

Avaliação da citotoxicidade de luvas de procedimentos

Cytotoxic Evaluation of Procedure Gloves

Recebido em 16/09/2008
Aprovado em 16/12/2008

Matheus Melo Pithon^I
Ana Carolina Dias Viana de Andrade^{II}
Rogério Lacerda dos Santos^I
Fernanda Otaviano Martins^{III}
Maria Teresa Villela Romanos^{IV}

RESUMO

Objetivo: avaliar a citotoxicidade de luvas de procedimento. **Materiais e métodos:** foram avaliados seis diferentes tipos de luvas de procedimento divididos em oito grupos assim denominados: 1 (Embramac), 2 (Descarpack), 3 (Lemgruber), 4 (Satari), 5 (Dermaplus), 6 (Supermax). Utilizou-se 3 grupos controle: positivo (C+) detergente celular Tween 80, negativo (C-) PBS, e controle de célula (CC) onde as células não foram expostas a nenhum material. Após confecção dos corpos de prova, os mesmos foram imersos em meio mínimo essencial Eagle (MEM) por 24 hrs. Passado esse período procedeu-se a remoção do sobrenadante e colocação em contato com os fibroblastos L929. Após contato com o meio, as células foram incubadas por mais 15, 30 e 60 minutos, onde então foram adicionados 100ml do corante vermelho neutro a 0,01%. Uma vez coradas, as mesmas foram fixadas com formolaldeído e então realizada contagem de células viáveis em espectrofotômetro. Os valores da quantidade de células viáveis, foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para determinar se havia diferenças estatísticas entre os grupos, e posteriormente ao teste de Tukey ($p < 0.05$). **Resultados:** no tempo de 15 minutos o grupo 4 foi o que demonstrou maior quantidade de células viáveis. Com 30 minutos e 1 hora de contato todos os grupos demonstraram alta toxicidade celular quando comparado aos C- e CC. **Conclusões:** todas as luvas foram citotóxicas nos tempos avaliados. A toxicidade aumentou com o tempo de contato com as células.

Descritores: Luvas Cirúrgicas. Toxicologia. Toxicidade. Técnicas de Cultura de Células.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the cytotoxicity of procedure gloves. **Materials and Methods:** Six different types of procedure gloves were divided into the following eight groups: 1 (Embramac), 2 (Descarpack), 3 (Lemgruber), 4 (Satar), 5 (Dermaplus) and 6 (Supermax). Three control groups were used: positive (C+) cell detergent Tween 80, negative (C-) PBS, and control of cell (CC), where the cells were not exposed to any material. After the test bodies had been prepared, they were immersed in Eagle minimum essential medium (MEM) for 24 hrs. Next, supernatant was removed and placed in contact with the fibroblasts L929. After contact with the medium, the cells were incubated for another 15 minutes, followed by another 30 minutes and

^IEspecialista em Ortodontia pela Universidade Federal de Alfenas - Unifal; Mestre em Ortodontia pela Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ; Doutorando em Ortodontia pela Universidades Federal do Rio de Janeiro-UFRJ.

^{II}Médica graduada pela Escola Baiana de Medicina e Saúde Pública-EBMSP;

^{III}Microbióloga graduada pela Universidade Federal do Rio de Janeiro; Estagiária do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes - UFRJ.

^{IV}Doutora em Ciências (Microbiologia) pela Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ; Professora Adjunta da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ.

again, by a further 60 minutes, when 100 ml of neutral red dye at 0.01% was added. Once stained, they were fixed with formaldehyde and then, the counting of viable cells was performed in a spectrophotometer. The values of the quantity of viable cells were submitted to variance analysis (ANOVA) to determine whether there were any statistical differences between the groups, and afterwards, to the Tukey test ($p < 0.05$). Results: After 15 minutes, group 4 showed the greatest quantity of viable cells. After 30 minutes and one hour of contact, all groups showed a high cellular toxicity when compared to the C-and CC. Conclusions: All the gloves were cytotoxic at the times of evaluation. The toxicity increased as the time of contact with the cells increased.

Keywords: Gloves, Surgical. Toxicology. Toxicity. Cell Culture Techniques.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento e a introdução de novos processos ou produtos nos locais de trabalho têm exercido influência na relação entre riscos e desenvolvimento de saúde ou doença. No ambiente hospitalar, as doenças ocupacionais como a asma, rinite e dermatoses são consideradas decorrentes da exposição a estas fontes de alérgenos¹.

As doenças alérgicas cutâneas ou respiratórias têm sido consideradas como um dos principais problemas ocupacionais entre os trabalhadores da área da saúde¹⁻⁴, onde a principal fonte de exposição alergênica tem sido o uso de luvas de látex com pó^{5,6} e a sensibilidade causada pela presença de proteínas hidrossolúveis⁷. Até o final da década de 80, o uso de luvas de látex era considerado inócuo, mas, atualmente, vem-se revelando como sensibilizador alérgico importante, principalmente no ambiente hospitalar^{8,9}.

Atualmente, o uso de luvas é indispensável nas práticas de cuidados à saúde e tem importância fundamental na diminuição do risco de exposição ocupacional por contato aos patógenos transmitidos pelo sangue e fluidos corporais, por conferir proteção de barreira. As luvas de látex, tanto cirúrgicas como de procedimentos, têm demonstrado eficiência na prevenção da transmissão de doenças infecciosas nos trabalhadores da área da saúde. Desta forma são indispensáveis para o trabalho diário, devendo oferecer conforto, barreira e propriedades táteis⁵.

Nessa linha de pensamento tenta-se responder uma pergunta. Existe diferença quanto a alergenidade e toxicidade das luvas de procedimento disponíveis no mercado brasileiro? Baseado nessa dúvida o presente trabalho se propôs a avaliar a citotoxicidade de diferentes tipos de luvas de procedimento de látex.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cultura de células

A linhagem celular utilizada foi L929 (fibroblasto de camundongo) obtido do American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, EUA) cultivada em meio mínimo essencial de Eagle (MEM) (Cultilab, Campinas, São Paulo, Brazil) suplementado com 2 mM de L-glutamina (Sigma, St. Louis, Missouri, USA), 50 mg/ml de gentamicina (Schering Plough, Kenilworth, New Jersey, USA), 2,5 mg/ml de fungizona (Bristol-Myers-Squibb, New York, USA), 0,25ml solução de bicarbonato de sódio (Merck, Darmstadt, Germany), 10 mM of HEPES (Sigma, St. Louis, Missouri, USA), e 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, São Paulo, Brasil). As células foram mantidas à temperatura de 37 °C em ambiente contendo 5% de CO₂.

Luvas avaliadas

A amostra foi composta por 6 diferentes tipos de luvas como descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Grupos avaliados com seus respectivos fabricantes e lotes de fabricação.

| Grupos | Marca | Fabricante, Cidade, Estado | Lote |
|--------|------------|-----------------------------|-----------------|
| 1 | Embramac | (Embramac, Campinas, SP) | 811120 |
| 2 | Descarpack | (Top Glove, Malásia) | PA 54 |
| 3 | Lemgruber | (Targa, Cariacica, ES) | 12088008000 |
| 4 | Satari | (Fênix, Piracicaba, SP) | 072008 93990238 |
| 5 | Dermaplus | (Bioservice, São Paulo, SP) | 3483 |
| 6 | Supermax | (Supermax, Curitiba, PR) | 18338072 |

CORPOS DE PROVA

Para confecção dos corpos de prova utilizou-se uma matriz metálica que serviu para recorte dos fragmentos das luvas a serem testadas. A matriz propiciou cortes em forma de quadrado com 20 mm de cada lado.

Controles

Para verificar resposta celular frente aos extremos, outros três grupos foram avaliados. Grupo CC (controle de célula) onde as células não foram expostas a nenhum material, grupo C+ (controle positivo) detergente Tween 80 (Polioxietileno-20-Sorbitan), C- (controle negativo) solução de PBS (Phosphate-buffered saline).

Ensaio de citotoxicidade dos materiais

Os materiais foram esterilizados previamente por exposição à luz U.V. (Labconco, Kansas, Missouri, USA) durante 1 hora. Em seguida, três amostras de cada material foram colocadas em placas de 24 poços contendo MEM (Cultilab). A cada 24h o meio de cultura foi substituído por meio novo e os sobrenadantes coletados após 15, 30 minutos e 1 hora, e avaliados quanto à toxicidade para as células L929. Os sobrenadantes foram colocados, em triplicata, em uma placa de 96 poços contendo monocamada confluenta de L929 e incubados por 24 horas à 37 °C em ambiente contendo 5% de CO₂. Terminado o tempo de incubação, o efeito na viabilidade celular foi determinado através da técnica "dye-uptake", descrita por Neyndorff et al¹⁰ (1990), com pequenas modificações. Após 24 horas de incubação, foram adicionados 100ml de vermelho neutro a 0,01% (Sigma,

St. Louis, Missouri, USA), em meio de cultura, em cada poço das microplacas e estas foram incubadas a 37°C por 3 horas para penetração do corante nas células vivas. Passado esse período, após desprezar o corante, foram adicionados 100ml de solução de formaldeído (Reagen) a 4% em PBS (NaCl 130 mM; KCl 2 mM; Na₂HPO₄ 2H₂O 6 mM; K₂HPO₄ 1mM, pH7,2) por 5 minutos, para promover a fixação das células às placas. Em seguida, para a extração do corante, foram adicionados 100ml de uma solução de ácido acético (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) a 1% com metanol (Reagen, Rio de Janeiro, Brasil) a 50%. Após 20 minutos a leitura foi realizada em espectrofotômetro (BioTek, Winooski, Vermont, USA) em um comprimento de onda de 492nm ($\lambda = 492 \text{ nm}$).

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa SPSS 13.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, EUA). Análise estatística descritiva incluindo média e desvio padrão foram calculados para os grupos avaliados. Os valores da quantidade de células viáveis, foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para determinar se havia diferenças estatísticas entre os grupos, e posteriormente ao teste de Tukey. O intervalo de confiança foi de 95% ($p < 0.05$).

RESULTADOS

Os resultados obtidos quanto à citotoxicidade das luvas avaliadas estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Média, desvio padrão e análise estatística dos grupos avaliados.

| | 15" | | 30" | | 60 " | |
|-------|----------------|--------------|----------------|--------------|----------------|--------------|
| Grupo | Média (DP) | Estatística* | Média (DP) | Estatística* | Média (DP) | Estatística* |
| 1 | 211 (48,19) | AD | 203,4 (36,58) | AC | 133,66 (38,44) | A |
| 2 | 209,6 (24,43) | AD | 198,11 (40,83) | AC | 149,44 (59,17) | AB |
| 3 | 194 (63,0) | AD | 211,5 (35,0) | AC | 130,8 (33,6) | A |
| 4 | 365,66 (151,0) | B | 211,11 (70,69) | AC | 133,6 (42,47) | A |
| 5 | 164 (14,3) | D | 156,4 (23,4) | C | 143,44 (28,7) | AB |
| 6 | 259,3 (46,3) | A | 251,3 (51,6) | A | 213,11 (33,85) | AB |
| C+ | 247 (35,18) | AD | 233,2 (26,09) | A | 231,6 (24,62) | B |
| C- | 447 (35,18) | BC | 365,4 (28,46) | B | 322,33 (95,23) | C |
| CC | 485,66 (5,5) | C | 381,3 (38,08) | B | 387,3 (106,71) | C |

M. Cel: valores médios da quantidade de células viáveis;

DP: Desvio padrão;

***: Estatística, onde letras iguais representam ausência de diferenças estatísticas**

DISCUSSÃO

A utilização dos diversos tipos de materiais para a realização do tratamento odontológico, podem provocar diferentes reações biológicas aos tecidos bucais, por causa das diferenças na composição¹¹. Dessa forma os avanços da biotecnologia, definem a necessidade da investigação da biocompatibilidade, ou seja, a coexistência desses materiais manufaturados com tecidos corporais e fluidos, que permanecem no organismo, por períodos de tempo variados sem irritar os tecidos moles¹². Dentre esses materiais cita-se em especial as luvas de procedimento, que podem atuar como irritante tanto ao profissional que as usa quanto ao paciente durante a execução dos procedimentos.

Partindo dessa premissa o presente artigo se propôs a avaliar a citotoxicidade de luvas de procedimento em cultura de células.

Importante salientar que com o controle cada vez mais rigoroso em relação ao uso de animais de laboratório, há a necessidade de se utilizar testes in vitro que possam detectar a toxicidade de dispositivos para uso em seres humanos, principalmente aqueles de aplicação clínica.

A utilização de cultura de células vem sendo utilizada como parte de uma série de testes recomendados para avaliar o comportamento biológico dos materiais a serem colocados em contato com tecidos humanos¹³⁻¹⁵. No presente trabalho utilizou-

se linhagem de célula L929 (fibroblastos de camundongos), bastante utilizada em trabalhos onde pretende-se avaliar a citotoxicidade de materiais de uso odontológico¹⁶⁻¹⁹.

O método utilizado para avaliação da viabilidade celular foi com a utilização do vermelho neutro. O procedimento de análise do vermelho neutro é um ensaio de sobrevivência/viabilidade celular, baseado na capacidade das células viáveis de incorporar e combinar o vermelho neutro dentro dos lisossomos. Normalmente, é realizado em células aderentes. O vermelho neutro é um corante catiônico fraco, que penetra na membrana celular e se acumula intracelularmente nos lisossomos (pH lisossômico < pH citoplasmático), onde se combina com a parte aniônica da matriz lisossômica²⁰. As mudanças da superfície celular ou da membrana lisossômica sensível levam à fragilidade lisossômica e outras mudanças que se tornam gradativamente irreversíveis. Tais alterações ocorridas pela ação de xenobióticos resultam na diminuição da absorção e combinação do vermelho neutro. Assim, é possível distinguir células viáveis, danificadas ou mortas, o que é base do ensaio. A quantidade de corante incorporado às células é medida por espectrometria, e é diretamente proporcional ao número de células com membrana intacta.

Esse método foi utilizado primeiramente por Pithon et al.²¹, para avaliação da citotoxicidade de materiais de uso odontológico. Ainda nesse trabalho,

os autores ainda compararam esse método com o método de difusão de ágar, os resultados demonstraram que ambos métodos são confiáveis para avaliação citotóxica.

O tempo escolhido para avaliação da citotoxicidade das luvas no presente, baseou-se no tempo médio em que os procedimentos odontológicos duram, ou seja, 15, 30 e 60 minutos.

Os resultados demonstraram que no período de 15 minutos apenas o grupo 4 apresentou maior quantidade de células viáveis, sendo portanto similar estatisticamente ao grupo controle negativo (C-) ($P > 0.05$).

Tal resultado pode ser justificado por diferenças na manufatura dessas luvas uma vez que todas são produzidas a partir de látex.

Na avaliação com 30 minutos a citotoxicidade dos materiais aumentaram. O grupo 4 que com 15 minutos não apresentou toxicidade, começou a ser mais tóxico. A avaliação com 30 minutos demonstrou diferenças estatística entre todos os grupos experimentais com os grupos C- e CC. Similaridade estatística foi vista apenas entre os grupos experimentais com o grupo C+, grupo esse com comprovada citotoxicidade.

Passado 1 hora de exposição, a citotoxicidade aumentou substancialmente ao ponto de os valores de células viáveis dos grupos experimentais serem menores que o grupo C+. Vale lembrar que o grupo C+ foi inserido ao trabalho para avaliar a reação das células frente a um agressor conhecido, ou seja que lesasse realmente as células. O material utilizado para tal foi o Tween, que é um surfactante não-iônico, tóxico para as membranas biológicas²², constituído por ésteres de ácidos graxos de polioxietileno sorbitol, que tem como características estimular a secreção de proteínas em microrganismos²³, além de alterar a morfologia e a superfície da parede celular²⁴.

Da mesma forma que o grupo C+ foi utilizado para verificar a reação das células em situação de

extrema toxicidade, o grupo C- foi inserido para verificar a reação a uma situação de ausência por completo de toxicidade. Para tal utilizou-se solução de PBS (Phosphate-buffered saline), reconhecidamente não tóxica as células.

Quando da utilização desses tipos de materiais o profissional deve ficar atento a qualquer manifestação alérgica que por ventura venha acontecer, materiais com menor toxicidade devem ser priorizados.

Diante dos resultados observados, deve-se considerar que o sucesso na clínica odontológica não envolve somente o domínio da técnica, mas também requer a aplicação das normas de biossegurança e a preocupação com as conseqüências locais e sistêmicas dos materiais utilizados para tal.

CONCLUSÕES

Pode-se concluir com a realização desse trabalho que:

- todas as luvas testadas são citotóxicas;
- a toxicidade aumenta com passar do tempo de contato.

REFERÊNCIAS

1. Bernstein DI. Allergic reactions to workplace allergens. *JAMA*. 1997;278:1907-13.
2. Turjanmaa K, Alenius H, Makinen-Kiljunen S, Reunala T, Palosuo T. Natural rubber latex allergy. *Allergy*. 1996;51:593-602.
3. Turjanmaa K, Palosuo T, Alenius H, Leynadier F, Autegarden JE, Andre C, Sicard H, Hrabina M, Tran TX. Latex allergy diagnosis: in vivo and in vitro standardization of a natural rubber latex extract. *Allergy*. 1997;52(1):41-50.
4. Baur X, Czuppon AB. Allergic reaction after eating alpha-amylase (Asp o 2)-containing bread. A case report. *Allergy*. 1995;50:85-7.
5. Sussman GL, Beezhold DH. Allergy to latex rubber. *Ann Intern Med*. 1995;122:43-6.
6. Liss GM, Sussman GL, Deal K, Brown S, Cividino M, Siu S, et al. Latex allergy: epidemiological study of 1351 hospital workers. *Occup Environ Med*.

7. Woods JA, Edlich RF. Latex allergy epidemic: crisis management or proactive decision making? *Acad Emerg Med.* 1997;4:79-80.

8. Wrangsjö K, Meding B. Occupational dermatitis--what's new? Hospital workers. *Clin Dermatol.* 1997;15:573-8.

9. Lundberg M, Wrangsjö K, Eriksson-Widblom K, Johansson SG. Reduction of latex-allergen content in Swedish medical catheter balloons--a survey of 3 years' production. *Allergy.* 1997;52:1057-62.

10. Neyndorff HC, Bartel DL, Tufaro F, Levy JG. Development of a model to demonstrate photosensitizer-mediated viral inactivation in blood. *Transfusion.* 1990;30:485-90.

11. Matta ENR, Calasans-Maia JA, Ruellas ACO, Wigg MD. Cytotoxicity Evaluation in vitro of Orthodontic Elastic Showing Superficial Treatment. *J Bras Ortodon Ortop Facial.* 2004;9:587-93.

12. Wigg MD, Menezes LM, Quintão CCA, Moreira TC, Chevitaress O. Extra buccal orthodontic elastic: cytotoxicity evaluation. *Ortodontia Gaucha.* 1997;1:151-7.

13. Estrela C. Metodologia científica: ensino e pesquisa em odontologia. São Paulo: Artes Médicas; 2005.

14. Jorge JH, Giampaolo ET, Pavarina AC. Cytotoxicity of the dental materials. A literature review. *Rev Odontol UNESP.* 2004;33:65-8.

15. Santos RL, Pithon MM, Oliveira MV, Mendes GS, Romanos MTV, Ruellas ACO. Cytotoxicity of introral orthodontic elastics. *Braz J Oral Sci.* 2008;7:1520-25.

16. Alcaide M, Serrano MC, Pagani R, Sanchez-Salcedo S, Nieto A, Vallet-Regi M, et al. L929 fibroblast and Saos-2 osteoblast response to hydroxyapatite-betaTCP/agarose biomaterial. *J Biomed Mater Res A.* 2009 May;89(2):539-49.

17. Donadio M, Jiang J, Safavi KE, Zhu Q. Cytotoxicity evaluation of Activ GP and Resilon cones in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*

2008;106:e76-9.

18. Feizzadeh B, Afshari JT, Rakhshandeh H, Rahimi A, Brook A, Doosti H. Cytotoxic effect of saffron stigma aqueous extract on human transitional cell carcinoma and mouse fibroblast. *Urol J.* 2008;5:161-7.

19. Jin CY, Zhu BS, Wang XF, Lu QH. Cytotoxicity of titanium dioxide nanoparticles in mouse fibroblast cells. *Chem Res Toxicol.* 2008;21:1871-7.

20. Griffon G, Marchal C, Merlin JL, Marchal S, Parache RM, Bey P. Radiosensitivity of multicellular tumour spheroids obtained from human ovarian cancers. *Eur J Cancer.* 1995;31A:85-91.

21. Pithon MM, Santos RL, Ruellas ACO, Fidalgo TK, Romanos MTV, Mendes GS. Citotoxicidade in vitro de elásticos ortodônticos: comparação entre duas metodologias. *Rev Saúde Com.* 2008;4:19-26.

22. Rege BD, Kao JP, Polli JE. Effects of nonionic surfactants on membrane transporters in Caco-2 cell monolayers. *Eur J Pharm Sci.* 2002;16:237-46.

23. Stutzenberger FJ. Interference of the detergent Tween 80 in protein assays. *Anal Biochem.* 1992;207:249-54.

24. Domingues FC, Queiroz JA, Cabral JM, Fonseca LP. The influence of culture conditions on mycelial structure and cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30. *Enzyme Microb Technol.* 2000;26:394-401.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Matheus Melo Pithon

Av. Otávio Santos, 395, sala 705, Centro Odontomédico Dr. Altamirando da Costa Lima, Bairro Recreio, CEP 45020-750 – Vitória da Conquista – Bahia

Tel.: (0xx77) 3084-2020 / 8805-2750

matheuspithon@bol.com.br