Brasil possuem citotoxicidade branda, logo são considerados satisfatórios. Além disso, também foi concluído que os preservativos masculinos que possuem adição de outros ingredientes (aromatizantes e/ou corantes) tendem a apresentar um grau de citotoxicidade maior.

A adição de outros ingredientes, como aromatizante e/ou corante, com intenção de incentivar o uso de preservativos aumentou os resultados citotóxicos. Portanto, aumentando o risco do uso desses preservativos.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Propor a inclusão dos ensaios de citotoxicidade *in vitro* pelo método de difusão em ágar na legislação sanitária de preservativos, como uma forma de melhorar a vigilância sanitária desses produtos.

REFERÊNCIAS

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consumo e Saúde. Preservativos: uma questão de segurança. **ANVISA e DPDC**. Ano 3. Nº 15, Fevereiro, 2010.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 62, de 03 de setembro de 2008. Brasília: Imprensa Nacional, 2008.

ANVISA. Relatório Técnico de dados de atualização dos LACENS: pesquisa elaborada pela Gerência Geral de Laboratórios de Saúde Pública-GGLAS. ANVISA, 14p. 2003.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 185, de 22 de outubro de 2001. Brasília: Imprensa Nacional, 2001.

BERGENDORFF, O.; PERSSON, C.; LÜDTKE, A.; HANSSON, C. Chemical changes in rubber allergens during vulcanization. **Contact Dermatitis**, Oxford, 57(3): 152-157, 2007.

CAMPOS, V. E. **Avaliação toxicológica de filmes de borracha natural obtidos do látex vulcanizado pelo processo convencional e pelo processo alternativo com radiação ionizante**. 1997. 104p. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. São Paulo. São Paulo

CIAPETTI, G.; GRANCHI, D.; VERRI, E.; SAVARINO, L.; CAVEDAGNA, D.; PIZZOFERRATO. A application of a combination of a neutral red and amino black staining for rapid, reliable cytotoxicity testing of biomaterials. **Biomaterials**.17(3): 1259-1264, Jul, 1996.

DOYLE, A.; GRIFFITHS, J.B.; NEWELL, D.G. Cell and tissue culture: laboratory procedures. New York: Chichester: John Wiley, v.1-2,s.p., 1994.

DUARTE, J. T. **Avaliação da qualidade dos preservativos masculinos comercializados no município do Rio de Janeiro: proposta de redução de unidades para realização dos ensaios em relação a RDC 62/2008**. 2011. 99p. Dissertação (Mestrado) – INCQS/FIOCRUZ. Rio de Janeiro. Brasil.

FRESHNEY, R.I. Biology of the cultured cell. **A manual of basic technique**, 2ª ed. New York: Wisley-Liss, p. 347, 1990.

GALVÃO, E. S; IWAI, L. K; ANDRADE, M. E. B; YANG, A. C.; KALIL, J; CASTRO, M. Anafilaxia após ingestão de mandioca em pacientes com alergia ao látex: relato de 2 casos. **Revista Brasileira Alerg. Imunopatol**. Vol.33. Nº2, 2010.

GIR, E.; DUARTE, G.; CARVALHO, M. J. "Condom": sexo e sexualidade. **Medicina**, Ribeirão Preto, 29: 309-314, abr./set. 1996.

GOTTLUBER, P.; HELMUT, G.; RALF, P. Allergic Contact Dermatitis from Natural látex. **American Journal of Contact Dermatitis**, Hamilton, 12(3):135-138, 2000.

GUESS, W.L. et al. Agar diffusion method for toxicity screening of plastics on cultured cells monolayers. **J. Pharm. Sci.**, v.54, p. 1545-1547, 1965.

INMETRO. Portaria INMETRO / MDIC número 50 de 28 de março de 2002. Brasília: **Imprensa Nacional**. 2002.

ISO. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 10993-5: International standard biological evaluation of medical devices – Part 5: **Tests for cytotoxicity *in vitro* methods**, 1992.

MARIN, F. A.; PERES, S. P. B. A.; ZULIANI, A. Alergia látex-fruta. **Revista Nutr.**, Campinas, 15(1):95-103, jan/abr, 2002.

MARTIN, N. B.; ARRUDA, S. T. A. A produção brasileira de borracha natural: situação atual e perspectivas futuras. **Informações Econômicas**, São Paulo, SP, v. 23, n. 9, p. 9-51, 1993.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim epidemiológico HIV-AIDS. Ano III, n.01. Brasília, 2014.

MOTSOANE, N. A; BESTER, M. J; PRETORIUS, E; BECKER, P. J. An *in vitro* study of biological safety of condoms and their additives. **Human & Experimental Toxicology**, v. 22, p. 659-664, 2003.

NORTHUP, S.J. Mammalian cell culture models. In: VON RECUM, A.F., ed. **Handbook of Biomaterials Evaluation**. New York: Mac,ilian. 1986.

PEREIRA, K.R.O. Plantio de Seringueira e produção de latex. In: Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas. São Paulo, 2005. Disponível em: <http://www.publier.com.br/respostas_tecnicas/O1agricultura.pdf> Acesso em: 14/04/2005.

POTTER, P.C. Látex Allergy. A major dilemma for health providers. **Occup. Health Sa**, v.2, p.12-15, 1996

ROSENBLUTH, S. A. et al. Tissue culture methods for screening toxicity of plastic materials to be used in medical practice. **J. Pharm. Sci.**, v.54, p.156-159, 1965.

ROZENFELD, S. (org). Fundamentos da Vigilância Sanitária. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 304p. 2000.

SÁ, A. B; MALLOZI, M. C; SOLÉ, D. Alergia ao látex: atualização. **Rev. Bras. Alerg. Imunopatol.**, v. 33, p. 173 – 183, 2010.

SCHIAVO, M. R. Preservativo masculino: hoje mais necessário do que nunca! Brasília: **Ministério da Saúde**. 95p. 1997.

SILVA, J. D; C. B. K; DELPECH, M. C. Perfil de degradação térmica oxidativa de Preservativos masculinos à base de borracha natural provenientes de diferentes países. **8º Congresso Brasileiro de polímeros**, Águas de Lindóia, São Paulo. 2005.

TSA, J. B. A; MALITO, M; LINDE, H; BRITO, M.E.M. Alergia ao látex. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, vol.53, Nº1, Janeiro-Feveiro, 2003.

USP. Subcommittee on in vitro toxicity. Application of the Concept of Biological Reactivity to Compedial Tests. **Pharmacopeial Forum**, v.15(1), p.4804-4811, 1989.

VIDAL, M.N.P.; MIRANDA, A.C. Toxicidade de Biomateriais um alerta aos serviços de saúde. **Revista Analytica**, São Paulo, v.45, 2010.