

# Estudo comparativo entre os métodos *in vivo* e *in vitro* na análise toxicológica de produtos de higiene descartáveis e sua avaliação microbiológica

## Comparative study between *in vivo* and *in vitro* toxicological methods and microbiological quality assessment in disposable hygienic products

RIALA6/1075

Lígia L. MIYAMARU\*, Maria C. SANTA BÁRBARA, Áurea S. CRUZ, Tamiko I.IKEDA, Harumi SAKUMA, Odair ZENEON.

\*Endereço para correspondência: Instituto Adolfo Lutz Av. Dr. Arnaldo, 355 CEP.01246-902 - São Paulo – SP. Seção de Cosméticos e Produtos de Higiene-Divisão de Bromatologia e Química.

\*\* Este trabalho ganhou o 3º lugar do Prêmio VNU/Assoc. Brasileira de Cosmetologia.

Recebido: 10/03/2006 – Aceito para publicação: 30/08/2006

### RESUMO

Os objetivos deste trabalho foram comparar os métodos *in vivo* e *in vitro* na avaliação da toxicidade dérmica e estimar a qualidade microbiológica de 60 amostras de produtos de higiene descartáveis comercializados na cidade de São Paulo. Nos testes de toxicidade *in vivo* foram utilizados o “Método de Draize” e o “Método Modificado por Magnusson e Kligman” e nos testes *in vitro* o Método de “difusão em agar”, empregando as linhagens celulares, NCTC clone 929 (ATCC- CCL1) e SIRC (ATCC-CCL-60). A análise microbiológica foi realizada de acordo com o “Bacteriological Analytical Manual On Line”, 2001. Os produtos analisados não apresentaram irritação dérmica primária, cumulativa e sensibilização cutânea, mas nos testes *in vitro*, foi observada em 18 amostras toxicidade leve à severa, com índice de zona (IZ) variando de 2,0 - 4,0 nas duas linhagens celulares testadas. A análise microbiológica apresentou número elevado de bactérias aeróbias mesófilas, resultados positivos para bolores, presença de *Enterobacter sp*, *Enterobacter agglomerans* e *Enterobacter cloacae*. De acordo com os resultados obtidos e para garantir a segurança da saúde do usuário recomenda-se que, além dos testes já mencionados pela legislação vigente, seja também preconizado teste de citotoxicidade *in vitro*, para os produtos de uso interno e externo. A realização prévia deste teste pode se constituir em mecanismo de triagem.

**Palavras Chave.** dermatite das fraldas, citotoxicidade, eritema, qualidade microbiológica.

### ABSTRACT

The purpose of this study was to compare both *in vivo* and *in vitro* methods evaluating toxicity and microbiological quality of 60 disposable hygienic products samples commercialized in the city of São Paulo. For *in vivo* toxicity testing, both “Draize”, and modified Magnusson-Kligman Method” were carried out, and “agar diffusion” was used for *in vitro* testing, employing NCTC clone 929 (ATCC-CCL1) and SIRC (ATCC-CCL-60) cell lines. Microbiological analysis was performed according to “Bacteriological Analytical Manual On Line”, 2001. The analyzed products neither caused primary skin rash, nor cumulative dermal rash, nor cutaneous sensitization, though on *in vitro* test, slight to severe toxicities were observed in 18 samples on both cell lines, with zone index (ZI) of 2.0 – 4.0. Microbiological analysis revealed high number of mesophilic aerobic microorganisms counting, positive results for molds, and presence of *Enterobacter sp*, *Enterobacter agglomerans* and *Enterobacter cloacae*. Based on the observed data in order to guarantee the consumer - health safety it should be stated the use of *in vitro* cytotoxicity test for both products of internal and external use, in addition to the tests referred by effective Brazilian laws. The preceding accomplishment of this test might be established as screening test.

**Key Words.** diaper dermatitis, cytotoxicity, eritema, microbiological quality.

## INTRODUÇÃO

Com o desenvolvimento tecnológico na área industrial, os produtos descartáveis para higiene pessoal adquiriram ampla aceitação pelo mercado consumidor. Entre estes produtos, os mais utilizados são fraldas descartáveis infantis e geriátricas, absorventes femininos de uso externo e interno, absorventes de leite materno, algodão hidrófilo e lenços umedecidos. Essa classe de produtos está dispensada de registro junto à ANVISA do Ministério da Saúde, porém sujeita ao regime de Vigilância Sanitária, sendo que o fabricante, importador ou distribuidor são responsáveis pelo seu controle.

A legislação brasileira<sup>1</sup> da Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária exige somente os testes de irritação dérmica primária, cumulativa, sensibilização cutânea e análise microbiológica para os produtos acabados de uso externo e interno, e para as matérias primas de produtos de uso interno incluem também o teste de citotoxicidade *in vitro*. A avaliação *in vitro* vem apresentando crescente importância nos testes para detecção da toxicidade de biomateriais que entram em contato direto ou indiretamente com o ser humano, sendo que as culturas celulares indicam maior sensibilidade, reprodutibilidade, rapidez e menor custo em relação aos testes em animais<sup>2,3</sup>.

Como estes produtos podem gerar problemas de saúde pública, foi realizado um estudo para avaliar a sua qualidade sanitária. Além dos testes preconizados pela legislação vigente, foi incluído o teste de citotoxicidade *in vitro* para os produtos acabados de uso externo e interno, em razão dos frequentes relatos na literatura<sup>2</sup>, de dermatites em crianças e adultos, irritação ocasionada pelo “látex” das fraldas e de outros componentes utilizados no processo de fabricação.

A dermatite, popularmente, chamada de assadura, *stricto sensu* é ocasionada por contato com um irritante primário na região da fralda, afetando mais de 50% dos infantes entre o sétimo e décimo segundo mês de vida. Habitualmente, manifesta-se com quadro de leve intensidade como uma erupção eritematosa típica podendo também se apresentar de forma atípica, mais grave e com elementos eruptivos de outras dermatoses. A dermatite de “Jacquet” é uma forma clínica incomum e grave da dermatite de fralda<sup>4</sup>. Na maioria das vezes, este quadro dermatológico é decorrente da ação irritante do material constituinte da fralda combinada com a dos materiais biológicos (urina, suor, fezes e de outras secreções), também conhecida como dermatite amoniacal<sup>5,6,7</sup>. Uma vez instalada, a possibilidade de invasão local por germes existentes normalmente na pele ou veiculados pelos detritos aumenta consideravelmente, podendo um eritema ser transformado numa lesão mais grave, infectada por leveduras ou bactérias<sup>8</sup>. O fator isolado mais importante da dermatite de fraldas é a produção de amônia a partir da uréia, por atividade de certas bactérias. O pH da urina, após decomposição por bactérias urease-positivas, torna-se fortemente alcalino e irritante para a superfície cutânea que é normalmente ácida<sup>5,6,8,9</sup>. A fricção e

a maceração são fatores predisponentes freqüentemente necessários para o desenvolvimento dessa afecção. As fezes são consideradas o elemento principal envolvido na gênese da doença, em que as enzimas lipolíticas e proteolíticas fecais agem como fatores desencadeantes<sup>5,6,9</sup>.

Os objetivos deste trabalho foram comparar os métodos referentes aos testes de irritação dérmica primária e citotoxicidade para viabilizar a substituição do método *in vivo* pelo *in vitro*, possibilitando a diminuição do uso de animais em testes laboratoriais. Assim como avaliar a qualidade sanitária dos produtos higiênicos descartáveis disponíveis no comércio na cidade de São Paulo, quanto à qualidade microbiológica.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foram analisadas 60 amostras de produtos de higiene, de diversas marcas, tais como fraldas descartáveis, absorventes higiênicos femininos de uso externo e interno, absorventes de leite materno, algodão hidrófilo e lenços umedecidos.

As avaliações *in vivo* foram feitas pelos ensaios de irritação dérmica primária e cumulativa, utilizando 6 coelhos albinos da raça Nova Zelândia, pesando de 2 a 2,5 Kg, sendo a irritação dérmica primária realizada com uma única aplicação e no ensaio de irritação dérmica cumulativa foram feitas 10 aplicações consecutivas. Os índices de irritação foram obtidos de acordo com o método de Draize<sup>1,10-13</sup>.

O ensaio de sensibilização cutânea foi realizado pelo método Modificado de Magnusson e Kligman<sup>1,13,14,15</sup>, utilizando 20 cobaias albinas de raça Swiss, pesando em torno de 300 gramas. Os resultados são considerados negativos quando nenhum dos animais apresenta reação macroscópica.

Para avaliação *in vitro*, foi realizado teste de citotoxicidade pelo método de difusão em agar<sup>1,2,3,16,17</sup>, utilizando linhagens celulares certificadas provenientes da American Type Culture Collection (ATCC).

As linhagens celulares NCTC clone 929 (ATCC-CCL-1), de tecido conjuntivo de camundongo e a SIRC (ATCC-CCL-60) de córnea de coelho foram semeadas em placas de Petri de 60 x 15 mm, na concentração de  $3,0 \times 10^5$  células/mL de meio mínimo de Eagle (MEM) com 10% de soro fetal bovino (SBF) sem antibiótico e incubadas durante 48 horas à 37 °C, em estufa com ambiente de 5% de CO<sub>2</sub>. Após a formação da monocamada celular, o meio líquido foi descartado e adicionado volume de 5 mL 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.

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 aplicável, os diâmetros dos halos resultantes do efeito citotóxico foram cuidadosamente medidos usando paquímetro calibrado e

classificados em índices de zona (IZ) de acordo com a Farmacopéia Americana<sup>17</sup>.

Todas as amostras foram testadas em triplicata e, como controle negativo e positivo, foram utilizados respectivamente disco de papel de filtro atóxico com 0,5 cm de diâmetro e fragmentos com 0,5 cm x 0,5 cm de látex tóxico.

Na análise microbiológica, uma peça inteira da amostra foi pesada em invólucro de plástico estéril e acrescentada água peptonada tamponada a 1% (APT 1%) em volume proporcional ao peso, para resultar na diluição de  $10^{-1}$  ou  $10^{-2}$ . Em seguida, as diluições foram semeadas para as seguintes determinações de acordo com Bacteriological Analytical Manual On Line<sup>18</sup>: contagem em placas de bactérias aeróbias mesófilas, pesquisa de coliformes totais, contagem de clostrídio sulfito redutor e contagem de bolores e leveduras. Após a semeadura, o invólucro plástico contendo a amostra e o diluente (APT 1%) foi incubado a 35 °C por 48 horas para enriquecimento e foram realizados os ensaios de pesquisa de coliformes totais, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### *In vivo*

Os resultados obtidos foram todos negativos para os testes de irritação dérmica primária, cumulativa e sensibilização cutânea.

### *In vitro*

No teste de citotoxicidade *in vitro* foi observada toxicidade variando de leve a severa, com índice de zona entre (2,0 – 4,0), nas duas linhagens celulares NCTC clone 929 e SIRC, em dez fraldas na região de elástico, uma fralda na região do adesivo, dois absorventes maternos na região externa e cinco amostras de lenços umedecidos, conforme mostra a Tabela 1.

Nas fraldas, observou-se que a região que mais apresentou toxicidade foi a do elástico, cuja matéria prima era o “látex”. Atualmente, as empresas de grande porte substituíram este material por “lycra”, porém existem pessoas com intuito de aumentar a renda, fabricam fraldas descartáveis em casa e desconhecem tal fato, comprometendo a qualidade de seus produtos.

No adesivo das fraldas, absorvente de leite materno e lenços umedecidos, supõe-se que a toxicidade apresentada possa estar relacionada à qualidade da cola, do material utilizado e à presença de fragrâncias.

### *In vivo x in vitro*

Na Farmacopéia Americana<sup>17</sup> o índice de toxicidade aceitável para os produtos hospitalares é até IZ=2 (leve toxicidade), e comparando os valores obtidos nos testes de irritação dérmica primária e teste de citotoxicidade, observou-se que 30% das amostras apresentaram efeito tóxico no teste de citotoxicidade *in vitro* nas duas linhagens celulares e 70% foram negativos tanto nos ensaios *in vitro* como *in vivo*, conforme mostram a Figura 1 e a Figura 2.

**Tabela 1.** Média dos diâmetros dos halos de toxicidade (cm) e sua classificação em índice de zona (IZ) obtidos nas diferentes amostras de produtos descartáveis para as linhagens celulares NCTC clone 929 e SIRC.

Amostras	NCTC clone 929		SIRC		
		Média (cm)	IZ	Média (cm)	IZ
Fraldas	1	0,68	3,0	0,63	3,0
	2	0,63	3,0	0,53	3,0
	3	0,57	3,0	0,67	3,0
	4	0,78	3,0	0,60	3,0
	5	0,43	2,0	0,10	2,0
	6	0,82	3,0	0,70	3,0
	7	0,80	3,0	0,80	3,0
	8	1,25	4,0	1,17	4,0
	9	0,85	3,0	0,80	3,0
	10	0,78	3,0	0,67	3,0
	11	0,78	3,0	0,67	3,0
Absorventes maternos	1	0,27	2,0	0,25	2,0
	2	0,27	2,0	0,25	2,0
Lenços umedecidos	1	0,13	2,0	0,13	2,0
	2	0,13	2,0	0,10	2,0
	3	0,27	2,0	0,00	2,0
	4	0,28	2,0	0,00	2,0
	5	0,13	2,0	0,10	2,0
Papel de Filtro	Controle -	0,00	0,0	0,00	0,0
Latex	Controle +	0,70	3,0	0,70	3,0

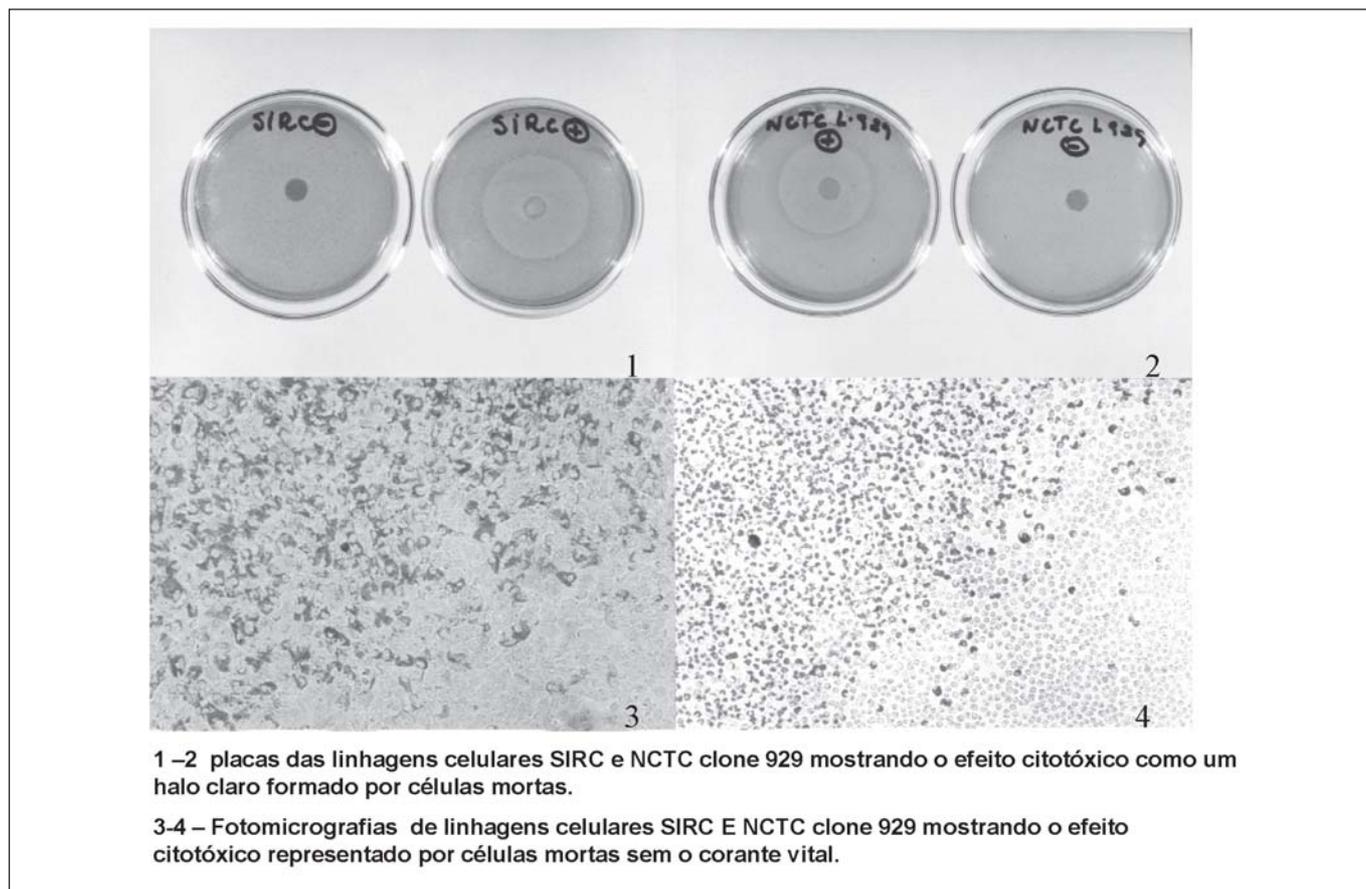


Figura 1. Método de citotoxicidade *in vitro*

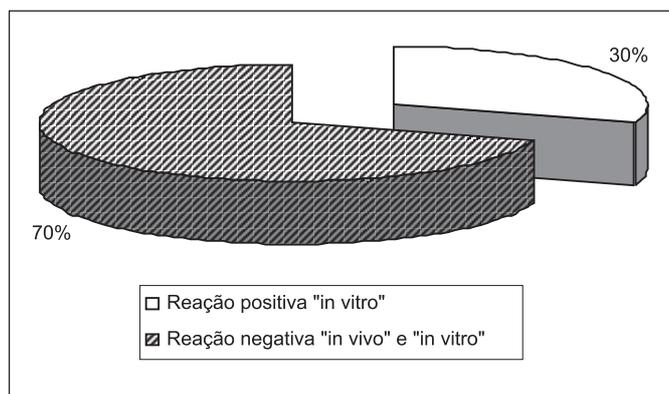


Figura 2. Porcentagem de amostras positivas no teste de toxicidade *in vitro*.

### Análise microbiológica

A análise microbiológica apresentou resultados positivos para bolores em quatro fraldas descartáveis industrializadas, contagens variando de  $1,1 \times 10^3$  a  $3,3 \times 10^3$  UFC/g e a presença de *Enterobacter* sp em algodão ortopédico, *Enterobacter agglomerans* em uma fralda de origem caseira e *Enterobacter cloacae* em algodão hidrófilo. Estas

contaminações podem ter ocorrido, provavelmente, durante o armazenamento e/ou devido à origem da matéria prima utilizada. O isolamento das bactérias *Enterobacter* sp, *Enterobacter agglomerans* e *Enterobacter cloacae* foi obtido após o enriquecimento em água peptonada tamponada a 1%, a partir do qual foi realizada a inoculação em caldo lauril sulfato, plaqueamento em ágar eosina azul de metileno, segundo Levine<sup>18</sup>, isolamento no meio IAL e posterior identificação bioquímica neste Instituto. Duas amostras de algodão ortopédico apresentaram contagem de bactérias aeróbias mesófilas ( $3,9 \times 10^4$  e  $4,2 \times 10^4$  UFC/g), acima do limite tolerado pela legislação em vigor<sup>1</sup>. Todas as amostras apresentaram pesquisa negativa para *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, clostrídio sulfito redutor e leveduras.

### CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos observou-se que além dos testes preconizados pela legislação brasileira vigente, o teste de citotoxicidade *in vitro* também deve ser recomendado para os produtos acabados de uso externo e interno, sendo

uma técnica rápida de baixo custo e alta sensibilidade, podendo ser usado como ensaio de triagem. Além disso, poderá evitar problemas de Saúde Pública garantindo maior segurança à saúde do usuário, pois os produtos de higiene são utilizados por tempo prolongado em crianças e adultos, podendo causar dermatites de contato e infecções.

## REFERÊNCIAS

1. Brasil. Portaria nº1480 de 1990 do Ministério da Saúde. 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, 7 jan.1991, Seção 1, p.295-301.
2. Cruz AS, Figueiredo CA, Ikeda TI, Vasconcelos ACE, Cardoso JB, Salles Gomes LF. Comparação de métodos para testar a citotoxicidade *in vitro* de materiais biocompatíveis. *Rev Saúde Pública* 1998;32(2):153-9.
3. Pinto TJA, Azevedo JC, Cruz AS. Comparative study of epithelial and fibroblastic cell lines as an alternative cytotoxicity test to the Draize Method. *JAOAC Int* 2000; 83(3): 665-8.
4. Zanini M, Wulkan C, Paschoal LHC, Paschoal FM. Erupção pápulo-ulcerativa na região da fralda: relato de um caso de dermatite de Jacquet. *An. Bras. Dermatol* 2003; 78(3).
5. Atherton DJ. The aetiology and management of irritant diaper dermatitis. *European Academy of Dermatology and Venereology. JEADV* 2001; 15(Suppl.1):1-4.
6. Atherton DJ. A Review of the Pathophysiology, prevention and treatment of irritant diaper dermatitis. *Curr Med Res Opin* 2004; 20(5):645-9.
7. Shin HT. Diaper dermatitis that does not quit. *Dermatol Ther* 2005;18(2): 124-35.
8. Kazaks EL, Lane AT. Diaper dermatitis *Pediatric Dermatology* 2000;47(4):909-19.
9. Wolf R, Wolf D, Tuzun B, Tuzun Y. Diaper dermatitis. *Clinics in Dermatology* 2000; 18(6):657-60.
10. American Society for Testing and Materials [ASTM]. F719. Standard practice for testing biomaterials in rabbits for primary skin irritation. Philadelphia: ASTM, 1996.
11. Draize JH. *Dermal Toxicity in Appraisal of the Safety of Chemicals in Foods, Drugs, and Cosmetics*. Association of Food and Drug Officials of the United States, Austin, Texas, 1959.
12. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Manual de irritação dérmica primária e repetida, Rio de Janeiro, 2001.
13. International Organization for Standardization [BS EN ISO] 10993-10. Biological evaluation of medical devices tests for irritation and sensitization. Geneva,1996.
14. American Society for Testing and Materials [ASTM], F 720-81. Standard practice for testing guinea pigs for contact allergens: guinea pigs maximization test. Philadelphia, 1996.
15. Magnusson B, Kligman, A. *Allergic contact dermatitis in the guinea pig*. Thomas CC, Springfield IL, 1970.
16. International Organization For Standardization [BS EN ISO] 10993-05: Biological evaluation of medical devices tests for *in vitro* cytotoxicity. Geneva, 1992.
17. UNITED. States Pharmacopeia. 28 ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2005 p.2268-9.
18. Bacteriological Analytical Manual Online, 2001. Disponível em <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-4.html>.