

Estudo da toxicidade *in vivo* e *in vitro* em produtos de papel para fins sanitários e sua avaliação microbiológica

Study the toxicity *in vivo* and *in vitro* in papers with sanitary purposes and microbiological quality assessment

RIALA6/1309

Lígia Luriko MIYAMARU^{1*}, Maria Cristina SANTA BÁRBARA¹, Adriana BUGNO², Adriana Aparecida Buzzo ALMODOVAR², Tatiana Caldas PEREIRA², Áurea Silveira CRUZ³, Tamiko Ichikawa IKEDA³, Rezolina Pereira dos SANTOS³

Endereço para correspondência: ¹Núcleo de Ensaios Físicos e Químicos em Cosméticos e Saneantes, Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes, Instituto Adolfo Lutz. *e-mail: lmiyamaru@ial.sp.gov.br

²Núcleo de Ensaios Biológicos e de Segurança, Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes, Instituto Adolfo Lutz

³Núcleo de Culturas de Células, Centro de Procedimentos Interdisciplinares, Instituto Adolfo Lutz

Aceito para publicação: 19.02.2010 - Recebido: 13.08.2010

RESUMO

Os papéis para fins sanitários são produtos absorventes compostos de fibras naturais, destinados à fabricação de papel higiênico, lenços, toalhas, guardanapos e lençóis hospitalares. Foram analisados 65 produtos de diferentes marcas de papéis comercializadas em São Paulo para avaliar a toxicidade dérmica utilizando-se ensaios *in vivo* e *in vitro* e a qualidade microbiológica. Foram utilizados ensaios recomendados pelas Normas ABNT NBR 15134-30/09/2004, Portaria 1480-31/12/1990 e Farmacopeia Americana. O ensaio *in vivo* foi realizado utilizando-se técnicas de Draize, Magnusson e Kligman; para o teste *in vitro* pela difusão em ágar foram empregadas as linhagens celulares NCTC clone 929 (ATCC-CCL1). Os produtos apresentaram resultados satisfatórios nos ensaios *in vivo* e *in vitro*. A qualidade microbiológica foi satisfatória em 49 (75,4%) amostras, porém em 16 (24,6%) amostras os resultados foram insatisfatórios pela presença de bactérias mesófilas aeróbias e de *Clostridium spp.* A técnica de citotoxicidade *in vitro* poderá ser utilizada como teste de triagem e como ensaio alternativo em substituição aos ensaios *in vivo*. Apesar da análise microbiológica não constar nas normas vigentes, o seu uso torna-se relevante para avaliar as condições higiênico-sanitárias e atender às normas de Boas Práticas de Fabricação e Controle.

Palavras chave. papel sanitário, análise microbiológica, toxicidade *in vitro/in vivo*.

ABSTRACT

Papers manufactured for sanitary purposes are absorbing products, composed by natural fibers, and used to produce hygienic paper, handkerchiefs, towels, napkins, and hospital sheets. Sixty-five products from different manufacturers and marketed in São Paulo, Brazil were investigated by *in vivo* and *in vitro* dermal toxicity assays and microbiological quality analysis. The assays were performed following ABNT NBR 15134 Regulation and Ministerial Decree 1480. *In vivo* assay was carried out by Draize and Magnusson and Kligman techniques, and *in vitro* testing was performed by agar diffusion NCTC cell strains clone 929 (ATCC-CCL1). Microbiological analysis was performed according to Ministerial Decree 1480. The analyzed products showed satisfactory results on both *in vivo* and *in vitro* assays. Forty-nine (75.4%) samples showed satisfactory microbiological quality, but unsatisfactory in 16 (24.6%) samples due to the occurrence of aerobic mesophilic bacteria and *Clostridium spp.* *In vitro* cytotoxicity assay could be used as screening test, and as an alternative test for replacing the animal-using methodologies. The microbiological analysis is not included in the pertinent guidelines, but the use of analytical marker is crucial for assessing the sanitary-hygienic conditions and also to act in compliance with Good Manufacturing and Control Practices.

Key words. papers for sanitary purposes, microbiological analysis, *in vivo* and *in vitro* toxicity.

INTRODUÇÃO

Papéis são formados por fibras celulósicas entrelaçadas e a madeira é a principal matéria-prima em seu processo de obtenção. As diferentes propriedades químicas e físico-mecânicas relacionadas às matérias-primas, reagentes químicos e processos mecânicos empregados em sua produção permitem inúmeras aplicações do papel, tornando-o um dos materiais contemporâneos mais versáteis, com emprego na escrita e impressão, embalagem e para fins sanitários¹. Quando usados nesta última finalidade, são produtos absorventes, encrespados, coloridos ou não, fabricados a partir de fibras naturais, virgens e/ou recicladas, que resultam em papel higiênico, lenços, toalhas, guardanapos e lençóis hospitalares de papel².

Atualmente, o Brasil é considerado o sétimo maior produtor mundial no segmento de celulose³ e o décimo segundo maior produtor de papel, fabricando 6,5 milhões de toneladas, que correspondem a 2,2% do total. Esta produção concentra-se na região sul e sudeste, sendo que a fabricação de papéis sanitários está centralizada em São Paulo e Santa Catarina, que juntos detêm 68% da oferta ao mercado consumidor. As indústrias, também visando à redução de custos, têm utilizado fibras recicladas, que correspondem a 50% do volume usado durante a fabricação de papéis sanitários, cartões e papéis de embalagem³.

A qualidade do produto final depende da madeira e das condições de processo de fabricação. No seguimento de papéis não refinados ou fracamente refinados, destacam-se os produtos de papel higiênico, papel toalha, guardanapos, lenços, entre outros. Os atributos de qualidade estão relacionados com a sensação de maciez, absorção e retenção de líquido. Na sua fabricação, são utilizadas matérias-primas que resultam em papéis de baixa densidade e alto volume específico com potencial de absorver e reter grande quantidade de líquido⁴.

Mesmo atendendo a todos estes atributos, a questão da qualidade ainda não está esclarecida, pois muitas causas de dermatites de contato na região perianal estão relacionadas com o uso dos papéis higiênicos. As manifestações clínicas variam de um simples eritema até fissuras e hemorróidas às quais podem associar-se *Candida albicans* e outros fungos⁵.

No Brasil, os papéis para fins sanitários são dispensados de registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), sendo que o controle fica sob a responsabilidade do fabricante, importador ou distribuidor, os quais, desde 2004, devem seguir a Norma ABNT NBR 15134². Nela encontram-se definidos os ensaios utilizados na avaliação da qualidade de papéis para fins sanitários e estes ensaios devem estar em

conformidade com a Portaria 1480/90 do Ministério da Saúde⁶.

Assim, com o objetivo de contribuir no controle da saúde da população, realizou-se um estudo para avaliar a qualidade dos produtos de papéis para fins sanitários comercializados na cidade de São Paulo. Este estudo visou analisar a carga microbiana, a sensibilização cutânea e a toxicidade cutânea, tanto por métodos *in vitro* como *in vivo*.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Foram avaliados 65 produtos de papéis para fins sanitários de diferentes marcas e finalidades, sendo: 27 amostras de papel higiênico, 28 de papel toalha, 03 de guardanapo e 07 de lençol hospitalar.

Todas as amostras foram submetidas à avaliação dérmica primária e cumulativa, à sensibilização cutânea, à citotoxicidade *in vitro* e à análise microbiológica.

Avaliação da toxicidade *in vitro* em culturas de células

Foi realizada pelo método de difusão em ágar, utilizando a linhagem celular NCTC clone 929 (ATCC-CCL1) de tecido conjuntivo de camundongo. A linhagem celular foi semeada em placas de Petri (60 x 15mm), na concentração de $3,0 \times 10^5$ células/ mL de meio mínimo de Eagle (MEM) com 10% de soro fetal bovino (SBF) sem antibióticos e incubadas a 37 °C por 48 horas, em estufa com ambiente de 5% de CO₂. Após a formação da monocamada celular, o meio líquido foi descartado e adicionado volume de 5mL do meio sólido composto de partes iguais de MEM (duas vezes concentrado) e ágar (Bacto-Difco) a 1,8 % com 0,01 % de vermelho neutro, como corante vital^{6,7}.

Fragmentos de aproximadamente 0,5 cm² de cada amostra foram posicionados sobre a camada de ágar, antes de sua completa solidificação, e as placas, novamente incubadas. Todas as amostras foram analisadas em triplicatas e, como controle negativo e positivo, foram utilizados respectivamente disco de papel de filtro atóxico e fragmentos de látex com as mesmas dimensões das amostras.

Após 24 horas, as leituras das placas foram feitas macroscopicamente e microscopicamente, observando-se a presença do halo claro ao redor do material tóxico correspondente às células mortas, que não incorporaram o corante vital. Quando presente, a extensão dos halos resultantes do efeito citotóxico foi cuidadosamente medida, usando paquímetro. A média da medida dos halos obtidos em cada amostra foi calculada e o valor classificado em índices de zona (IZ), de acordo com a Farmacopeia Americana⁸.

Avaliação da toxicidade *in vivo*

Ensaio de irritação dérmica primária e cumulativa

Foram realizados conforme o Método de Draize^{2,6,9,10} e OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*)¹¹, utilizando três coelhos albinos da raça Nova Zelândia com pesos entre 2,0 e 2,5 Kg, sendo que a amostra foi colocada em contato na região dorsal depilada de cada animal. A avaliação da irritação dérmica primária foi feita com uma única aplicação da amostra e a leitura de eritema e edema, após 24 horas. Na irritação dérmica cumulativa, foram efetuadas 10 aplicações consecutivas, sendo a leitura de eritema e edema realizada após 24 horas da última aplicação. Com estes valores foram calculados os índices de irritação.

Ensaio de sensibilização cutânea

Foi realizado pelo método Modificado de Magnusson e Kligmam. Foram feitas aplicações tópicas da menor dose não irritante por um período de três semanas, juntamente com aplicações subcutâneas de adjuvante completo de Freund, para exacerbar a resposta imune. Após um período de repouso, realizou-se outra aplicação tópica da maior dose não irritante. As reações foram graduadas segundo escala onde a ausência de reação macroscópica em todos os animais avaliados demonstra sensibilização cutânea negativa^{10,12,13}. Qualquer alteração observada na pele foi considerada como resultado positivo para este ensaio.

Avaliação microbiológica

Foi realizada considerando os parâmetros definidos pela Norma ABNT NBR 15134/2004²: enumeração de bactérias aeróbias mesófilas e de bolores e leveduras, pesquisa de *Staphylococcus aureus*, de *Pseudomonas aeruginosa*, de *Escherichia coli* e de *Clostridium* spp. ou clostrídio sulfito-reductor – realizadas conforme as metodologias analíticas descritas na Portaria 1480/1990⁶ – além da pesquisa de *Salmonella* spp. e de *Candida albicans* realizada de acordo com as metodologias analíticas descritas em compêndios oficiais¹⁴.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em todos os produtos avaliados verificaram-se índices de irritação dérmica primária e cumulativa iguais à zero, assim como não foram observadas reações de sensibilização cutânea. Com relação à avaliação da toxicidade *in vitro*, não foi observada morte ou alguma alteração celular que sugerisse efeito tóxico, sendo que todas as células estavam com a morfologia íntegra e apresentavam coloração vermelha devido à presença do corante vital.

Os resultados da avaliação toxicológica indicam que os produtos avaliados e disponíveis no mercado de São Paulo não causam irritação. Ainda, demonstram que a análise de toxicidade pode ser feita preferencialmente pelo método *in vitro* diminuindo ou eliminando o uso de animais em ensaios de irritação dérmica primária e cumulativa, além de ir ao encontro das questões colocadas pela Sociedade Protetora dos Animais.

Com relação à avaliação microbiológica, das 16 amostras analisadas (24,6%), 81,2% apresentaram resultados insatisfatórios devido à presença de população bacteriana acima do limite máximo permitido de 1000 UFC/g. Foi evidenciada a presença de clostrídios sulfito redutores somente em 6,2% das amostras e a presença de população bacteriana acima do limite máximo, aliada à de clostrídios sulfito redutores em 12,5% destas amostras. Considerando o tipo de papel avaliado, estes resultados insatisfatórios foram verificados em papéis toalha, lençóis hospitalares e papéis higiênicos (Figura 1).

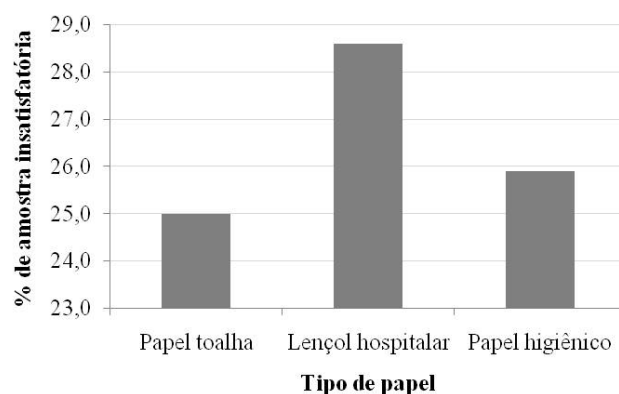


Figura 1. Distribuição das amostras insatisfatórias na avaliação microbiológica em função do tipo de papel

Em complementação às análises microbiológicas definidas pela Norma ABNT NBR 15134/2004², verificou-se a presença de outros micro-organismos (Figura 2) em amostras de papel higiênico, papel toalha, lençol hospitalar e guardanapos. Considerando o tipo de papel, além da presença de cocos Gram (+) em todas as amostras analisadas, verificou-se a presença de *Citrobacter* spp em 66,7% das amostras de guardanapos; em amostras de papel higiênico, verificou-se a presença de bactérias esporuladas (22,2%), *Citrobacter* spp (11,1%), complexo *Burkholderia cepacea* (5%) e de *Providencia* spp (3,7%) e *Klebsiella* spp (3,7%); em amostras de papel toalha, evidenciou-se a presença de bactérias esporuladas (21,4%), *Citrobacter* spp (14,3%) e *Enterobacter* spp (3,6%); e em amostras de lençol hospitalar, foram evidenciadas bactérias esporuladas (14,3%) e complexo *Burkholderia cepacea* (14,3%).

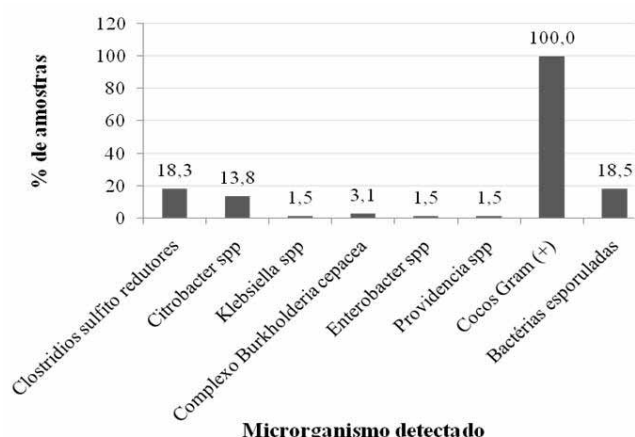


Figura 2. Distribuição das amostras insatisfatórias na avaliação microbiológica em função do tipo de micro-organismo

Os micro-organismos isolados nas amostras podem estar associados às principais fontes de contaminação microbiológica durante o processo produtivo, como ambiente, equipamentos, pessoal e matéria-prima. De um modo geral, estes micro-organismos estão relacionados às infecções em indivíduos com defesa comprometida, como por exemplo, infecções do aparelho urinário relacionadas a *Klebsiella* spp, *Providencia* spp e cocos ou infecções da pele associadas à presença de *Klebsiella* spp e *Providencia* spp.

Embora a norma ABNT NBR 15134/2004² tenha indicado a necessidade da avaliação microbiológica em produtos de papéis para fins sanitários, sua nova edição em 2007 não os contempla; entretanto, considerando os resultados obtidos neste estudo e a ampla utilização em ambiente doméstico, institucional e hospitalar, verificamos a necessidade de nova revisão da referida norma, com o objetivo de garantir a qualidade e a segurança de uso de tais produtos.

CONCLUSÃO

Este estudo indica a possibilidade de utilizar testes de citotoxicidade *in vitro* como triagem na avaliação da qualidade da toxicidade de produtos de papéis para fins sanitários, sendo uma técnica rápida, de baixo custo e alta sensibilidade, que possibilita minimizar a utilização de animais de laboratório para os ensaios *in vivo*.

Embora o estudo tenha indicado que todos os produtos avaliados não causem irritação, verificou-se que 24,6% deles não cumpriram com requisitos microbiológicos mínimos estabelecidos em edição anterior da norma específica, o que indica a necessidade de nova revisão desta norma,

considerando a importância da avaliação microbiológica destes produtos para a garantia da qualidade e da segurança de uso, além de permitir verificar o cumprimento dos requisitos de Boas Práticas de Fabricação e Controle.

REFERÊNCIAS

1. Santos CP, Reis IM, Moreira JEB, Brasileiro LB. Papel como se fabrica? *Rev Quim Nova Esc*. 2001;14. Disponível em: [http://www.dqo.iqm.unicamp.br/disciplinas/pos-graduação/qp-322/artigo.pdf].
2. Associação Brasileira de Normas Técnicas [ABNT] NBR-15134. Papel e produto de papel para fins sanitários. Método de ensaio. Rio de Janeiro, 2004.
3. Mattos RLG, Valença ACV. A reestruturação do setor de papel e celulose. *BNDES Setorial*. 1999;10:253-68. Disponível em: [http://www.bndes.gov.br/conhecimento/bnset/sete 1006.pdf].
4. Mokfienski A, Gomide JL, Colodette JL, Oliveira C. Importância da densidade e do teor de carboidratos totais da madeira de eucalipto no desempenho da linha de fibra. Disponível em: [http://www.celuloseonline.com.br/imagembank/Docs/DocBank/dc/dc099.pdf].
5. Rodrigues-Acar M, Carmona MN, Montañó AJ, Alarcón HH. Patologías más frecuentes del área perianal. *Rev Cent Dermatol Pascua*. 2000; 9 (2):86-95.
6. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 1480, de 31 de dezembro de 1990. Aprova o Regulamento Técnico para o controle de produtos absorventes higiênicos descartáveis, de uso externo e intra-vaginal. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 07 jan.1991. Seção 1, p.295-301.
7. International Organization For Standardization [BSEN ISO] 10993-05. Biological evaluation of medical devices tests for in vitro cytotoxicity. Geneva, 1992.
8. United States Pharmacopeia. 28 ed. Rockville. United States Pharmacopeial Convention, 2005. p.2268-9.
9. American Society for Testing and Materials [ASTM], F719. Standard practice for testing biomaterials in rabbits for primary skin irritation. Philadelphia: ASTM, 1996.
10. International Organization for Standardization [BS EM ISO] 10993-10. Biological evaluation of medical devices tests for irritation and sensitization. Geneva, 1996.
11. Organisation for Economic Co-operation and Development of Chemicals revised guideline 404. Acute Dermal Irritation/Corrosion, 2002.
12. Magnusson B, Kligman. A. Allergic contact dermatitis in the guinea pig. Thomas CC, Springfield IL, 1970.
13. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. [ANVISA]. Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos, 2003.
14. Bacteriological Analytical Manual Online, 2001. Disponível em: [http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-4.html].