UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENFERMAGEM

RAFAEL QUEIROZ DE SOUZA

ANÁLISE *IN VITRO* DA TOXICIDADE CELULAR DE
TUBOS DE PVC ESTERILIZADOS
CONSECUTIVAMENTE EM RAIOS GAMA E ÓXIDO DE
ETILENO

SÃO PAULO
2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENFERMAGEM

RAFAEL QUEIROZ DE SOUZA

ANÁLISE *IN VITRO* DA TOXICIDADE CELULAR DE
TUBOS DE PVC ESTERILIZADOS
CONSECUTIVAMENTE EM RAIOS GAMA E ÓXIDO DE
ETILENO

Dissertação apresentada à Escola de Enfermagem
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências.

Área de concentração:
Enfermagem na Saúde do Adulto

Orientadora: Prof. Dra. Kazuko Uchikawa
Graziano

SÃO PAULO
2010

Folha de Aprovação

Nome: Rafael Queiroz de Souza

Título: Análise *in-vitro* da toxicidade celular de tubos de PVC esterilizados consecutivamente em raios gama e óxido de etileno.

Dissertação apresentada à Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Prof. Dra. Kazuko Uchikawa
Graziano

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Nome:

Instituição:

Julgamento:

Assinatura:

Nome:

Instituição:

Julgamento:

Assinatura:

Nome:

Instituição:

Julgamento:

Assinatura:

Dedicatória

À minha avó e mãe Maria Pereira dos Santos (*in memoriam*)

A meu avô Florentino Queiroz de Souza (*in memoriam*)

Por todos os momentos que estivemos juntos.

Este trabalho foi desenvolvido na Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo, no Programa de Pós-Graduação em Enfermagem na Saúde do Adulto (Proesa) e com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Agradecimentos

- ❖ À Escola de Enfermagem da USP e, especialmente, à Profa. Dra. Kazuko Uchikawa Graziano pela amizade, orientação e seriedade na condução desta dissertação
- ❖ À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro
- ❖ Ao G5: Flávia Moraes Gomes Pinto, Giovana Abrahão de Araújo Moriya, Tamara Carolina de Camargo e Camila Quartim de Moraes Bruna, pela amizade e companheirismo
- ❖ A meus pais, pelo apoio e compreensão
- ❖ Às professoras: Dra. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto, Dra. Maria Isabel Pedreira de Freitas e Dra. Maria Clara Padoveze, que contribuíram, em muito, para o desenvolvimento desta dissertação
- ❖ Ao Instituto Adolfo Lutz (IAL), que permitiu a realização deste trabalho e, especialmente, às pesquisadoras Dra. Áurea Silveira Cruz, Dra. Cláudia Regina Gonçalves e Dra. Tamiko Ichikawa Ikeda, pela realização dos ensaios de citotoxicidade e pela paciência
- ❖ Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), especialmente, à Dra. Yasko Kodama pela irradiação dos materiais utilizados nesta dissertação
- ❖ Aos colaboradores do Centro de Material e Esterilização, responsáveis pelo envio e recebimento dos materiais utilizados nesta dissertação

- ❖ À empresa prestadora de serviços de esterilização em Óxido de Etileno que realizou a esterilização e a quantificação dos resíduos pela cromatografia gasosa dos materiais utilizados nesta dissertação
- ❖ À Dra. Eutália Aparecida Cândido de Araújo (*in memoriam*) e ao Dr. Ricardo Barbosa pela assessoria estatística
- ❖ À empresa MackMedical®, que, gentilmente, forneceu os indicadores químicos utilizados nesta dissertação
- ❖ Aos colaboradores da Secretaria do Departamento de Enfermagem Médico-Cirúrgica da Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo
- ❖ Aos colaboradores da Secretaria de Pós-Graduação da Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo

Fazemos ciência com fatos, como fazemos uma casa com pedras; mas a acumulação de fatos não é ciência, assim como a acumulação de pedras não é uma casa (Poincaré).

Souza RQ. Análise *in vitro* da toxicidade celular de tubos de PVC esterilizados consecutivamente em raios gama e óxido de etileno [Dissertação]. São Paulo: Escola de Enfermagem, Universidade de São Paulo; 2010.

Resumo

Em 1967, uma carta enviada ao *British Medical Journal* relatou que a re-esterilização em Óxido de Etileno (EO) do Cloreto de Polivinil (PVC) previamente gama-irradiado forma “grandes quantidades de etileno cloridrina”, um composto altamente tóxico. Mesmo não apresentando dados mensurados, esta carta iniciou uma polêmica que até hoje divide a opinião de pesquisadores. Dirimir esta dúvida é relevante, uma vez que produtos de PVC esterilizados em Radiação Gama são habitualmente re-esterilizados em EO em caso de vencimento do período de validade da esterilização, que é determinado pelo fabricante. Este estudo objetivou evidenciar a toxicidade de tubos de PVC por meio do teste de citotoxicidade pelo método da difusão em ágar em culturas celulares NCTC clone 929. Foram criados quatro grupos experimentais com 81 unidades de análise: G1, constituído de tubos “*in natura*”; G2 constituído de tubos esterilizados em Radiação Gama; G3 constituído de tubos esterilizados em EO e G4 constituído de tubos esterilizados em Raios Gama e re-esterilizados em Óxido de Etileno. Os testes foram realizados em triplicata e cada tubo foi testado de forma a representar as superfícies internas, externas e massa. Após a mensuração do halo incolor, as unidades de análise foram graduadas de acordo com os graus de reatividade biológica descritos na norma ISO 10993-5:2009. Foram consideradas citotóxicas apenas as unidades análise que obtiveram grau três ou acima. Os resultados revelaram toxicidade celular apenas no grupo G3, no qual foram observadas placas com morte de todas as células, fato que demandou repetições, conforme a metodologia adotada. Na primeira repetição houve persistência de unidades de análise capazes de causar a morte de todas as células da placa. Na segunda repetição, nenhuma unidade de análise foi classificada como citotóxica. Inferiu-se que houve falhas no processo de aeração no grupo G3 e na primeira repetição. O resultado da cromatografia gasosa dos grupos G3 e G4 atestou que os materiais de ambos os grupos estariam seguros para uso. O valor máximo dos resíduos encontrados em ambos os grupos foi idêntico, contradizendo os resultados do teste de citotoxicidade. Concluiu-se que, nas condições deste experimento, os materiais de PVC esterilizados em Radiação Gama e, consecutivamente, re-esterilizados em EO não são citotóxicos e a cromatografia gasosa, utilizada isoladamente, pode produzir resultados questionáveis quanto à segurança dos materiais esterilizados em EO.

PALAVRAS-CHAVE: PVC. Esterilização. Radiação Gama. Óxido de Etileno. Citotoxicidade. Enfermagem em Centro de Material e Esterilização.

Souza RQ. Cell toxicity *in vitro* analysis of PVC tubes consecutively submitted to gamma-rays and ethylene oxide sterilization [Dissertation]. São Paulo: School of Nursing, University of São Paulo; 2010.

Abstract

In 1967, a letter sent to the British Medical Journal reported that the re-sterilization with Ethylene Oxide (EtO) of previously irradiated Polyvinyl Chloride (PVC) formed “large amounts of ethylene chlorohydrin”, a highly toxic compound. Even though it did not present measured data, this letter initiated a controversy that still divide the opinion of researchers to date. To solve this doubt is relevant, as PVC products submitted to gamma radiation are usually re-sterilized with EtO, when the sterilization validity has expired, which is determined by the manufacturer. The present study aimed at assessing the toxicity of PVC tubes through the cytotoxicity test, using the NCTC clone 929 cell culture agar diffusion test. Four experimental groups were created with 81 analysis units: G1, consisting of tubes “*in natura*”; G2, consisting of tubes submitted to gamma radiation; G3, consisting of tubes submitted to EtO sterilization and G4, consisting of tubes submitted to gamma-radiation and re-sterilized with EtO. The tests were carried out in triplicate and each tube was tested in order to represent its internal and external surfaces, as well as its mass. After the measurement of the colorless halo, the analysis units were graded according to the degrees of biological reactivity described in the ISO 10993-5:2009. Only the analysis units that were considered grade 3 and above were considered cytotoxic. The results showed evidence of cell toxicity only in G3, which disclosed plaques that presented death of all cells, a fact that necessitated repetition of the experiment, according to the adopted methodology. The first repetition showed the persistence of the analysis units to cause the death of all cells in the plaque. At the second repetition, none of the analysis units was classified as being cytotoxic. It was inferred that there were failures in the process of aeration in group G3 and in the first repetition. The results of the gas chromatography of groups G3 and G4 demonstrated that the materials from both groups would be safe for use. The maximum value of residues found in both groups was identical, in disagreement with the cytotoxicity test results. It was concluded that, according to the conditions of this experiment, the PVC materials submitted to gamma-radiation and consecutively sterilized by EtO are not cytotoxic and that the gas chromatography, when used alone, can yield debatable results regarding the safety of materials sterilized with EtO.

KEY WORDS: PVC. Sterilization. Gamma-radiation. Ethylene Oxide. Cytotoxicity. Nursing in Material and Sterilization Center.

Lista de Figuras

Figura 1 - Tubo de PVC utilizado nos experimentos.	51
Figura 2 - A: Aspecto do tubo de PVC antes da esterilização em Radiação Gama, B: Aspecto do tubo de PVC, após a esterilização em Radiação Gama.	52
Figura 3 - Esquema da confecção das placas utilizadas no teste de citotoxicidade.	55
Figura 4 – Disposição dos fragmentos nas placas utilizadas no teste de citotoxicidade pelo método da difusão em ágar - A: Superfície externa - B: Superfície interna - C: Massa.	55
Figura 5 – Fotomicrografia da monocamada confluyente de células coradas após 24 horas da deposição do meio <i>overlay</i> (840x).	57
Figura 6 – Fotomicrografia da monocamada de células observadas no halo incolor (840x).	58
Figura 7 – Fotomicrografia da monocamada de células após 24 horas de contato da amostra com o meio <i>overlay</i> - A: Amostra - B: Células do halo incolor - C: Células coradas (420x).	58
Figura 8 – Visão panorâmica da placa contendo o meio <i>overlay</i> sobre a monocamada de células NCTC clone 929 - A: Halo característico de citotoxicidade ao redor de uma amostra de látex utilizado como controle positivo - B: Extensão do halo.	59
Figura 9 – Controle positivo: Látex.	59
Figura 10 – Controle negativo: Papel filtro.	60
Figura 11 - Distribuição das unidades de análise em função do grau de reatividade biológica, segundo a porção testada nos grupos G3 e G4. São Paulo, 2010	68
Figura 12 - Distribuição das unidades de análise em função do grau de reatividade biológica nos grupos G3 e G4. São Paulo, 2010	68

Lista de Quadros

Quadro 1 - Desenho experimental para o estudo dos efeitos da inalação de 150 ppm de EO em ratas	27
Quadro 2 - Limites máximos dos Resíduos de Óxido de Etileno e subprodutos (em ppm) em correlatos	29
Quadro 3 - Influência da temperatura: comparação entre o tempo necessário de aeração na temperatura ambiente e na cabine de aeração	30
Quadro 4 - Desenho experimental e resultados do estudo de investigação da toxicidade de materiais de PVC utilizados em Circulação Extracorpórea	34
Quadro 5 - Relação entre o tempo de aeração, resíduos de EO e sua toxicidade em culturas celulares	37
Quadro 6 - Apresentação das publicações que evidenciaram compatibilidade ou incompatibilidade entre Radiação Gama e EO, como métodos consecutivos de esterilização, de acordo com a evidência encontrada	41
Quadro 7 - Apresentação das publicações que evidenciaram compatibilidade ou incompatibilidade entre Radiação Gama e EO, como métodos consecutivos de esterilização, de acordo a matéria-prima, parâmetros de esterilização e métodos analíticos empregados	42
Quadro 8 - Síntese dos resultados das publicações que evidenciaram compatibilidade ou incompatibilidade entre Radiação Gama e EO, como métodos consecutivos de esterilização	43
Quadro 9 - Desenho experimental	51
Quadro 10 - Graus de reatividade biológica para o teste de citotoxicidade pelo método da difusão em ágar, segundo a Norma ISO 10993-5:2009	60
Quadro 11 - Resultados do teste de citotoxicidade do grupo G1. São Paulo, 2009	61
Quadro 12 - Resultados do teste de citotoxicidade do grupo G2. São Paulo, 2010	62

Quadro 13 - Resultados do teste de citotoxicidade do grupo G3. São Paulo, 2010 63

Quadro 14 - Resultados do teste de citotoxicidade do grupo G4. São Paulo, 2010 64

Quadro 15 - Resultados da repetição do teste citotoxicidade em quatro novas amostras relacionadas ao grupo G3. São Paulo, 2010 65

Quadro 16 - Resultados da segunda repetição do teste citotoxicidade em quatro novas amostras relacionadas ao grupo G3. São Paulo, 2010 66

Quadro 17 - Resultado dos controles positivos e negativos utilizados no teste de citotoxicidade pelo método da difusão em ágar. São Paulo, 2010 69

Quadro 18 - Quantificação de resíduos de EO e subprodutos no grupo G3 pela cromatografia gasosa. São Paulo, 2010* 69

Quadro 19 - Quantificação de resíduos de EO e subprodutos no grupo G4 pela cromatografia gasosa. São Paulo, 2010* 70

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Número de amostras positivas e negativas nos grupos G1, G2, G3 e G4, de acordo com a porção testada. São Paulo, 2010 67

Tabela 2 - Número de amostras positivas e negativas no grupo G3 e nas repetições, de acordo com a porção testada. São Paulo, 2010 67

Sumário

Resumo	8
Abstract.....	9
1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1 CULTURAS CELULARES	20
2.2 RADIAÇÃO GAMA E SUAS INTERAÇÕES COM O PVC.....	22
2.3 TOXICIDADE RELACIONADA AO ÓXIDO DE ETILENO	24
2.3.1 Toxicidade relacionada à Etileno Cloridrina (ETCH).....	38
2.3.2 Toxicidade relacionada ao Etileno Glicol (ETG).....	39
2.4 ANÁLISE CRÍTICA DA LITERATURA CIENTÍFICA SOBRE AS COMPATIBILIDADES E INCOMPATIBILIDADES ENTRE RADIAÇÃO GAMA E ÓXIDO DE ETILENO.....	40
3 OBJETIVOS	47
3.1 OBJETIVO GERAL	47
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
4 MATERIAIS E MÉTODOS	48
4.1 TIPO DE PESQUISA.....	48
4.2 LOCAIS DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS	48
4.3 AMOSTRAS.....	50
4.4 DESENHO EXPERIMENTAL	50
4.5 TESTE DE CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO DA DIFUSÃO EM ÁGAR	54
4.5.1 Preparo das amostras.....	54
4.5.2 Culturas Celulares.....	56
4.5.3 Teste de citotoxicidade pelo método da difusão em ágar.....	56
5 RESULTADOS	61
6 DISCUSSÃO	71
7 CONCLUSÃO.....	77

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	78
9 REFERÊNCIAS.....	79
Anexo A: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz – CEPIAL.....	89
Anexo B: Parecer do Conselho Técnico Científico do Instituto Adolfo Lutz – CTC / IAL.....	90
Anexo C – Representação gráfica das condições de esterilização do grupo G3 original	91
Anexo D - Representação gráfica das condições de esterilização da primeira repetição do grupo G3.....	92
Anexo E - Representação gráfica das condições de esterilização da segunda repetição do grupo G3 e do grupo G4.....	93

1 INTRODUÇÃO

Em 1967, uma carta enviada ao *British Medical Journal* informava que a re-esterilização¹ em Óxido de Etileno (EO) dos materiais utilizados na assistência à saúde confeccionados em Cloreto de Polivinil (PVC) e previamente esterilizados em Radiação Gama, produz “altas concentrações” de Etileno Cloridrina (ETCH), uma substância altamente tóxica para os tecidos vivos. Nesta carta, os autores não citam as dosagens encontradas, o que não permite comparações com limites considerados baixos ou aceitáveis atualmente pelas organizações oficiais. A divulgação desta afirmação iniciou uma série de divergências de opinião entre pesquisadores.

Nos anos seguintes, publicações embasadas somente por esta correspondência recomendaram não re-esterilizar em EO os materiais previamente irradiados (Marx et al., 1969, Rendell-Baker, Roberts, 1970, Gillespie, Jackson, Owen, 1979), contribuindo assim para a disseminação da suposta incompatibilidade entre os dois métodos de esterilização.

No Brasil, a polêmica surgiu em 1982, em um livro onde consta a seguinte informação:

Nenhum artigo de PVC (Cloreto de Polivinil) originalmente esterilizado por raios gama deve ser reesterilizado pelo óxido de etileno porque os resíduos de HCl (ácido clorídrico) liberados pela irradiação reagem posteriormente com o óxido de etileno produzindo cloridrina etilênica que possui as mesmas propriedades cáusticas do óxido de etileno, sendo, todavia, de remoção muito mais difícil (Zanon, 1982, p. 302).

Esta afirmação é sustentada pela citação da referência bibliográfica de um trabalho realizado por Andersen em 1971, que avaliou a duração da retenção de EO em materiais de PVC, borracha, teflon e polietileno, e o nível tóxico do gás para os

¹ “É o processo de esterilização de artigos já processados, mas não utilizados, em razão de eventos ocorridos dentro do prazo de validade do produto ou do próprio processamento” (Sociedade Brasileira de Enfermeiros de Centro Cirúrgico, Recuperação Anestésica e Centro de Material e Esterilização - SOBECC, 2009, p. 192).

tecidos por meio do implante subcutâneo em ratos. O estudo não abordou a incompatibilidade entre os métodos de esterilização, portanto, não sustenta as afirmações do autor. A citação de Zanon (1982) também é encontrada no “Manual do Ministério da Saúde do Brasil sobre Controle de Infecção Hospitalar” de 1985. Mesmo sem qualquer referência a fontes primárias, a publicação resultou na disseminação do mito no território nacional.

Já em um livro de 1987, o mesmo autor, Zanon, afirma que se os tempos recomendados para a aeração dos materiais de PVC forem obedecidos, a irradiação prévia com Radiação Gama não contraindicará a re-esterilização em EO. Esta afirmação baseou-se em um estudo primário no qual foram dosadas as concentrações de EO em tubos endotraqueais de PVC e seu decaimento em função do tempo de aeração (Stetson, Withbourne, Eastman, 1976), e em um estudo que consistiu em evidenciar danos em plásticos após a esterilização EO, sem qualquer menção ao uso prévio de Radiação Gama (Tessler, 1961). Em outro capítulo de 1997, também escrito por Zanon e Bohmgahren, encontra-se a mesma afirmação acompanhada das mesmas referências.

Nota-se que os estudos que embasam a afirmação supracitada não abordaram incompatibilidades entre métodos de esterilização. Assim, não sustentam quaisquer afirmações sobre compatibilidade ou incompatibilidade entre a Radiação Gama e o EO, como métodos sucessivos de esterilização.

Em 1997, foi realizado um levantamento bibliográfico sobre o tema e na conclusão de sua análise, a autora considerou insuficiente o número de pesquisas para que a dúvida fosse esclarecida e sugeriu a realização de novos experimentos (Ceribelli, 1997).

Vários pesquisadores, como exemplo, os médicos Rendell-Baker e Roberts (1970), afirmam em suas publicações que uma vez irradiado, um material de PVC libera íons Cloreto que, em uma re-esterilização em EO, se combinam ao gás, elevando a concentração de ETCH formada. Estas constatações são preocupantes visto que materiais de pronto uso para a assistência à saúde são frequentemente esterilizados em Radiação Gama pelo fabricante e re-esterilizados em EO pelos Estabelecimentos de Assistência à Saúde. Esta prática acontece, em geral, quando o “prazo de validade da esterilização²” dos materiais termossensíveis inicialmente esterilizados em Radiação Gama está vencido.

De forma geral, a crença seguida atualmente é a de não se re-esterilizar em EO os materiais previamente gama-irradiados, sobretudo os materiais confeccionados em PVC, pela suposição de que esse processo elevaria os níveis de ETCH inviabilizando o material para uso.

Em 2007, Souza, autor desta dissertação, realizou uma revisão integrativa da literatura científica com o objetivo de analisar as evidências já publicadas de compatibilidades e as de incompatibilidades entre a Radiação Gama e o EO, como métodos sucessivos de esterilização. Concluiu que não existe uma situação em que este procedimento seja totalmente seguro, pois, com base nos experimentos realizados pelos trabalhos analisados, a segurança do procedimento teria influência direta do tipo da matéria-prima, da estrutura física do material, do tipo de estabilizador³, do tempo e tipo de aeração após esterilização em EO e da tolerância

² Conceito totalmente discutível, pois a esterilização destrói todas as formas de vida microbiana e a geração espontânea de seres vivos está descartada; e a contaminação do produto ocorre somente se a embalagem/selagem for danificada.

³ Estabilizadores são substâncias que atuam no controle da formação de HCl, impedindo que a degradação do polímero comprometa sua utilização (Rodolfo Jr, Mei, 2007). A exposição do polímero PVC sem a adição de estabilizadores ao calor, radiação ultravioleta e à radiação gama, pode, de acordo com intensidade e tempo de exposição, causar a liberação de HCl resultando em um processo de degradação, revelado normalmente pela mudança de cor para amarelo ou até mesmo para o marrom-escuro (Rodolfo Jr, Nunes, Ormanji, 2002).

tecidual à toxicidade residual presente nos materiais. Em relação a esta última variável, a título de exemplo, há exigências de um controle mais rigoroso dos resíduos de EO, ETCH e Etileno Glicol (ETG) em materiais implantáveis do que naqueles que entram em contato apenas com a pele íntegra (Brasil, 1999).

Se a justificativa do risco da re-esterilização consecutiva pelo EO, após o material ser irradiado, é a formação de substâncias tóxicas residuais em excesso sobre o material, especialmente a ETCH, formulou-se como hipótese inicial que a toxicidade celular do PVC previamente esterilizado em Radiação Gama e re-esterilizado em EO é maior do que quando submetido a apenas um dos métodos de esterilização.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CULTURAS CELULARES

Freshney (2005) estabelece três formas de cultivo de tecidos: a cultura de órgão, que mantém a integridade do tecido e as relações intercelulares, observando maior proximidade das características *in vivo* (Léo et al., 2007); a cultura primária de explante na qual um fragmento de tecido é sobreposto a uma superfície (plástico ou vidro) em que ocorrerá a adesão e migração das células; e a cultura de células na qual uma suspensão de células, inclusive, as derivadas de tecidos explantados, é cultivada na forma de monocamada aderida a uma superfície ou mantida na forma de suspensão em meio de cultura.

Segundo Alves e colaboradores (2007), as culturas celulares podem ser classificadas, entre outras, como culturas primárias e linhagens celulares. As culturas primárias são derivadas diretamente de um tecido dissociado mecânica ou enzimaticamente por meio de enzimas, como tripsina e colagenase, portanto, são heterogêneas e com melhor representatividade do tecido original. Após a primeira diluição (também chamada de passagem, repique ou subcultura) visando a obtenção (isolamento) de um único tipo de célula, a cultura primária torna-se uma linhagem celular, podendo ser finita ou contínua.

Os meios de cultura empregados no cultivo de células podem promover sua multiplicação ou a manutenção de sua integridade, não estimulando a multiplicação. Basicamente, constitui-se de duas partes: o meio basal, que suprirá as necessidades básicas de nutrientes para as células; e o conjunto de suplementos que promoverá o crescimento no meio basal (Moraes et al., 2007). De forma geral, esses meios são

constituídos de amino-ácidos, vitaminas, sais, glicose, além de suplementos orgânicos como proteínas, lipídios, hormônios e fatores de crescimento. Pode haver ou não a adição de soro e/ou antibióticos (Freshney, 2005).

Para a realização de testes de toxicidade celular, a escolha das células deve considerar que os materiais podem não afetar indivíduos com resposta imunológica normal, mas podem acarretar efeitos deletérios em indivíduos com deficiência na resposta imunológica. Consequentemente, a escolha de células com maior sensibilidade é primordial para assegurar o uso desses materiais (Cruz et al., 1987).

A *United States Pharmacopeia - USP* (2009) recomenda o uso de linhagens NCTC clone 929 para o teste de difusão em ágar. Entretanto, em 1987, Cruz e colaboradores estudaram comparativamente a sensibilidade de seis linhagens, das quais quatro eram certificadas e provenientes da *American Type Culture Collections - ATCC* e duas foram isoladas e caracterizadas na Seção de Culturas Celulares do Instituto Adolfo Lutz. Adicionalmente, incluíram uma cultura primária de células de embrião de galinha. Os resultados revelaram maior sensibilidade das linhagens RC-IAL, HeLa e cultura primária de embrião de galinha.

Desta forma, Cruz e colaboradores (1987) recomendam o uso das linhagens RC-IAL e HeLa para este teste com base em sua maior sensibilidade e por serem linhagens celulares já estabelecidas. Em relação à cultura primária de embrião de galinha, apesar da maior sensibilidade, apontam desvantagens em sua utilização, como a dependência da disponibilidade e da idade de ovos embrionados, além da dificuldade operacional em se realizar este tipo de cultura. Embora não seja tão sensível quanto às outras linhagens citadas, as autoras consideraram a linhagem NCTC clone 929, como de fácil manuseio e visualização dos efeitos da toxicidade

graças a seu tamanho e morfologia, justificando assim a opção por esta linhagem nos experimentos realizados nesta dissertação.

2.2 RADIAÇÃO GAMA E SUAS INTERAÇÕES COM O PVC

Os raios gama são ondas eletromagnéticas originadas de transições do núcleo de átomos, que se encontram em um nível energético superior e instável, passando para um nível energético inferior e estável (Rela, 2001).

A capacidade de inativação dos micro-organismos é ocasionada pela ação de colisão direta da Radiação Gama em partes sensíveis da célula e pela ação indireta por meio da formação de radicais químicos altamente reativos. A título de exemplo, a ação direta é capaz de ionizar a molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA) ou qualquer componente vital do micro-organismo, levando-o à falência ou à inibição de sua reprodução. Já a ação indireta, é capaz de provocar nas moléculas de água a formação de compostos altamente reativos, como moléculas de H_2O_2 que podem interagir com componentes vitais, causando danos que levam à morte do micro-organismo (Rela, 2001).

Como este tipo de esterilização não promove aumento da temperatura do material, permite aplicação não só em materiais termossensíveis, como também em produtos biológicos, como soros e vacinas (Guidolin et al., 1988).

Como vantagens desse processo de esterilização em relação a outros métodos, o Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN (2006a) cita: os produtos são esterilizados já na embalagem final, a penetração da radiação assegura esterilização de todo o volume do produto, seja na forma de sólido, líquido ou gel, e não há

necessidade de tratamento posterior para a retirada dos resíduos do agente esterilizante.

De forma geral, os polímeros apresentam grande diversidade em suas interações com a radiação ionizante. Sendo assim, a dosagem de radiação necessária para provocar os mesmos efeitos em polímeros diferentes é extremamente variável, pois há diferença na tolerância destes materiais. A esterilização do PVC por meio da Radiação Gama resulta no rompimento de ligações entre Carbono e Cloro, produzindo HCl e ligações duplas entre os carbonos da molécula (Artel, 2000, Moraes, 2000, Rodolfo Jr, Mei, 2007, Rodolfo Jr, Nunes, Ormanji, 2002).

Em razão dessas particularidades, a formulação de um PVC estável, bem como suas interações com a Radiação têm sido objeto de estudo de vários pesquisadores. No Brasil, Vinhas, Souto-Maior e Almeida (2005) estudaram as propriedades do PVC modificado com grupos alquila e benzila e concluíram que modificações em sua estrutura molecular produzem um polímero mais estável quando submetido à Radiação Gama. Rodolfo Jr. e Mei (2007) descreveram os mecanismos de degradação e estabilização térmica do PVC, destacando o papel dos estabilizadores nesse processo. Considerando que materiais de PVC podem conter estabilizadores em sua formulação e que estas substâncias podem aumentar substancialmente as quantidades de EO absorvido, fica clara a relevância da investigação da potencial citotoxicidade desses materiais quando consecutivamente esterilizados em Radiação Gama e EO.

2.3 TOXICIDADE RELACIONADA AO ÓXIDO DE ETILENO

O EO é um gás inflamável, explosivo e tem uso indicado para a esterilização de materiais termossensíveis (Graziano, Silva, Bianchi, 2000, Graziano, 2003).

Possui um elevado poder viruscida, esporicida, bactericida, micobactericida e fungicida (Brasil, 2001). Seu mecanismo de ação é a alquilação de proteínas microbianas (Graziano, 2003) e sua letalidade depende da concentração, tempo de exposição, temperatura e umidade (Mendes, Brandão, Silva, 2007). Considerando a diversidade de parâmetros empregados no processo de esterilização, Pinto (1991) recomenda o controle rigoroso de todas as etapas do processo: pré-umidificação, equilíbrio da temperatura, pré-vácuo, equilíbrio da umidificação, introdução do gás, tempo de exposição, vácuo final e aeração.

Na década de 30, o EO era utilizado como pesticida e fumigante para alimentos, além de ser considerado um potencial agente lacrimante para uso em guerras. Antes mesmo de ser descrito como agente esterilizante, a toxicidade relacionada já era objeto de estudo em 1932, quando Walker e Greeson testaram sua toxicidade em humanos e animais. Nos estudos realizados em seres humanos, a inalação da concentração de 1:400 demonstrou ser levemente irritante para as vias aéreas superiores e não resultou em efeitos posteriores. Já a concentração de 1:80 demonstrou ser altamente irritante para as vias aéreas superiores após 10 segundos de exposição. Na pele, produto evaporou sem deixar sinais de irritação mesmo após 15 segundos⁴. Em coelhos, o contato do EO com os olhos resultou em blefarite e conjuntivite. Após a administração intravenosa, a quantidade de 175 mg/kg de peso

⁴ Não há clareza quanto a concentração utilizada neste teste. Há relatos de queimaduras graves relacionadas a tecidos esterilizados em EO (Biro, Fisher, Price, 1974)

corporal foi suficiente para causar a morte após 6 horas. A diarreia foi o primeiro sintoma observado. Após 4 horas da administração, surgiram sinais de fraqueza muscular. A respiração permaneceu regular, porém com discreta taquipneia. Em seguida os animais apresentaram nistagmo e movimentos involuntários na mandíbula e nos membros, que evoluíram para convulsão. Entre as crises convulsivas, os animais perderam a capacidade de sustentar-se de pé e levantar a cabeça devido ao relaxamento e a perda do tônus muscular. A autópsia revelou congestão em todos os órgãos, alterações exsudativas nos rins e pequenas, porém numerosas, hemorragias no estômago. Em relação ao efeito do EO após inalação em animais, os resultados revelaram que a concentração de 1:80 de EO por 30 minutos é suficiente para causar de morte de ratos, camundongos e porquinhos da Índia (cobaias). A oferta de alimentos com EO aos ratos resultou em morte após a segunda refeição borrifada com o produto. Entre os achados mais comuns nas autópsias, realizadas até, no máximo, a quinta refeição, estavam: congestão pulmonar, alterações exsudativas nos rins, intestino com conteúdo fluidificado, congestão hepática com presença de necrose periférica e petéquias no estômago (Walker, Greeson, 1932).

Em seres humanos, Bommer, Ritz e Andrassy (1985) evidenciaram que diversos estudos têm apontado os materiais esterilizados em EO como possíveis causadores de reações alérgicas em pacientes submetidos à hemodiálise. Lyarskii e colaboradores (1986) demonstraram que o contato do EO com o organismo através da via intravenosa e intraperitoneal apresentam maior gravidade na intoxicação, maior velocidade na produção dos sintomas e maior extensão nos danos a órgãos e sistemas.

Além de tóxico, o EO foi também associado a diversos tipos de câncer em estudos envolvendo animais. Em 1979, Dunkelberg realizou um estudo no qual

administrou semanalmente doses de 1 mg, 0,3 mg e 0,1 mg de EO diluído em 0,1 ml de Tricaprylin pela via subcutânea na região interescapular em grupos experimentais constituídos de 100 ratos para cada dose. Após a 50ª semana de administração, o autor evidenciou o aparecimento de sarcomas no sítio de administração. Em 1982, o mesmo autor estudou a atividade carcinogênica do EO por meio da administração intragástrica de doses de 30,0 mg/kg e 7,5 mg/kg em grupos experimentais constituídos de 50 ratas para cada dose. Além do aparecimento de tumores no estômago, o autor observou o desenvolvimento de tumores em sítios distantes. Para a dose de 30 mg/kg, predominaram os tumores da glândula mamária, além de tumores do útero, intestino, hipófise, ovários, tecidos subcutâneos, linfáticos e nervosos. Já para a dose de 7,5 mg/kg, predominaram os tumores da glândula mamária, além de tumores do útero, ovários e tecido linfático.

Além de tóxico e carcinogênico, o EO também é um agente teratogênico. Em 1980, LaBorde e Kimmel avaliaram o potencial teratogênico do EO quando administrado pela via intravenosa. As análises foram realizadas em camundongos CD-1, utilizando várias doses de EO (de 25 mg/kg a 400 mg/kg) e considerando quatro períodos de gestação: Período I, com 4-6 dias; Período II com, 6-8 dias; Período III, com 8-10 dias e Período IV, com 10-12 dias. Os resultados demonstraram redução significativa na média do peso fetal com a dose de 150 mg/kg em todos os períodos. Dentre as malformações encontradas, predominaram as malformações ósseas no Período II para a dose de 150 mg/kg, evidenciando a atividade teratogênica do EO, permitindo aos autores reforçarem a necessidade do uso correto desse método de esterilização e a importância da aeração na segurança de pacientes e trabalhadores.

No estudo de Sneelings e colaboradores (1982), os autores expuseram ratas Fischer prenhas a 100, 33 e 10 ppm de EO durante 6 horas por dia, do 6º ao 15º dias de gestação. A exposição à concentração de 100 ppm resultou em diminuição estatisticamente significativa do peso dos fetos, porém não mostrou efeitos teratogênicos. Desta forma, os autores concluíram que o EO a 100 ppm não é um teratógeno quando inalado por ratas Fischer. Em contrapartida, o trabalho de Hardin e colaboradores (1983), que avaliou a atividade teratogênica de diversos epóxidos, incluindo, o EO na concentração de 150 ppm pela via inalatória em ratas Sprague-Dawley e coelhas Nova Zelândia colocadas em câmaras de inalação, obteve resultados diferentes. O estudo admitiu quatro grupos experimentais para os testes realizados com o EO (Quadro 1).

Quadro 1 – Desenho experimental para o estudo dos efeitos da inalação de 150 ppm de EO em ratas

Grupo	Três semanas, antes da reprodução	Dias de gestação	
		1-6	7-16
1	Ar filtrado	Ar filtrado	Ar filtrado
2	Ar filtrado	Ar filtrado	EO
3	Ar filtrado	EO	EO
4	EO	EO	EO

Fonte: Hardin et al., 1983.

Os resultados evidenciaram toxicidade para o feto e embrião somente nas ratas. Os autores observaram aumento estatisticamente significativo na incidência de reabsorções fetais. O peso e o comprimento dos fetos apresentaram redução em todos os grupos expostos ao EO. Também foi observado um aumento na incidência da redução da ossificação em todos os grupos expostos ao EO. Os resultados dos trabalhos sugerem que o efeito teratogênico pode variar em função das espécies utilizadas, porém não deixam dúvida quanto à atividade teratogênica do EO.

Em razão de sua elevada toxicidade, é imprescindível o controle dos resíduos do EO e seus subprodutos para assegurar o uso de materiais esterilizados neste método. Em nosso País, a norma ABNT⁵ NBR 10993-7:2005, que dispõe sobre a avaliação biológica de produtos para a saúde, determina os limites residuais de EO e ETCH, de acordo com o tempo e tipo de exposição ao material esterilizado. Na referida norma, nenhum limite foi fixado para o ETG porque a avaliação de risco sugere que, quando os resíduos do EO são controlados, é pouco provável que os resíduos de ETG sejam significantes do ponto de vista biológico. Ainda segundo a norma, quando o material é de contato permanente, a dose média diária para o paciente não deve ser superior a 0,1 mg/dia e o limite máximo não deve exceder 20 mg nas primeiras 24 horas, 60 mg nos primeiros 30 dias e 2,5 g ao longo da vida. Em materiais de contato prolongado, a dose máxima nas primeiras 24 horas não deve exceder 20 mg e, nos primeiros 30 dias, não deve ser superior a 60 mg. Para materiais de contato limitado a dose média diária não deve ser superior a 20 mg. As seguintes situações são também contempladas: em lentes intraoculares, o resíduo não deve exceder 0,5 µg por lente por dia e 1,25 µg por lente; em oxigenadores e separadores de sangue, a dose média diária não deve ser superior a 60 mg.

No Brasil, os limites de tolerância de resíduos do EO e seus subprodutos estão estabelecidos na Portaria Interministerial nº 482 de 1999 (Quadro 2), sendo os mesmos valores referenciados como seguros pela *Food and Drug Administration - FDA* (1978).

⁵ Associação Brasileira de Normas Técnicas.

Quadro 2 - Limites máximos dos Resíduos de Óxido de Etileno e subprodutos (em ppm) em correlatos

Correlato	EO	ETCH	ETG
Implantes			
Pequeno (10g)	250	250	5.000
Médio (>10 - < 100g)	100	100	2.000
Grande (>100g)	25	25	500
Dispositivos intrauterinos	5	10	10
Lentes intraoculares	25	25	500
Correlatos que contatam a mucosa	250	250	5.000
Correlatos que contatam o sangue	25	25	250
Correlatos que contatam a pele	250	250	5.000
Esponjas cirúrgicas	25	250	500

Fonte: Brasil, 1999.

Há críticas quanto ao estabelecimento desses limites de tolerância para o EO, ETCH e ETG. Butterworth e Chapman (2007) consideram que limites aceitáveis de EO e subprodutos em materiais são baseados em experiências com a aplicação desse agente em sangue periférico por meio de materiais utilizados em transfusão ou métodos dialíticos. Desta forma, o uso desses limites para materiais destinados às aplicações envolvendo células-tronco seria inválida, considerando os efeitos do gás no DNA das células reservadas para transplante e o contato prolongado com o material contendo resíduos. Para Lindop e colaboradores (1980), em materiais utilizados para infusão de soluções pela via endovenosa há o risco da eluição do EO e subprodutos e o consequente risco de que estas substâncias atinjam concentrações tóxicas para o organismo. Desta forma, o autor questiona os limites estabelecidos pela *FDA*. Para o autor, uma concentração de 0,025 mg / gm no PVC em nada significaria caso o peso total do tubo não fosse determinado.

O teste utilizado para quantificação dos resíduos de EO e subprodutos é a cromatografia gasosa. O nível máximo dos resíduos do EO e subprodutos está diretamente relacionado com a aeração, já que esta influi diretamente na redução dos resíduos EO e seus subprodutos. A título de exemplo, Biro, Fisher e Price (1974)

reportaram que 19 mulheres sofreram queimaduras de primeiro a terceiro grau na região dorsal e glútea, decorrentes do contato com campos e aventais cirúrgicos esterilizados em EO e não adequadamente aerados. A análise dos aventais cirúrgicos revelou que estes continham de 3.600 a 10.800 ppm de EO.

A Norma ISO 11135-1:2007 define a aeração, como o processo no qual o EO e os subprodutos são removidos do material até que atinjam níveis predeterminados. Diversos fatores podem interferir nas concentrações residuais de EO e subprodutos, como a composição do material, os parâmetros do ciclo de esterilização, o tipo de embalagem utilizada e o tipo de aeração empregada. Steelman (1992) atribui ao fabricante a responsabilidade de estabelecer o tempo necessário de aeração, bem como os procedimentos para sua realização.

A norma venezuelana COVENIN 2843 (1991) correlaciona a temperatura com o tempo de aeração e descreve tempos de aeração diferentes, de acordo com a composição dos materiais, incluindo o PVC, que requer o maior tempo em relação a outros materiais (Quadro 3):

Quadro 3 – Influência da temperatura: comparação entre o tempo necessário de aeração na temperatura ambiente e na cabine de aeração

Material	Temperatura ambiental	Cabine de Aeração 50-60°C
Papel	24h	2h
Goma Natural	48h	4h
Polietileno	24h	2h
Tubos de PVC	7 dias	8h
Tubos de Látex	48h	4h

Fonte: Venezuela, 1991.

No Brasil, a recomendação de aeração da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde para materiais mais “difíceis” é de 8 horas a 60°C ou 12 horas a 50°C. Estes valores devem ser seguidos como regra geral em caso de dúvida em relação ao tempo de aeração (Brasil, s/d). Mas, pesquisas

realizadas em território nacional vêm demonstrando que a aeração, muitas vezes, não é realizada de forma apropriada. Em 1997, um estudo conduzido por Demarzo e Silva revelou que há instituições que não recebem nenhum laudo sobre os resíduos do EO e subprodutos. Em 2006, Abdo realizou um estudo no qual descreveu como se desenvolve a aeração em empresas prestadoras de serviço de esterilização em EO na região Sudeste do Brasil. Os resultados revelaram que 60% das empresas utilizam a aeração ambiental e 40% empregam a aeração mecânica. Nenhuma das empresas que adota a aeração mecânica está de acordo com as orientações das principais organizações internacionais. Além disso, a aeração ambiental não é recomendada por estas organizações.

Na literatura científica, o estabelecimento de tempos seguros de aeração para materiais plásticos foi considerado um tema polêmico. Guess (1970) criticou a forma como os estudos determinando o tempo de aeração necessário para assegurar o uso de materiais plásticos eram conduzidos, pois os desenhos experimentais não consideravam a composição dos materiais plásticos usados como corpo de prova. Segundo o autor, os trabalhos utilizavam o termo “plástico” que, na sua concepção, era tão genérico como o termo “comida”. Além disso, as afirmações referentes aos tempos seguros de aeração não levavam em consideração o destino do material, o impacto da embalagem utilizada e, muitas vezes, não havia o detalhamento quanto à concentração, mistura e temperatura utilizadas no processo de esterilização. O autor ainda faz comentários de que a aplicabilidade do resultado de um experimento envolvendo um tipo de PVC pode não ser generalizada quando são utilizadas outras formulações. Handlos, em 1980, também criticou a forma como a aeração foi tratada pelas pesquisas. Para o autor, a maior parte das pesquisas publicadas, até o ano de 1980, tratava da aeração de materiais específicos sem considerar sua composição. No

trabalho, o autor propõe um cálculo de difusão do EO para se determinar uma aeração segura em materiais de composição conhecida (Handlos, 1980).

Diversos estudos realizados atestaram variações nas quantidades residuais de EO, de acordo com o material utilizado. Stetson, Whitbourne e Eastman (1976) observaram que os materiais confeccionados em PVC retiveram mais EO (25.000 ppm) do que materiais, como o teflon (1.000 ppm), quando não aerados. Mas, constataram que o decrescimento desta concentração ocorre de forma uniforme e salientam que, quanto maior a quantidade de EO encontrada ao fim do processo de esterilização maior deverá ser o tempo de aeração. Outros pesquisadores, como Gilding, Reed e Baskett (1980), também evidenciaram maiores quantidades de resíduos no PVC em relação a outros polímeros. Vink e Pleijsier (1986) determinaram que a quantidade residual de EO ao final do processo de esterilização decresce em função do tempo de aeração, porém este decrescimento é dependente do polímero utilizado na confecção do dispositivo. Os resultados dos estudos supracitados sugerem que mesmo que o material apresente níveis elevados de resíduos de EO e subprodutos, o processo de aeração ainda é capaz de removê-los quando adequadamente determinados.

De forma geral, a literatura científica atribui a maior absorção de EO, com consequente necessidade de tempos maiores de aeração aos plastificantes presentes no PVC. O'Leary e Guess (1968) evidenciaram que formulações de PVC contendo maiores quantidades de plastificantes são capazes de provocar morte de células em cultura, comprovando a maior solubilidade do EO nesses plastificantes. Lipton e colaboradores (1971) atribuíram a maior quantidade de EO absorvido no PVC aos diluentes utilizados na mistura do EO, como o tricloromonofluorometano e o diclorodifluorometano que carreiam o EO ao penetrarem no PVC, fazendo com que o

gás seja absorvido em grande quantidade pelos plastificantes. Por esse processo, um maior tempo de aeração é necessário para esse tipo de produto (7 dias). De acordo com Rendell-Baker (1972), a afinidade do EO pelos plastificantes é responsável pela redução da taxa de eliminação do gás. Além disso, as misturas de EO com Freon 11 e 11/12 são extremamente solúveis em borrachas e plásticos, e podem carrear grandes quantidades de EO quando comparadas à mistura do EO com Dióxido de Carbono.

Na perspectiva de White (1977), que estudou as taxas de desabsorção de EO em diferentes materiais plásticos e pôde observar que estas variavam conforme a composição do material, os materiais de conformação complexa ou de grandes dimensões não poderiam ser comparados aos usuais tubos ou placas, que são as conformações mais comuns empregadas nos estudos para determinação do tempo seguro de aeração. Com esta observação, pode-se afirmar que, além do material em si, o tempo seguro de aeração também é influenciado pelas dimensões e pela conformação do produto em questão.

Ressalta-se que nos Centros de Material e Esterilização (CMEs) brasileiros, os detalhes da composição de cada material nem sempre são conhecidos. O fato, associado ao volume de materiais administrados pela unidade, cujas conformações podem ser simples ou complexas e com diversas dimensões, pode dificultar a adoção de controles de diferentes tempos e tipos de aeração, justificando a necessidade de generalização.

Pela problemática das concentrações excessivas de EO no PVC esterilizado nesse método, há autores que defendem a não esterilização do PVC em EO. Em 1971, Stanley e colaboradores relataram que três pacientes submetidos à cirurgia cardíaca, com idades de 2, 4 e 7 anos, morreram após choque, com queda de pressão arterial e venosa não responsiva ao uso de vasopressores, cardiotônicos, esteroides e

transusão de sangue. Suspeitando dos tubos esterilizados em EO, como causadores das mortes, a esterilização desses materiais passou a ser realizada em vapor úmido, eliminando novas ocorrências. Para comprovação das suspeitas, os autores realizaram um experimento em cães, cujo desenho experimental e resultados estão representados nos dados do Quadro 4:

Quadro 4 – Desenho experimental e resultados do estudo de investigação da toxicidade de materiais de PVC utilizados em Circulação Extracorpórea

Tipo de esterilização dos materiais de PVC	Procedimento realizado	Número de cães	Mortes
Vapor úmido	Circulação Extracorpórea com interrupção da circulação pulmonar	5	1*
	Circulação Extracorpórea sem interrupção da circulação pulmonar	4	0
Óxido de Etileno	Circulação Extracorpórea com interrupção da circulação pulmonar	9	9
	Circulação Extracorpórea sem interrupção da circulação pulmonar	9	6**

*Morte em razão de reações decorrentes da transusão.

**Os três animais sobreviveram, após 3 dias de distúrbios pulmonares graves.

Fonte: Stanley et al., 1971.

Com base nestes achados, os autores concluíram que o EO absorvido nos materiais de PVC utilizados em circulação extracorpórea foi responsável pelas mortes relatadas, recomendando a não utilização do EO, como agente esterilizante para estes componentes.

É importante colocar que a aeração segura também depende de outros fatores, além dos já comentados. Um desses fatores é o tipo de embalagem utilizada. Watanabe (1990) conclui que a eliminação do EO é melhor em embalagens de papel grau cirúrgico, quando comparadas às embalagens de poliamida. Nakata e colaboradores (2000) utilizaram PVC como corpo de prova em razão de sua capacidade de absorção, para determinação dos residuais de EO em contêineres rígidos e o tempo de aeração necessário para remoção dos residuais de EO neste tipo

de embalagem. Após 1 hora de aeração, os resultados revelaram valores acima de 1.000 ppm para os contêineres e 144 ppm para a embalagem usualmente utilizada no hospital onde o estudo foi realizado (não há descrição detalhada desta embalagem). Ackerman e colaboradores (1985) utilizaram culturas de embrião de rato para avaliar a toxicidade de materiais empregados em procedimentos de fertilização *in vitro*. Os resultados revelaram que a capacidade do meio de crescimento de promover o desenvolvimento dos embriões, após entrar em contato com os materiais esterilizados em diversos processos, incluindo o EO, variava de acordo com o tipo de embalagem usada. Em suma, é importante que a escolha da embalagem considere que determinados materiais podem reduzir a eficácia do processo de eliminação dos resíduos, comprometendo a segurança na utilização dos dispositivos.

Outro aspecto importante e controverso que pode influenciar a quantidade final dos resíduos é o número de exposições do material ao EO. Nogueira e colaboradores (1989) re-esterilizaram cânulas e seringas de 1, 3, 5, 10 e 20 ml e não encontraram diferenças significativas na quantidade de resíduos, ou seja, não houve efeito cumulativo, exceto nas seringas de 1 ml. Mas constatou-se que a posição inferior no cesto pode aumentar as concentrações residuais. Lucas e colaboradores (2003) re-esterilizaram cateteres sólidos e com lúmen e não encontraram diferenças significativas na quantidade de resíduos, mesmo após cinco re-esterilizações. Cabe ressaltar que as quantidades residuais encontradas variaram, conforme as matérias-primas. Concluindo o trabalho, os autores fazem as seguintes ressalvas: os efeitos e a quantidade residual do EO dependem da matéria-prima, portanto, os resíduos e a biocompatibilidade devem ser avaliados para cada tipo de matéria-prima e dispositivo. Já no estudo de Rodriguez e colaboradores (2002), os autores encontraram quantidades cumulativas de EO ao re-esterilizarem cateteres uretrais e

de aspiração. Ferrell e colaboradores (1997) também encontraram quantidades residuais de EO acima do permitido pela *FDA* ao re-esterilizar cateteres de eletrofisiologia, após o ciclo padrão de esterilização em EO seguido de 2 dias de aeração.

Além das pesquisas que buscaram apenas quantificar os resíduos de EO e subprodutos visando à segurança na utilização de materiais esterilizados em EO, há trabalhos que optaram por métodos biológicos *in vivo* e *in vitro*, ou ainda, a combinação de métodos de quantificação de resíduos e métodos biológicos. Schiewe e colaboradores (1985) analisaram a toxicidade potencial em placas de poliestireno esterilizadas pelo EO por meio do cultivo de embriões de rato nesses materiais e determinaram que o tempo mínimo de aeração para o material é de 36 horas (12 horas maior que o recomendado pelo próprio fabricante). O referido estudo sugere que existem diferenças na sensibilidade dos métodos utilizados. Do ponto de vista biológico, o tempo mínimo de aeração recomendado pelo fabricante mostrou-se insuficiente, sendo prudente eleger os métodos biológicos, como padrão na avaliação da segurança dos materiais esterilizados em EO, pressupondo que o fabricante utilizou apenas métodos físico-químicos. Já no trabalho de Matsumoto e colaboradores (1968), os autores utilizaram a cromatografia gasosa e o método de implante subcutâneo em ratos para determinar o tempo seguro de aeração para cateteres cardíacos e cateteres de Foley. O estudo de Andersen (1971) realizou a pesagem das amostras para quantificação e avaliação da duração da retenção do EO em materiais de PVC, borracha, teflon e polietileno, e a toxicidade destas quantidades para os tecidos por meio de implante subcutâneo em ratos.

Assim como nesta dissertação, McGuningle e colaboradores (1975) utilizaram a cromatografia para o estudo da remoção do EO em PVC, silicone e

poliéter poliuretano e o teste de citotoxicidade pelo método da difusão em ágar para descrever os efeitos dos resíduos de EO em culturas celulares. Os materiais foram expostos ao EO 100% por 90 minutos, na concentração de 2.200 mg/l, 54,4 °C de temperatura e umidade relativa menor que 10%. A aeração foi realizada sob vácuo a 54,4 °C. A análise comparativa entre os resultados dos dois métodos está representado nos dados do Quadro 5:

Quadro 5 – Relação entre o tempo de aeração, resíduos de EO e sua toxicidade em culturas celulares

Tempo de aeração (h)	Resíduos de EO (ppm)	Zona de toxicidade (mm)
0	17200	>25
1	10000	>25
2	5340	8
3	3570	3,5
4	3160	3,5
5	2220	3,1
6	1510	2,8
6,5	900	0
7	420	0
24	34	0

Fonte: McGunningle et al., 1975.

O estudo de Jones (1979) buscou correlacionar os efeitos hemolíticos do EO absorvido em materiais plásticos e borrachas, incluindo o PVC aos efeitos citotóxicos do gás em culturas de células L929. Os resultados revelaram maior sensibilidade do teste empregando culturas celulares quando comparado ao teste de hemólise. Segundo o autor, amostras de PVC contendo 1,8 mg e 2,1 mg de EO demonstraram ser levemente citotóxicas em culturas celulares, porém não mostraram toxicidade no teste de hemólise.

O resultado sustenta que o teste de citotoxicidade pelo método da difusão em ágar é o método biológico mais sensível para o estudo da segurança de materiais esterilizados em EO, justificando sua escolha na presente investigação.

2.3.1 Toxicidade relacionada à Etileno Cloridrina (ETCH)

A ETCH ($\text{CH}_2\text{Cl}-\text{CH}_2\text{OH}$) é também conhecida como 2-Cloroetanol. O composto pode ser produzido pela reação do EO com íons Cloro em meio aquoso (Guess, 1970). Na temperatura ambiente, apresenta-se como um líquido incolor, cujo odor assemelha-se a uma mistura de álcool etílico e éter (Wesley et al. 1965).

Em 1953, o primeiro registro de morte ocorreu pela ingestão de ETCH pura (Ballotta, Bertagni, Troisi, 1953). Já na época, o produto era considerado um dos mais tóxicos solventes de uso industrial. Os sintomas da intoxicação pela ingestão do produto foram descritos como náuseas, vômitos, cefaleia, sonolência, confusão, alterações na marcha, perda da sensibilidade nas extremidades e distúrbios visuais.

Em 1970, Guess estudou em coelhos os efeitos da ETCH pura e diluída em diversos tecidos por meio de testes de irritação cutânea, irritação ocular, irritação de mucosa peniana, irritação subcutânea, além dos testes de implante intramuscular e de citotoxicidade pelo método da difusão em ágar. O autor observou que grandes quantidades do produto podem ser absorvidas pela pele intacta sem sinais de irritação. Quanto aos demais tecidos, a ETCH pura demonstrou ser altamente destrutiva para a mucosa e os tecidos oculares, musculares e subcutâneos. Quanto ao teste de difusão em ágar, a ETCH mostrou ser citotóxica quando pura e quando diluída em 1:5 e 1:10.

Lawrence, Turner e Autian (1971) confirmaram os achados de Guess (1970), ao realizarem testes de irritação dérmica em coelhos e evidenciarem uma rápida absorção do produto. Já em testes de irritação intradérmica, os resultados revelaram que a ETCH pura produz um *score* de 3, considerado como irritação evidente e marcante, caracterizada por região central isquêmica, rodeada por um halo cianótico.

Nos testes de irritação ocular com ETCH pura, obtiveram um *score* de 3, considerado o mais alto grau de irritação ocular, caracterizado por inflamação ocular, presença ou não de secreção purulenta, geralmente, acompanhada de inflamação na íris e lesões na córnea, assim como nas concentrações de 20% a 80% de ETCH. Nos testes de inalação, os autores puderam determinar um tempo/dose letal de apenas 13,3 minutos, atestando a elevada toxicidade da ETCH. Nos testes de difusão em ágar, observaram que as concentrações de 10% a 100% são citotóxicas.

Lawrence e colaboradores (1971) afirmam que as repetidas administrações parenterais de ETCH em ratos são mais tóxicas do que a ingestão oral de doses similares. Quanto ao risco associado à esterilização de materiais plásticos, referem que o material, além de conter ETCH, possui também o EO e o ETG. Desta forma, a combinação dessas substâncias pode produzir efeitos diferentes daqueles associados somente à ETCH.

2.3.2 Toxicidade relacionada ao Etileno Glicol (ETG)

O ETG é um líquido incolor, inodoro e com sabor doce. Pode ser encontrado em soluções domésticas como detergentes, anticongelantes e polidores (McMahon, Winstead, Weant, 2009). Em razão do sabor e da capacidade de produzir intoxicação, o ETG pode também ser utilizado como substituto para o etanol (Abramson, Singh,

2000). Durante o processo de esterilização pelo EO, o composto resulta da reação do EO com água (Ferrell et al., 1997).

Os casos reportados de intoxicação por ingestão do produto são numerosos; só em 2007, houve menção de 5.395 casos de intoxicação pelo produto, incluindo acidentais e intencionais, dos quais 16 resultaram em morte (Bronstein et al., 2008).

Em estudos e relatos da década de 1950, Troisi evidenciou que o ETG é rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal e tem ação tóxica nos rins, no sistema nervoso e órgãos hematopoiéticos. Nadeau, Cote e Delaney (1954), observaram que o ETG pode causar morte em 17 horas a 12 dias, de acordo com a dose ingerida.

Segundo Abramson e Singh (2000), a dose letal estimada para um adulto seria de 100 ml, embora haja relatos de pacientes que sobreviveram com doses acima de 2.000 ml. Na maioria dos casos, o quadro clínico de intoxicação pelo ETG é similar, incluindo coma, hipertensão arterial, acidose, convulsão e morte, tanto pela falência renal acompanhada de anúria e uremia, como pelo edema pulmonar e insuficiência cardíaca.

Os efeitos do ETG em culturas celulares são pouco conhecidos, exceto por um estudo comparativo do ETG com Dietileno Glicol e Propileno Glicol que objetivou determinar a dose inibitória de 50% (ID50) em culturas de células KB (Mochida, Gomyoda, 1987).

2.4 ANÁLISE CRÍTICA DA LITERATURA CIENTÍFICA SOBRE AS COMPATIBILIDADES E INCOMPATIBILIDADES ENTRE RADIAÇÃO GAMA E ÓXIDO DE ETILENO

Em 2007, Souza, autor desta dissertação, constatou que a compatibilidade e a incompatibilidade entre Radiação e EO, como métodos consecutivos de esterilização

foi objeto de investigação de sete estudos primários, considerando, entre eles, a carta original de 1967. Para facilitar a apresentação dos resultados, cada publicação recebeu uma codificação de E1 a E7. Estas publicações encontram-se relacionadas nos dados do Quadro 6, conforme seu código, referência e evidência.

Quadro 6 - Apresentação das publicações que evidenciaram compatibilidade ou incompatibilidade entre Radiação Gama e EO, como métodos consecutivos de esterilização, de acordo com a evidência encontrada

Cód	Referência completa	Evidência
E1	Cunliffe AC, Wesley F. Hazards from plastics sterilized by ethylene oxide. Br Med J. 1967	Incompatibilidade
E2	Lipton B, Gutierrez R, Blaugrund S, Litwak RS, Rendell-Baker L. Irradiated PVC plastic and gas in the production of tracheal stenosis following tracheostomy. Anesth Analg. 1971	Incompatibilidade
E3	Handlos V. Ethylene chlorohydrin formation in radiation and ethylene oxide-sterilized poly(vinyl chloride). Biomaterials. 1984	Incompatibilidade
E4	De Seille JM, Delattre L, Meurice L, Jaminet F. Etude de l'effet d'une sterilisation A l'oxyde d'ethylene sur les teneurs residuelles en chlorhydrine du glycol et en ethyleneglycol dans des articles medico-chirurgicaux a base de pvc, prealablement irradies au cobalt 60. J Pharm Belg. 1985	Incompatibilidade
E5	Bogdansky S, Lehn J. Effects of γ -Irradiation on 2-chloroethanol formation in ethylene oxide-sterilized polyvinyl chloride. J Pharm Sci. 1974	Compatibilidade
E6	Star EG. Gamma-Strahlen und Äthylenoxid-sterilisation. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg. 1980	Compatibilidade
E7	Ceribelli MIPF, Cruz AS, Toledo, HHB. Raios gama e óxido de etileno II: esterilizações incompatíveis? (Análise piloto). Acta Paul Enferm. 1998	Compatibilidade

Nos dados do Quadro 7, são apresentados os aspectos metodológicos dessas publicações:

Quadro 7 - Apresentação das publicações que evidenciaram compatibilidade ou incompatibilidade entre Radiação Gama e EO, como métodos consecutivos de esterilização, de acordo a matéria-prima, parâmetros de esterilização e métodos analíticos empregados

Cód	Material	Esterilização em Radiação Gama	Esterilização em EO	Métodos analíticos	Tipo / Tempo de aeração
E1	PVC	Não informado	Não informado	Extração em água destilada, sangue e/ou solução salina (Métodos de detecção não informados)	O texto sugere que os resíduos foram detectados diariamente até o 6º dia, após esterilização em EO
E2	Cânulas de PVC	Realizada pelo fabricante	120°C e 6 h de exposição	Cromatografia	Três lavagens com ar e 6, 7, 8 e 9 semanas em prateleiras
E3	PVC com os diversos estabilizadores	32 kGy	EO 0,5 g l ⁻¹ , 45°C	Cromatografia	Não realizada
E4	Tubos de PVC rígidos, flexíveis e pó com diferentes intervalos entre as esterilizações	0, 15 e 30 kGy	EO 12% / Freon 88%, 55,6°C, 60% de umidade, 7 psi de pressão, 9 h de exposição	Cromatografia	0, 1, 5, 12, 20, 34, 61, 91 dias
E5	Tubos de PVC	2,5 e 5,0 Mrads.	EO 12% / Freon 88%, concentração de 1.099 mg/l, 55°C, 50 % de umidade, 15 psi de pressão e 4,5 h de exposição	Cromatografia	Ambiental por 0, 2 e 4 dias de
E6	Cânulas de PVC	Realizada pelo fabricante (2,5 Mrads)	EO puro, 55°C e 90 min de exposição	Cromatografia / Citotoxicidade	0, 4 e 21 dias para Cromatografia gasosa / 5 e 7 dias para citotoxicidade
E7	Luvas cirúrgicas e fios cirúrgicos de algodão	Realizada pelo fabricante	210 minutos de exposição	Citotoxicidade	127 minutos, hiperventilação por 60 min sob pressão de 0,50 kgf/cm ² com vácuo intermitente de até -0,50 kgf/cm ² .

Nos dados do Quadro 8, estão apresentadas as sínteses dos resultados de cada publicação:

Quadro 8 – Síntese dos resultados das publicações que evidenciaram compatibilidade ou incompatibilidade entre Radiação Gama e EO, como métodos consecutivos de esterilização

Cód	Resultados
E1	Encontrou-se uma pequena quantidade de Cloreto na água destilada utilizada para a lavagem de tubos de PVC previamente esterilizados em Radiação Gama. Não obstante, uma quantidade considerável de ETCH foi encontrada quando estes tubos foram re-esterilizados em EO.
E2	Evidenciou-se que quantidades “significativas” de ETCH estavam presentes em todas as amostras, mesmo após 9 semanas de aeração.
E3	Constatou-se que a concentração de ETCH formada no PVC flexível pré-irradiado é pequena se comparada àquela formada no PVC mais rígido, em razão de menor intensidade no aquecimento, responsável pela liberação de Cloro, durante sua manufatura e melhores condições de difusão. As quantidades residuais de ETCH também variam, de acordo com os estabilizadores utilizados no polímero.
E4	Observou-se que as concentrações de ETCH aumentaram significativamente com doses maiores de Radiação Gama. Em relação aos tubos flexíveis, os níveis iniciais de ETCH são maiores, porém a cinética de desabsorção é similar mesmo em doses maiores de Radiação Gama. Em relação aos tubos rígidos, em lugar de eliminação de ETCH em função do tempo, notou-se um aumento de sua concentração. De forma geral, um intervalo menor entre as esterilizações determinou maiores quantidades de resíduos.
E5	Observou-se cerca de 350 ppm de ETCH nos materiais não aerados, quantidade não tóxica, segundo os autores.
E6	Foi observado que a re-esterilização em EO do PVC previamente gama irradiado realmente aumenta os níveis de ETCH formada. Mas estes níveis decresciam em função do tempo de aeração. O teste de citotoxicidade demonstrou que, em alguns casos, após 5 dias de aeração, o material não resultava em dano celular, permitindo afirmar que os materiais de PVC pré-irradiados poderiam ser re-esterilizados em EO, desde que o tempo recomendado de aeração fosse cumprido.
E7	Os resultados demonstraram que todas as amostras de luva apresentaram efeito citotóxico, mesmo sem a re-esterilização em EO. Em relação às amostras de fio cirúrgico, mostraram que o nível de citotoxicidade dos fios originais foi limitado à área da amostra, não sendo observadas lesões ao redor, o mesmo acontecendo após a exposição aos dois processos de esterilização, o que revelou ausência de citotoxicidade.

Do ponto de vista metodológico, o estudo E1 (carta original de 1967 que iniciou a polêmica) é frágil, pois não há detalhamento suficiente para torná-lo reprodutível. Portanto, seus resultados são questionáveis. Além disso, nenhum dado experimental quantitativo foi apresentado. Este estudo teve como referência um trabalho realizado por Wesley, Rourke e Darbshire, em 1965, que evidencia a formação de cloridrinas tóxicas em alimentos, quando fumigados com EO, em razão

da presença de Cloro em sua superfície. Não há relato da exposição prévia das amostras à Radiação Gama, portanto, este estudo não sustenta concretamente as afirmações dos autores.

No estudo E2, não há dosagens de referência que permitam classificar as quantidades encontradas, como “significativas”. Não houve determinação da dose de radiação utilizada e nem há especificação da concentração do agente esterilizante, comprometendo a reprodutibilidade do estudo.

O estudo E3 não incluiu o tempo de aeração, após re-esterilização em EO antes das análises, que é determinante na segurança da utilização desses materiais, porém apresentou detalhadamente a composição do PVC utilizado, demonstrando que a mesma interfere nas concentrações residuais do EO e seus subprodutos. Além disso, atentou para as diferenças na eliminação do gás no PVC rígido e no flexível.

O estudo E4 apresentou detalhadamente os parâmetros utilizados para a esterilização, uma variável importante controlada no estudo foi o intervalo entre as esterilizações. Em suas conclusões, os autores afirmam que seria prudente aguardar alguns dias para a “recuperação” do material antes da re-esterilização em EO. Esta variável necessita ser melhor investigada. Outro aspecto importante considerado foi a apresentação do material: rígido, flexível e em pó, que foi determinante na segurança da re-esterilização em EO.

O estudo E5 foi minucioso quanto à descrição dos parâmetros utilizados para as esterilizações. Além disso, foi o primeiro estudo que contestou o estudo E1 que gerou a polêmica da incompatibilidade entre métodos de esterilização. O resultado permitiu que, em 1976, uma publicação assegurasse que, uma vez obedecido o tempo recomendado para aeração dos materiais de PVC, a prévia irradiação desses

materiais não configura uma contraindicação à re-esterilização dos mesmos em EO (Roberts, 1976).

O estudo E6 empregou métodos de quantificação de resíduos e toxicidade em culturas celulares. Mesmo utilizando o EO puro para esterilização, os resultados demonstraram compatibilidade entre os métodos de esterilização. Apesar do uso da cromatografia gasosa para a quantificação dos resíduos do EO e subprodutos, o autor conclui os resultados com base nos testes de toxicidade celular.

Ao contrário dos outros, o estudo E7 utilizou luvas de látex e fios cirúrgicos de algodão como corpos de prova. Apesar de não empregar materiais de PVC, o trabalho chama atenção para a citotoxicidade dos materiais utilizados na assistência à saúde mesmo quando não expostos ao EO, fato que merece mais investigações. Outras características que devem ser destacadas são o emprego e o detalhamento da aeração forçada usada na eliminação dos resíduos do EO e seus subprodutos, que são fundamentais para assegurar os materiais esterilizados nesse método.

Observa-se que existem controvérsias nos resultados dos estudos que utilizaram a cromatografia gasosa como método analítico. O fato pode ser um indicativo de que esse método seja questionável quanto à sensibilidade para evidenciar a resposta das questões norteadoras das pesquisas.

Por outro lado, a análise da toxicidade celular empregada em dois dos estudos analisados demonstrou ser um método passível de ser utilizado, para verificação de morte celular na presença de substâncias tóxicas em materiais submetidos aos processos de esterilização com esses agentes. Os corpos de prova são testados em células vivas, reproduzindo o contato do material contaminado com resíduo tóxico com o organismo humano, tal como ocorreria na prática assistencial.

A análise das evidências presentes nos estudos demonstrou que não existe uma situação em que esse procedimento seja totalmente seguro, pois, com base nos experimentos realizados, a segurança do procedimento teria influência multifatorial como: o tipo da matéria-prima, se o material é flexível ou rígido, conformação do produto, aditivos empregados (estabilizadores), além do tempo de aeração do material após a esterilização em EO. Mas esses fatores foram constatados baseados em estudos que empregaram, em sua maioria, o método analítico da cromatografia gasosa que atualmente é questionado por especialistas.

Esta última afirmação direciona para a necessidade de novos estudos a respeito do tema, utilizando métodos analíticos mais sensíveis que a cromatografia gasosa, justificando a opção pelo teste de citotoxicidade pelo método da difusão em ágar nesta dissertação.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a incompatibilidade ou não da Radiação Gama e do Óxido de Etileno, como métodos consecutivos de esterilização para materiais de PVC.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evidenciar a toxicidade celular dos materiais de PVC “*in natura*”, esterilizados em Raios Gama, esterilizados em Óxido de Etileno e re-esterilizados em Óxido de Etileno, após a esterilização em Radiação Gama.
- Comparar os níveis de toxicidade celular encontrados na busca da confirmação da hipótese de que esta seria maior no PVC re-esterilizado em Óxido de Etileno, após a esterilização em Raios Gama.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 TIPO DE PESQUISA

Este trabalho consiste em um estudo experimental, laboratorial.

4.2 LOCAIS DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS

- **Laboratório de Ensaios Microbiológicos (LEM) do Departamento de Enfermagem Médico Cirúrgica da Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo:** preparo dos grupos experimentais. O LEM é um centro de referência em estudos de segurança no processamento de materiais de assistência à saúde, no alcance de esterilidade e recuperação da carga microbiana em instrumental cirúrgico e odontológico, ao qual o autor desta dissertação é vinculado. O LEM exerce papel de destaque na formação de pesquisadores em níveis de iniciação científica, mestrado e doutorado em sua área de atuação e na divulgação de resultados de pesquisas em periódicos de repercussão internacional.
- **Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN):** esterilização dos materiais em Radiação Gama. O IPEN é uma autarquia do Governo do Estado de São Paulo, vinculada à Secretaria de Desenvolvimento. É gerenciado pela Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN) e é também responsável, em associação com a Universidade de São Paulo, pela condução de programas de pós-graduação em nível de mestrado e doutorado. O referido

Instituto destaca-se pela atuação em vários setores da atividade nuclear, como as aplicações das radiações e radioisótopos, reatores nucleares, materiais, radioproteção e dosimetria (IPEN, 2006b).

- **Instituto Adolfo Lutz (IAL):** realização dos testes de citotoxicidade. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IAL – CEPIAL (Protocolo 53/2009 – Anexo A) e pelo Conselho Técnico Científico do IAL – CTC / IAL (Protocolo 2345/2009-IAL – Anexo B). O IAL é reconhecido internacionalmente por sua competência para responder às ocorrências em sua área de atuação, tendo sido credenciado pelo Ministério da Saúde, como Laboratório Nacional em Saúde Pública e Laboratório de Referência Macrorregional. É um Centro de Referência para Controle de Qualidade Analítica de Micotoxinas e Resíduos de Pesticidas; Coordenador Nacional do Programa de Monitoramento de Matérias Estranhas em Alimentos, Centro de Referência Nacional para Diagnóstico Laboratorial da AIDS; Centro Colaborador da Organização Pan-Americana de Saúde - OPS nas áreas de arbovírus, vírus *influenza* e produção de imunobiológicos e Centro Colaborador da OPS para Culturas Celulares (IAL, 2010).
- A recepção e o envio de materiais para esterilização em EO foram feitas em um hospital público de São Paulo e a esterilização EO com as cromatografias gasosas foram realizadas em uma empresa prestadora de serviços de esterilização nesse método.

4.3 AMOSTRAS

Os corpos de prova utilizados foram tubos de PVC flexível para aspiração de secreções endotraqueais, comercializados como “PVC atóxico” e não esterilizados previamente (RWR®). A escolha do produto justifica-se pela matéria-prima: PVC. Os tubos têm 1,5 metro de comprimento, cerca de 1 cm de diâmetro externo e 0,6 cm de diâmetro interno.

O tamanho da amostra foi calculado por um profissional matemático, supondo que a diferença entre as médias seja de 50% de desvio-padrão. O tamanho da amostra calculado para uma confiança de 95% foi de 74 unidades de análise para um poder de amostra de 99%. Por questões de segurança, foram trabalhadas 81 unidades de análise em cada grupo experimental, podendo-se inferir que o poder da amostra foi superior a 99%.

A legislação brasileira (Brasil, 1999) estabelece limites de tolerância residual para o EO, ETCH e ETG quantificados pela cromatografia gasosa. Para fins comparativos, 18 tubos adicionais (correspondentes aos grupos experimentais esterilizados em EO) foram também submetidos a esta análise.

Em nenhum momento, o responsável técnico que fez a cromatografia gasosa teve acesso aos resultados do teste de citotoxicidade pelo método da difusão em ágar, mantendo-se a conduta “cegada” na pesquisa. O envio dos resultados das cromatografias gasosas foi realizado somente após a finalização dos testes de citotoxicidade.

4.4 DESENHO EXPERIMENTAL

Conforme os dados do Quadro 9, foram criados quatro grupos experimentais (G1 a G4), aleatoriamente constituídos por nove tubos de PVC (Figura 1).

Quadro 9 – Desenho experimental

Grupos	Descrição	Análise
G1	Tubos de PVC <i>in natura</i> .	Citotoxicidade pelo método da difusão em ágar.
G2	Tubos de PVC esterilizados em Raios Gama.	Citotoxicidade pelo método da difusão em ágar.
G3	Tubos de PVC esterilizados em Óxido de Etileno.	Citotoxicidade pelo método da difusão em ágar e Cromatografia gasosa.
G4	Tubos de PVC esterilizados em Raios Gama e re-esterilizadas em Óxido de Etileno.	Citotoxicidade pelo método da difusão em ágar e Cromatografia gasosa.

Figura 1 - Tubo de PVC utilizado nos experimentos.

O tipo de processamento realizado nas amostras de cada grupo experimental será descrito a seguir:

- **G1:** as amostras foram encaminhadas para análise na forma como foram recebidas do fabricante. O teste de citotoxicidade foi realizado, após a exposição dos fragmentos à radiação ultravioleta por 20 minutos, visando à diminuição da carga microbiana.
- **G2:** após a embalagem em papel grau cirúrgico (envelopes autosselantes Vedamax®), as amostras foram encaminhadas ao IPEN para esterilização em Radiação Gama. O processo de irradiação foi realizado no Irradiador Multipropósito de Cobalto 60 do IPEN, localizado em São Paulo. A dose utilizada foi de 25 kGy. O controle de qualidade do processo foi feito por meio do dosímetro tipo Red Perspex 4034, lote de fabricação JB (Harwell®). Após a esterilização, observou-se mudança de coloração nos tubos (Figura 2).

Figura 2 - A: Aspecto do tubo de PVC antes da esterilização em Radiação Gama, B: Aspecto do tubo de PVC, após a esterilização em Radiação Gama.

- **G3:** após a embalagem em papel grau cirúrgico (envelopes autosselantes Vedamax® com um indicador químico classe 5 - Browne®) o grupo foi encaminhado para a esterilização em EO, que foi realizada em uma autoclave de fabricação nacional (Baumer®), nas seguintes condições: mistura de 30% de EO e 70% de CO₂, concentração de 480-600 mg/l, pressão de 0,40 kgf/cm², temperatura de 50° C ± 10° C e umidade relativa de 60 ± 25% (a representação gráfica das condições do ciclo de esterilização correspondem aos Anexos C, D e E). As câmaras foram carregadas, respeitando-se o limite de 80% da capacidade máxima. O processo inicial de aeração ocorreu na própria câmara de esterilização por meio de três pulsos de ar filtrado de aproximadamente 30 minutos para “lavagem” dos materiais. Após esse processo, os materiais foram transferidos para uma câmara específica de aeração mecânica na qual permaneceram durante 10 horas a uma temperatura de 50° C e com 25 trocas de ar por hora. Na empresa que realizou a esterilização em EO, as autoclaves são qualificadas anualmente e os ciclos monitorados por meio de indicadores biológicos de leitura rápida Attest® 1294 (3M®) com esporos de *Bacillus atrophaeus* e indicadores químicos de classe 5 (Browne®). As cromatografias gasosas foram realizadas pelos responsáveis técnicos da empresa com base na Norma NBR ISO 10993-7. Uma vez que os CMEs do Brasil não possuem autoclaves operando a EO e os materiais são esterilizados por empresas terceirizadas, optou-se por um desenho experimental capaz de simular o cotidiano de um CME brasileiro. Para isto, os materiais foram preparados e encaminhados a uma empresa terceirizada de esterilização em EO, com os materiais do CME de um hospital. Tal como ocorre na rotina do CME, às segundas-feiras, por volta das 12 horas, os

materiais eram retirados pela empresa esterilizadora e às quartas-feiras, por volta das 7 horas, os materiais eram devolvidos. Propositalmente, nenhum cuidado adicional foi tomado durante o transporte do material para o CME, visando à reprodução das práticas da empresa esterilizadora.

- **G4:** após a embalagem em papel grau cirúrgico (envelopes autosselantes Vedamax® com um indicador químico classe 5 - Browne®), o grupo foi esterilizado em Radiação Gama nas mesmas condições do grupo G2 (25 kGy) e re-esterilizado em EO nas mesmas condições do grupo G3 (mistura de 30% de EO e 70% de CO₂, concentração de 480-600 mg/l, pressão de 0,40 kgf/cm², temperatura de 50° C ± 10° C e umidade relativa de 60% ± 25%). Por motivos operacionais, o intervalo entre as esterilizações foi de 50 dias.

4.5 TESTE DE CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO DA DIFUSÃO EM ÁGAR

Os procedimentos abaixo descritos foram realizados pelos pesquisadores da Seção de Culturas Celulares do Instituto Adolfo Lutz⁶, com acompanhamento do autor desta dissertação.

4.5.1 Preparo das amostras

Após o processamento dos grupos experimentais, pressupondo que o interior da porção central das amostras apresenta maior dificuldade de aeração, fragmentos de cerca 0,5 cm foram retirados assepticamente dessa região de cada tubo de PVC e

⁶ Dra. Cláudia Regina Gonçalves e Dra. Tamiko Ichikawa Ikeda, sob supervisão da Dra. Áurea Silveira Cruz.

utilizados na preparação das placas conforme o esquema apresentado na Figura 3. Os testes foram realizados em triplicata. Cada fragmento foi testado de forma a representar uma porção do tubo: superfície interna, superfície externa e massa. (Figura 4).

Figura 3 - Esquema da confecção das placas utilizadas no teste de citotoxicidade.

Figura 4 – Disposição dos fragmentos nas placas utilizadas no teste de citotoxicidade pelo método da difusão em ágar - A: Superfície externa - B: Superfície interna - C: Massa.

4.5.2 Culturas Celulares

Conforme recomenda a USP (2009), utilizou-se a linhagem NCTC clone 929 (ATCC-CCL1) para o teste de citotoxicidade pelo método da difusão em ágar.

Em consonância com a descrição de Cruz (2003), o cultivo das células foi realizado em meio mínimo de Eagle, suplementado com 0,1 mM de aminoácidos não essenciais, 1 mM de Piruvato de Sódio e 10% de soro fetal bovino, sem antibiótico. As linhagens foram mantidas a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ em garrafas destinadas ao cultivo de células. A dispersão da monocamada de células foi realizada utilizando-se uma solução de Tripsina 0,20% e Versene 0,02%. Após a dispersão, as células foram ressuspensas em meio de cultura e distribuídas nas placas de Petri utilizadas nos testes de citotoxicidade.

4.5.3 Teste de citotoxicidade pelo método da difusão em ágar

Este ensaio permite uma avaliação qualitativa da toxicidade celular (ISO 10993-5, 2009). O ágar semissólido promove a proteção mecânica da monocamada de células, porém, permitindo a difusão de substâncias químicas da amostra (USP, 2009).

Os testes foram realizados em capela de fluxo laminar e segundo o pré-protocolado por Cruz (2003). As células NCTC clone 929 foram semeadas em placas de Petri tratadas para culturas celulares com dimensões de 60x15 mm (TPP®), em concentrações de 3×10^5 células/ml e em volumes de 5 ml. As culturas foram incubadas por 48 horas a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ em atmosfera contendo 5% de CO_2 . Após este período, as monocamadas foram avaliadas quanto à confluência, e o meio de cultura substituído por um meio *overlay* composto de meio de Eagle duas vezes concentrado

e ágar (BD®) a 1,8% com 0,01% do corante vital vermelho neutro (National Aniline Division®) - Figura 5. Na preparação, o ágar foi proporcionalmente misturado (1:1) ao meio de Eagle, ambos a 44°C.

Figura 5 – Fotomicrografia da monocamada confluyente de células coradas após 24 horas da deposição do meio *overlay* (840x).

Após o preparo das placas, os três fragmentos do tubo de PVC cada qual representando uma parte do tubo (superfície interna, superfície externa e massa), foram assepticamente colocados sobre o meio *overlay*. Em seguida, foi realizada a incubação das culturas a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ em atmosfera contendo 5% de CO_2 por 24 horas.

A toxicidade celular foi constatada microscopicamente pela alteração da morfologia das células ao redor ou sob o corpo de prova (Figuras 6 e 7) e macroscopicamente pela formação do halo incolor ao redor do material citotóxico, Figura 8 (Cruz et al., 1987, Cruz et al., 1998, Cruz, 2003, Rogero et al., 2003). A formação do halo é consequência da ação citotóxica da amostra que promove o

rompimento da membrana celular, liberando o corante vital e caracterizando o halo incolor (Vidal, 2007, USP, 2009).

Figura 6 – Fotomicrografia da monocamada de células observadas no halo incolor (840x).

Figura 7 – Fotomicrografia da monocamada de células após 24 horas de contato da amostra com o meio *overlay* - A: Amostra - B: Células do halo incolor - C: Células coradas (420x).

Figura 8 – Visão panorâmica da placa contendo o meio *overlay* sobre a monocamada de células NCTC clone 929 - A: Halo característico de citotoxicidade ao redor de uma amostra de látex utilizado como controle positivo - B: Extensão do halo.

Como controle negativo, foram utilizados discos de aproximadamente 0,5 cm de papel filtro, e, como controle positivo, fragmentos de aproximadamente 0,5 cm de látex (nas formas de garrote ou elástico). Considerou-se o teste válido quando o controle positivo resultou em um halo de no mínimo 0,5 cm e o controle negativo sem resposta biológica (Figuras 9 e 10, respectivamente).

Figura 9 – Controle positivo: Látex.

Figura 10 – Controle negativo: Papel filtro.

Após a medição da extensão do halo incolor baseada na amostra (Figura 8), a citotoxicidade foi graduada, de acordo com os graus de reatividade para o teste de difusão em ágar descritos pela Norma ISO 10993-5:2009 e apresentados nos dados do Quadro 10. Os graus de reatividade maiores que dois foram considerados citotóxicos.

Quadro 10 – Graus de reatividade biológica para o teste de citotoxicidade pelo método da difusão em ágar, segundo a Norma ISO 10993-5:2009

Grau	Reatividade	Descrição da zona de reatividade	Citotoxicidade
0	Nenhuma	Zona não detectável sob ou ao redor da amostra.	Negativa
1	Leve	Algumas células malformadas ou degeneradas sob a amostra.	Negativa
2	Branda	Zona limitada a área sob a amostra.	Negativa
3	Moderada	Zona estendendo-se até 1 cm da amostra.	Positiva
4	Grave	Zona estendendo-se por mais de 1 cm da amostra.	Positiva

5 RESULTADOS

Nos dados dos Quadros 11, 12, 13 e 14 estão apresentados os resultados do teste de citotoxicidade pelo método da difusão em ágar dos grupos G1 a G4, considerando a extensão do halo, o grau de reatividade biológica, de acordo com a norma ISO 10993-5:2009 e o efeito citotóxico, que foi considerado positivo quando o grau de reatividade biológica foi superior a dois.

Quadro 11 – Resultados do teste de citotoxicidade do grupo G1. São Paulo, 2009

Superfície externa									
	R1			R2			R3		
T	Comprimento do halo	Grau de reatividade	Efeito Citotóxico	Comprimento do halo	Grau de reatividade	Efeito Citotóxico	Comprimento do halo	Grau de reatividade	Efeito Citotóxico
A	-	0	-	-	0	-	-	0	-
B	-	0	-	-	0	-	-	0	-
C	-	0	-	-	0	-	-	0	-
D	-	0	-	-	0	-	-	0	-
E	-	0	-	-	0	-	-	0	-
F	-	0	-	-	0	-	-	0	-
G	-	0	-	-	0	-	-	0	-
H	-	0	-	-	0	-	-	0	-
I	-	0	-	-	0	-	-	0	-

Superfície interna									
	R1			R2			R3		
T	Comprimento do halo	Grau de reatividade	Efeito Citotóxico	Comprimento do halo	Grau de reatividade	Efeito Citotóxico	Comprimento do halo	Grau de reatividade	Efeito Citotóxico
A	-	0	-	-	0	-	-	0	-
B	-	0	-	-	0	-	-	0	-
C	-	0	-	-	0	-	-	0	-
D	-	0	-	-	0	-	-	0	-
E	-	0	-	-	0	-	-	0	-
F	-	0	-	-	0	-	-	0	-
G	-	0	-	-	0	-	-	0	-
H	-	0	-	-	0	-	-	0	-
I	-	0	-	-	0	-	-	0	-

Continua

Massa									
	R1			R2			R3		
T	Comprimento do halo	Grau de reatividade	Efeito Citotóxico	Comprimento do halo	Grau de reatividade	Efeito Citotóxico	Comprimento do halo	Grau de reatividade	Efeito Citotóxico
A	-	0	-	-	0	-	-	0	-
B	-	0	-	-	0	-	-	0	-
C	-	0	-	-	0	-	-	0	-
D	-	0	-	-	0	-	-	0	-
E	-	0	-	-	0	-	-	0	-
F	-	0	-	-	0	-	-	0	-
G	-	0	-	-	0	-	-	0	-
H	-	0	-	-	0	-	-	0	-
I	-	0	-	-	0	-	-	0	-

R1, R2 e R3 – Replicatas 1, 2 e 3.

Quadro 12 – Resultados do teste de citotoxicidade do grupo G2. São Paulo, 2010

Superfície externa									
	R1			R2			R3		
T	Comprimento do halo	Grau de reatividade	Efeito Citotóxico	Comprimento do halo	Grau de reatividade	Efeito Citotóxico	Comprimento do halo	Grau de reatividade	Efeito Citotóxico
A	-	0	-	-	0	-	-	0	-
B	-	0	-	-	0	-	-	0	-
C	-	0	-	-	0	-	-	0	-
D	-	0	-	-	0	-	-	0	-
E	-	0	-	-	0	-	-	0	-
F	-	0	-	-	0	-	-	0	-
G	-	0	-	-	0	-	-	0	-
H	-	0	-	-	0	-	-	0	-
I	-	0	-	-	0	-	-	0	-

Superfície interna									
	R1			R2			R3		
T	Comprimento do halo	Grau de reatividade	Efeito Citotóxico	Comprimento do halo	Grau de reatividade	Efeito Citotóxico	Comprimento do halo	Grau de reatividade	Efeito Citotóxico
A	-	0	-	-	0	-	-	0	-
B	-	0	-	-	0	-	-	0	-
C	-	0	-	-	0	-	-	0	-
D	-	0	-	-	0	-	-	0	-
E	-	0	-	-	0	-	-	0	-
F	-	0	-	-	0	-	-	0	-
G	-	0	-	-	0	-	-	0	-
H	-	0	-	-	0	-	-	0	-
I	-	0	-	-	0	-	-	0	-

Continua

Massa									
	R1			R2			R3		
T	Comprimento do halo	Grau de reatividade	Efeito Citotóxico	Comprimento do halo	Grau de reatividade	Efeito Citotóxico	Comprimento do halo	Grau de reatividade	Efeito Citotóxico
A	-	0	-	-	0	-	-	0	-
B	-	0	-	-	0	-	-	0	-
C	-	0	-	-	0	-	-	0	-
D	-	0	-	-	0	-	-	0	-
E	-	0	-	-	0	-	-	0	-
F	-	0	-	-	0	-	-	0	-
G	-	0	-	-	0	-	-	0	-
H	-	0	-	-	0	-	-	0	-
I	-	0	-	-	0	-	-	0	-

R1, R2 e R3 – Replicatas 1, 2 e 3.

Quadro 13 – Resultados do teste de citotoxicidade do grupo G3. São Paulo, 2010

Superfície externa									
	R1			R2			R3		
T	Comprimento do halo	Grau de reatividade	Efeito Citotóxico	Comprimento do halo	Grau de reatividade	Efeito Citotóxico	Comprimento do halo	Grau de reatividade	Efeito Citotóxico
A	S	2	-	0,1	3	+	0,1	3	+
B	0,1	3	+	S	2	-	0,1	3	+
C	S	2	-	S	2	-	S	2	-
D	S	2	-	0,2	3	+	PI	4	+
E	0,1	3	+	S	2	-	0,2	3	+
F	PI	4	+	PI	4	+	PI	4	+
G	PI	4	+	PI	4	+	PI	4	+
H	0,2	3	+	0,2	3	+	0,2	3	+
I	S	2	-	0,2	3	+	PI	4	+

Superfície interna									
	R1			R2			R3		
T	Comprimento do halo	Grau de reatividade	Efeito Citotóxico	Comprimento do halo	Grau de reatividade	Efeito Citotóxico	Comprimento do halo	Grau de reatividade	Efeito Citotóxico
A	S	2	-	S	2	-	0,1	3	+
B	0,2	3	+	0,2	3	+	0,2	3	+
C	0,1	3	+	S	2	-	0,2	3	+
D	0,3	3	+	0,2	3	+	PI	4	+
E	0,2	3	+	0,1	3	+	0,3	3	+
F	PI	4	+	PI	4	+	PI	4	+
G	PI	4	+	PI	4	+	PI	4	+
H	0,3	3	+	0,4	3	+	0,2	3	+
I	PI	4	+	PI	4	+	PI	4	+

Continua

Massa									
	R1			R2			R3		
T	Comprimento do halo	Grau de reatividade	Efeito Citotóxico	Comprimento do halo	Grau de reatividade	Efeito Citotóxico	Comprimento do halo	Grau de reatividade	Efeito Citotóxico
A	S	2	-	S	2	-	0,1	3	+
B	S	2	-	0,1	3	+	0,1	3	+
C	S	2	-	S	2	-	S	2	-
D	0,1	3	+	0,1	3	+	PI	4	+
E	0,1	3	+	S	2	-	0,1	3	+
F	PI	4	+	PI	4	+	PI	4	+
G	PI	4	+	PI	4	+	PI	4	+
H	0,1	3	+	0,2	3	+	S	2	-
I	0,1	3	+	0,1	3	+	PI	4	+

R1, R2 e R3 – Replicatas 1, 2 e 3.

S – Efeitos limitados sob a área da amostra.

PI – Citotoxicidade constatada na placa inteira.

Quadro 14 - Resultados do teste de citotoxicidade do grupo G4. São Paulo, 2010

Superfície externa									
	R1			R2			R3		
T	Comprimento do halo	Grau de reatividade	Efeito Citotóxico	Comprimento do halo	Grau de reatividade	Efeito Citotóxico	Comprimento do halo	Grau de reatividade	Efeito Citotóxico
A	-	0	-	-	0	-	-	0	-
B	S	2	-	S	2	-	S	2	-
C	?	?	?	-	0	-	S	1	-
D	-	0	-	-	0	-	-	0	-
E	-	0	-	-	0	-	-	0	-
F	S	2	-	-	0	-	-	0	-
G	S	1	-	S	2	-	S	1	-
H	-	0	-	-	0	-	S	1	-
I	-	0	-	-	0	-	-	0	-

Superfície interna									
	R1			R2			R3		
T	Comprimento do halo	Grau de reatividade	Efeito Citotóxico	Comprimento do halo	Grau de reatividade	Efeito Citotóxico	Comprimento do halo	Grau de reatividade	Efeito Citotóxico
A	-	0	-	S	1	-	-	0	-
B	S	2	-	S	2	-	-	0	-
C	?	?	?	-	0	-	S	2	-
D	-	0	-	-	0	-	-	0	-
E	-	0	-	-	0	-	S	2	-
F	-	0	-	-	0	-	-	0	-
G	S	2	-	S	2	-	S	2	-
H	S	1	-	S	2	-	-	0	-
I	S	2	-	S	1	-	-	0	-

Continua

Massa									
	R1			R2			R3		
T	Comprimento do halo	Grau de reatividade	Efeito Citotóxico	Comprimento do halo	Grau de reatividade	Efeito Citotóxico	Comprimento do halo	Grau de reatividade	Efeito Citotóxico
A	-	0	-	-	0	-	-	0	-
B	-	0	-	-	0	-	-	0	-
C	?	?	?	-	0	-	-	0	-
D	-	0	-	-	0	-	-	0	-
E	-	0	-	-	0	-	-	0	-
F	-	0	-	-	0	-	-	0	-
G	-	0	-	-	0	-	-	0	-
H	-	0	-	-	0	-	-	0	-
I	-	0	-	-	0	-	-	0	-

R1, R2 e R3 – Replicatas 1, 2 e 3.

S – Efeitos limitados sob a área da amostra.

? – Estes resultados não foram considerados em razão de alterações morfológicas irregulares nas células.

No grupo G3, quatro tubos apresentaram replicatas nas quais foi observada a morte de todas as células da placa. Para dirimir a dúvida quanto ao potencial efeito citotóxico destes tubos, optou-se pela repetição de quatro amostras. Os resultados desta repetição estão representados nos dados do Quadro 15:

Quadro 15 – Resultados da repetição do teste citotoxicidade em quatro novas amostras relacionadas ao grupo G3. São Paulo, 2010

Superfície externa									
	R1			R2			R3		
T	Comprimento do halo	Grau de reatividade	Efeito Citotóxico	Comprimento do halo	Grau de reatividade	Efeito Citotóxico	Comprimento do halo	Grau de reatividade	Efeito Citotóxico
A	-	0	-	S	2	-	S	2	-
B	-	0	-	-	0	-	S	2	-
C	S	2	-	-	0	-	S	2	-
D	S	2	-	-	0	-	-	0	-

Superfície interna									
	R1			R2			R3		
T	Comprimento do halo	Grau de reatividade	Efeito Citotóxico	Comprimento do halo	Grau de reatividade	Efeito Citotóxico	Comprimento do halo	Grau de reatividade	Efeito Citotóxico
A	-	0	-	S	2	-	S	2	-
B	-	0	-	PI	4	+	PI	4	+
C	-	0	-	-	0	-	S	2	-
D	PI	4	+	PI	4	+	PI	4	+

Continua

Massa									
	R1			R2			R3		
T	Comprimento do halo	Grau de reatividade	Efeito Citotóxico	Comprimento do halo	Grau de reatividade	Efeito Citotóxico	Comprimento do halo	Grau de reatividade	Efeito Citotóxico
A	-	0	-	S	2	-	S	2	-
B	-	0	-	PI	4	+	PI	4	+
C	-	0	-	-	0	-	S	2	-
D	PI	4	+	PI	4	+	PI	4	+

R1, R2 e R3 – Replicatas 1, 2 e 3.

S – Efeitos limitados sob a área da amostra.

PI – Citotoxicidade constatada na placa inteira.

Em razão da discrepância entre a quantidade de amostras negativas quanto à citotoxicidade entre esta repetição e o grupo G3 original, além da persistência de amostras cujo resultado revelou a morte de todas as células da placa, confirmando a citotoxicidade encontrada no grupo G3 original, julgou-se necessária a realização de uma segunda repetição. Os resultados estão representados nos dados do Quadro 16:

Quadro 16 – Resultados da segunda repetição do teste citotoxicidade em quatro novas amostras relacionadas ao grupo G3. São Paulo, 2010

Superfície externa									
	R1			R2			R3		
T	Comprimento do halo	Grau de reatividade	Efeito Citotóxico	Comprimento do halo	Grau de reatividade	Efeito Citotóxico	Comprimento do halo	Grau de reatividade	Efeito Citotóxico
A	-	0	-	-	0	-	-	0	-
B	-	0	-	-	0	-	-	0	-
C	-	0	-	-	0	-	-	0	-
D	S	2	-	S	2	-	S	2	-

Superfície interna									
	R1			R2			R3		
T	Comprimento do halo	Grau de reatividade	Efeito Citotóxico	Comprimento do halo	Grau de reatividade	Efeito Citotóxico	Comprimento do halo	Grau de reatividade	Efeito Citotóxico
A	-	0	-	-	0	-	-	0	-
B	-	0	-	-	0	-	-	0	-
C	-	0	-	-	0	-	-	0	-
D	-	0	-	CMD	1	-	S	2	-

Continua

Massa									
	R1			R2			R3		
T	Comprimento do halo	Grau de reatividade	Efeito Citotóxico	Comprimento do halo	Grau de reatividade	Efeito Citotóxico	Comprimento do halo	Grau de reatividade	Efeito Citotóxico
A	-	0	-	-	0	-	-	0	-
B	-	0	-	-	0	-	-	0	-
C	-	0	-	-	0	-	-	0	-
D	S	2	-	-	0	-	-	0	-

R1, R2 e R3 – Replicatas 1, 2 e 3.

S – Efeitos limitados sob a área da amostra.

CMD – Células malformadas ou degeneradas sob a amostra.

Nos dados da Tabela 1, os números das unidades de análise positivas e negativas dos grupos G1, G2, G3 e G4 estão apresentados.

Tabela 1 - Número de amostras positivas e negativas nos grupos G1, G2, G3 e G4, de acordo com a porção testada. São Paulo, 2010

Porções testadas	Número de amostras									
	G1		G2		G3		G4			
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Superfície externa	0	27	0	27	19	8	0		0	26
Superfície interna	0	27	0	27	24	3	0		0	26
Massa	0	27	0	27	19	8	0		0	26
Total	0	81	0	81	62	19	0		0	78

Nos dados da Tabela 2, são apresentados os números de unidades de análise positivas e negativas do grupo G3 e nas duas repetições.

Tabela 2 - Número de amostras positivas e negativas no grupo G3 e nas repetições, de acordo com a porção testada. São Paulo, 2010

Porções testadas	Número de amostras					
	G3		Rep 1		Rep 2	
	+	-	+	-	+	-
Superfície externa	19	8	0	12	0	12
Superfície interna	24	3	5	7	0	12
Massa	19	8	1	11	0	12
Total	62	19	6	30	0	36

As Figuras 11 e 12 apresentam respectivamente os números de unidades de análise em função do grau de reatividade biológica, segundo a porção testada nos grupos G3 e G4, e os número das unidades de análise em função apenas do grau de reatividade biológica nos grupos G3 e G4.

Legenda: SE: Superfície externa, SI: Superfície interna e M: Massa.

Figura 11 - Distribuição das unidades de análise em função do grau de reatividade biológica, segundo a porção testada nos grupos G3 e G4. São Paulo, 2010

Figura 12 - Distribuição das unidades de análise em função do grau de reatividade biológica nos grupos G3 e G4. São Paulo, 2010

Nos dados do Quadro 17, estão representados os resultados dos grupos controle positivo e negativo do teste de citotoxicidade pelo método da difusão em ágar.

Quadro 17 – Resultado dos controles positivos e negativos utilizados no teste de citotoxicidade pelo método da difusão em ágar. São Paulo, 2010

Grupo	Controle + (látex)	Controle – (papel filtro)
G1	0,5	-
G2	0,5	-
G3	0,5	-
Repetição 1	0,7	-
Repetição 2	0,7	-
G4	0,7	-

Nos dados dos Quadros 18 e 19 estão representados os resultados da Cromatografia Gasosa fornecidos pela empresa responsável pela esterilização dos grupos G3 e G4.

Quadro 18 - Quantificação de resíduos de EO e subprodutos no grupo G3 pela cromatografia gasosa. São Paulo, 2010*

Tubo	EO (ppm)	ETCH (ppm)	ETG (ppm)
A	20	<5	<25
B	20	<5	<25
C	24	<5	<25
D	19	<5	<25
E	19	<5	<25
F	21	<5	<25
G	20	<5	<25
H	22	<5	<25
I	23	<5	<25

*Dados fornecidos pela empresa que realizou as esterilizações em EO.

Quadro 19 - Quantificação de resíduos de EO e subprodutos no grupo G4 pela cromatografia gasosa. São Paulo, 2010*

Tubo	EO (ppm)	ETCH (ppm)	ETG (ppm)
A	22	<5	<25
B	24	<5	<25
C	19	<5	<25
D	22	<5	<25
E	19	<5	<25
F	21	<5	<25
G	21	<5	<25
H	19	<5	<25
I	22	<5	<25

*Dados fornecidos pela empresa que realizou as esterilizações em EO.

6 DISCUSSÃO

Os resultados encontrados no grupo G1 atestam à informação do fabricante quanto à natureza atóxica do tubo de PVC. O teste dos materiais no estado *in natura* permitiu afastar erros de interpretação quanto à citotoxicidade dos materiais submetidos a processos de esterilização.

Nos estudos experimentais que buscaram evidenciar compatibilidades e incompatibilidades entre Radiação Gama e EO, os autores demonstraram preocupação com a quantificação dos resíduos de EO e subprodutos e não buscaram analisar as amostras no estado *in natura* quanto à sua possível toxicidade. Star (1980) e Ceribelli, Cruz e Toledo (1998) consideraram grupos comparativos esterilizados em Radiação Gama e não re-esterilizados em EO. No segundo estudo citado, as autoras constataram que amostras do látex utilizado na confecção de luvas cirúrgicas podem causar danos às células em cultura, mesmo quando não re-esterilizadas em EO. O resultado levanta dois questionamentos: o primeiro, diz respeito à possível natureza citotóxica do látex independente de sua esterilização e o segundo diz respeito à possível influência da Radiação Gama na citotoxicidade do látex, supostamente atóxico no estado *in natura*.

Os resultados dos grupos G1 e G2 demonstraram que os tubos utilizados são de natureza atóxica, e esta natureza foi mantida independente da esterilização em Radiação Gama e da porção considerada (superfície interna, externa e massa), sugerindo que o risco na utilização desses tubos estaria relacionado somente com sua esterilização em EO. No trabalho de Star (1980), as amostras esterilizadas somente pela Radiação Gama não produziram efeito citotóxico em fibroblastos mesmo após 48h, concordando com os resultados obtidos com o grupo G2. Diversos autores

analisaram comparativamente a citotoxicidade em função do método de esterilização empregado em outras matérias-primas. De forma geral, a Radiação Gama é um dos métodos de esterilização que menos influenciam a toxicidade dos materiais quando testados em culturas celulares, sobretudo em doses de 25 kGy ou acima (Albanese et al., 1994, Marreco et al., 2004, Haugen et al., 2007).

Com base nas interações entre os Raios Gama e o PVC descritas por Rodolfo Jr, Nunes e Ormanji (2002), a mudança de coloração observada nos tubos após a esterilização em Radiação Gama foi esperada. Esta condição aparentou não influir na natureza atóxica apresentada pelo PVC.

No estudo de Star (1980), a dose utilizada para esterilizar os corpos de prova foi de 2,5 Mrads (25 kGy). Estes não produziram dano ou morte celular em culturas de fibroblastos, assim como nos resultados do grupo G2. Nenhuma das publicações que evidenciaram incompatibilidade entre os métodos de esterilização avaliou a citotoxicidade dos materiais esterilizados somente em Radiação Gama.

O estudo de DeSeille e colaboradores (1985) demonstrou que a utilização de doses maiores de Radiação Gama aumenta a quantidade de resíduos em materiais re-esterilizados em EO. Mas, pressupondo que a quantidade residual de EO e subprodutos está diretamente relacionada à aeração, pode-se afirmar que uma vez obedecidos o tempo e o tipo de aeração apropriados a estes materiais, a esterilização sucessiva em EO poderia ser realizada independente da dose utilizada na esterilização em Radiação Gama. Neste mesmo estudo, os autores evidenciaram que intervalos mais curtos entre os processos de esterilização determinam maiores quantidades de resíduos. Apesar de pouco investigada, esta condição aparenta ser facilmente superada pela aeração adequada. Portanto, é imprescindível que as recomendações de aeração da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do

Ministério da Saúde (8 horas a 60°C ou 12 horas a 50°C) sejam obedecidas (Brasil, s/d).

As mesmas considerações são válidas no que se refere à composição do material, portanto, mesmo que a composição do PVC influencie na quantidade residual de EO e subprodutos, conforme o resultado de Handlos (1984), a aeração quando realizada de forma apropriada pode removê-los, tornando-os seguros para uso.

É essencial que os processos de aeração otimizem a utilização dos materiais esterilizados em EO, tornando-os seguros em tempos compatíveis com as necessidades da prática assistencial. Nota-se que os estudos que investigaram o tema, exceto o de Ceribelli, Cruz e Toledo (1998), utilizaram aeração ambiental que pode demandar dias e/ou semanas, o que seria impraticável em um estabelecimento prestador de serviços de esterilização em EO. Além disso, o emprego de métodos de aeração ambiental e com condições não controladas ou não adequadamente explicitadas fragilizou os resultados destas publicações.

No grupo G3 original, foram observados graus de reatividade acima do aceitável, inclusive com perda total da monocamada das placas em quatro amostras. Na primeira repetição, observou-se uma diminuição na frequência de amostras positivas para citotoxicidade quando comparadas ao grupo G3 original, assim como a persistência das amostras que resultaram na perda de toda a monocamada restritas a superfície interna. Por isso, realizou-se uma segunda repetição, e os resultados demonstraram que todas as amostras foram negativas quanto à citotoxicidade. A discordância nos resultados positivos e negativos para a toxicidade no experimento original e nas repetições permitiu a conclusão de que houve uma falha no procedimento de aeração adotado pela empresa que realizou a esterilização, uma vez

que as condições do teste de citotoxicidade foram mantidas no grupo e nas repetições. Considerando a redução da frequência de amostras positivas nas repetições e que os ciclos de esterilizações foram realizados em dias diferentes, sob as mesmas condições, infere-se que as falhas relacionadas ao número de amostras positivas encontradas no grupo G3 original e na primeira repetição foram restritas aos ciclos de esterilização desses grupos.

Desta forma, a frequência de amostras positivas observadas no grupo G3 original e na primeira repetição não foi observada na segunda repetição. Mesmo que não esperados, os resultados do grupo G3 original e da segunda repetição demonstram a necessidade do controle de qualidade dos materiais esterilizados em EO, pois a utilização desses materiais poderia trazer consequências graves aos pacientes.

Em relação à disposição das unidades de análise nas placas, quando se compararam as proporções entre os graus de reatividade biológica 2, 3 e 4 para a superfície externa, interna e massa dentro do grupo G3, o teste do Qui-Quadrado não revelou diferença significativa ($p = 0,487$); portanto, não houve diferenças na citotoxicidade evidenciada pelas superfícies externa, interna e massa.

Mas é importante observar que o material utilizado nesta pesquisa destina-se à aspiração de secreções. Ao considerar um dispositivo intravascular, é possível afirmar que, além do risco associado à toxicidade, há também uma possível ação traumática causada pela superfície externa do dispositivo no sítio de inserção. Além do mais, a infusão de substâncias pela superfície interna desse mesmo dispositivo poderia eluir os resíduos de EO e subprodutos, concentrando estas substâncias com conseqüente aumento do efeito citotóxico. Em outras palavras, é preciso considerar

que o método empregado nesta dissertação reproduziu apenas o contato indireto entre o material citotóxico com uma monocamada de células.

Os resultados da cromatografia gasosa para quantificação dos resíduos de EO e subprodutos fornecidos pela empresa que realizou a esterilização foram controversos quando comparados aos resultados do teste de citotoxicidade. Os tubos de PVC utilizados como corpos de prova são destinados à esterilização em EO.

Desse modo, o fabricante, apoiado na legislação, determina os seguintes limites máximos de resíduos: 250 ppm de EO, 250 ppm de ETCH e 5.000 ppm de ETG. Nos resultados do grupo G3 original, os valores máximos encontrados foram: 24 ppm de EO, menos de 5 ppm de ETCH e menos de 25 ppm de ETG. Nos resultados de McGuningle e colaboradores (1975), que também utilizaram o teste de citotoxicidade pelo método da difusão em ágar em células L929 e a cromatografia gasosa para quantificação dos resíduos, observou-se que 900 ppm de EO não produziram efeito citotóxico.

Supondo que o teste de citotoxicidade realizado McGuningle e colaboradores (1975) seja válido, não haveria qualquer problema em utilizar um material contendo 900 ppm, contrariando as recomendações do *FDA*. Ao considerar os resultados do teste de citotoxicidade do grupo G3 quando associado aos valores obtidos pela cromatografia que evidenciou concentrações máximas de 24 ppm de EO e capazes de produzir graus inaceitáveis de citotoxicidade, a utilização da cromatografia gasosa para atestar a segurança no uso dos materiais esterilizados em EO é questionável, pois o método produz dados contraditórios.

O fato fica evidente ao relacionarmos os resultados do grupo G4, no qual se esperava maior toxicidade aos valores obtidos pela cromatografia (máximo de 24 ppm de EO, menos de 5 ppm de ETCH e menos de 25 ppm de ETG). Os mesmos

valores produziram diferentes respostas quanto à toxicidade na mesma linhagem celular, colocando em dúvida a sensibilidade da cromatografia quando comparada aos testes de citotoxicidade.

Schiewe e colaboradores (1985) determinaram que o tempo mínimo de aeração para placas de poliestireno esterilizadas pelo EO é 12 horas maior que o recomendado pelo próprio fabricante, quando o método biológico de análise foi empregado. Em 2005, Silva e Pinto utilizaram o teste de toxicidade para comprovar que a aeração usada no estudo de reutilização simulada de materiais de uso único esterilizados em EO foi eficaz na redução dos resíduos de forma a não causar reações de toxicidade, sugerindo que os testes de citotoxicidade podem ser empregados na avaliação e validação dos processos de aeração.

Em relação ao grupo G4, a hipótese inicial da pesquisa de que nesse grupo a toxicidade seria maior, não se confirmou. O método biológico *in vitro* empregado nesta dissertação permite a constatação de morte celular na presença de substâncias tóxicas em materiais submetidos a processos de esterilização quaisquer que sejam. As amostras foram testadas empregando-se em células vivas, reproduzindo o contato do material com resíduo tóxico com o organismo, tal como ocorreria na prática assistencial.

Portanto, independente da porção do tubo considerada (superfície interna, externa e massa), as amostras mantiveram-se dentro dos graus aceitáveis de reatividade biológica, dirimindo a dúvida quanto à possível incompatibilidade entre a Radiação Gama e EO, como métodos consecutivos de esterilização e demonstrando que o uso isolado da cromatografia gasosa para determinar a segurança de materiais esterilizados em EO pode conduzir erros na tomada de decisões, conforme evidenciado pela revisão da literatura científica que abordou o tema.

7 CONCLUSÃO

A análise dos resultados dos experimentos realizados permite as seguintes conclusões:

- Nas condições deste experimento, os tubos de PVC quando *in natura* (G1), quando esterilizados em Radiação Gama (G2) e quando re-esterilizados em EO, após a esterilização em Radiação Gama (G4) não se mostraram citotóxicos.
- Os materiais de PVC esterilizados em Radiação Gama e, consecutivamente, re-esterilizados em EO utilizados nos experimentos não se mostraram citotóxicos, refutando a hipótese inicial de que a citotoxicidade deste grupo seria maior em relação aos outros grupos experimentais.
- Apesar de não fazer parte dos objetivos desta investigação, os procedimentos metodológicos empregados permitiram observar que o teste de citotoxicidade pelo método da difusão em ágar foi mais sensível para assegurar os materiais esterilizados em EO do que a cromatografia gasosa.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo se limitou à investigação do efeito citotóxico causado pelos resíduos do EO e subprodutos. A suposta influência de variáveis empregadas no ciclo de esterilização em EO, como tempo, umidade e temperatura, na citotoxicidade do PVC não foram consideradas. Entretanto, com base nos resultados negativos quanto ao efeito citotóxico evidenciados no grupo G4, a possível influência destas variáveis na toxicidade dos tubos de PVC estaria descartada.

No Brasil, em razão das restrições impostas pela legislação (Brasil, 1999), a esterilização em EO é restrita a empresas destinadas a este fim, portanto, a necessidade de realizar este procedimento em uma empresa terceirizada resultou na perda de governabilidade em partes do estudo. Isto se reflete nos resultados não esperados do grupo G3 original e na primeira repetição.

Quanto aos materiais, é necessário reconhecer que pode haver variabilidade em sua composição, dificultando a generalização desses resultados. Além do mais, o presente estudo utilizou materiais de conformação simples (tubos), portanto, materiais de conformação complexa e/ou grandes dimensões ainda podem constituir um desafio quanto ao controle de resíduos de EO e subprodutos. Recomenda-se que os estudos de compatibilidade entre métodos de esterilização sejam realizados em amostras representativas de cada produto que se pretende re-esterilizar e não apenas com base nas diferentes matérias primas em razão da variabilidade nas composições.

9 REFERÊNCIAS

Abdo N. Aeração de artigos odonto-médico-hospitalares reprocessados a óxido de etileno: a prática em empresas prestadoras de serviço terceirizado [Dissertação]. Campinas: Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas; 2006.

Abramson S, Singh AK. Treatment of the alcohol intoxications: ethylene glycol, methanol and isopropanol. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2000 Nov;9(6):695-701.

Ackerman SB, Stokes GL, Swanson RJ, Taylor SP, Fenwick L. Toxicity testing for human in vitro fertilization programs. *J In Vitro Fert Embryo Transf*. 1985; 2(3):132-7.

Albanese A, Barbucci R, Belleville J, Bowry S, Eloy R, Lemke HD, Sabatini L. In vitro biocompatibility evaluation of a heparinizable material (PUPA), based on polyurethane and poly(amido-amine) components. *Biomaterials*. 1994 Jan;15(2):129-36.

Alves PMM, Carrondo MJT, Cruz PE. Introdução à tecnologia de cultivo de células animais. In: Moraes AM, Augusto EFP, Castilho, L. Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica. São Paulo: Roca; 2007. p. 1-14.

Andersen SR. Ethylene oxide toxicity: A study of tissue reactions to retained ethylene oxide. *J Lab Clin Med*. 1971; 77(2):346-356.

Artel BWH. Efeitos da radiação em polímeros. *Plástico Moderno On-line*. 2000 [citado 2008 Mar 28]; 312. Disponível em:
<<http://www.plastico.com.br/revista/pm312/radiacao2.htm>>

Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 10993-7. 2005. Avaliação biológica de produtos para saúde - Parte 7: Resíduos da esterilização por óxido de etileno.

Ballotta F, Bertagni P, Troisi FM. Acute Poisoning Caused by Ingestion of Ethylene Chlorohydrin. *Br J Ind Med*. 1953; 10(3): 161-163.

Biro L, Fisher AA, Price E. Ethylene oxide burns. A hospital outbreak involving 19 women. Arch Dermatol. 1974; 110(6):924-5.

Bogdansky S, Lehn J. Effects of γ -Irradiation on 2-chloroethanol formation in ethylene oxide-sterilized polyvinyl chloride. J Pharm Sci. 1974; 63(5):802-803.

Bommer J, Ritz E, Andrassy K. Side effects due to materials used in hemodialysis equipment. Adv Nephrol Necker Hosp. 1985; 14:409-38.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Segurança no ambiente hospitalar. s/d. [citado 2008 jun. 25]. Disponível em:
<www.anvisa.gov.br/servicosau/manuelais/seguranca_hosp.pdf>

Brasil. Ministério da Saúde. Coordenação de Controle de Infecção Hospitalar. Manual de controle de infecção hospitalar. Brasília: Centro de documentação do Ministério da Saúde, 1985.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Coordenação-Geral das Unidades Hospitalares Próprias do Rio de Janeiro. Orientações gerais para central de esterilização. Brasília; 2001.

Brasil. Portaria Interministerial 482 de 16 de Abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico e seus Anexos, objeto desta Portaria, contendo disposições sobre os procedimentos de instalações de Unidade de Esterilização por óxido de etileno e suas misturas e seu uso, bem como, de acordo com as suas competências, estabelecer as ações sob a responsabilidade do Ministério da Saúde e do Trabalho e Emprego. DOU, seção I, p. 15, Brasília, 19 de Abril de 1999.

Bronstein AC, Spyker DA, Cantilena LR Jr, Green JL, Rumack BH, Heard SE; American Association of Poison Control Centers. 2007 Annual Report of the American Association of Poison Control Centers' National Poison Data System (NPDS): 25th Annual Report. Clin Toxicol (Phila). 2008 Dec;46(10):927-1057.

Butterworth BE, Chapman JR. Exposure of hematopoietic stem cells to ethylene oxide during processing represents a potential carcinogenic risk for transplant recipients. Regul Toxicol Pharmacol. 2007; 49(3):149-53. Epub 2007 Aug 1.

Ceribelli MIPF, Cruz AS, Toledo, HHB. Raios gama e óxido de etileno II: esterilizações incompatíveis? (Análise piloto). Acta Paul Enferm. 1998; 11(1):14-20.

Ceribelli MIPF. Raios gama e óxido de etileno I: esterilizações incompatíveis? – análise crítica da literatura. Acta Paul Enferm. 1997; 10(1):86-92.

Cruz AS, Cuppolini KM, Martinez CHO, Salles-Gomes LF. Culturas celulares na detecção da toxicidade de materiais médico-hospitalares e outros que entram em contato com o ser humano. Rev Inst Adolfo Lutz. 1987; 47(1/2):51-7.

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): 153-159.

Cruz AS. Teste de citotoxicidade in vitro como alternativa ao teste in vivo de Draize na avaliação de produtos cosméticos [Tese]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo; 2003.

Cunliffe AC, Wesley F. Hazards from plastics sterilized by ethylene oxide. Br Med J. 1967; 2:575-576.

De Seille JM, Delattre L, Meurice L, Jaminet F. Etude de l'effet d'une sterilisation A l'oxyde d'ethylene sur les teneurs residuelles en chlorhydrine du glycol et en ethyleneglycol dans des articles medico-chirurgicaux a base de pvc, prealablement irradies au cobalt 60. J Pharm Belg. 1985; 40(4):213-221.

Demarzo DR, Silva A. Esterilização por óxido de etileno: a utilização de serviços terceirizados. Rev SOBECC. 1997; 2(1):6-11.

Dunkelberg H. Carcinogenicity of ethylene oxide and 1,2-propylene oxide upon intragastric administration to rats. Br J Cancer. 1982 December; 46(6):924-933.

Dunkelberg H. On the oncogenic activity of ethylene oxide and propylene oxide in mice. Br J Cancer. 1979 May; 39(5):588-589.

Ferrell M, Wolf CE 2nd, Ellenbogen KA, Wood MA, Clemo HF, Gilligan DM. Ethylene oxide on electrophysiology catheters following resterilization: implications for catheter reuse. *Am J Cardiol*. 1997 Dec 15;80(12):1558-61.

Food And Drug Administration - Ethylene Oxide (Eto) Residuals: Limits in medical devices. FDA, Federal Register. 43(122), 1978.

Freshney RI. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. Hoboken: John Wiley & Sons, 2005.

Gilding DK, Reed AM, Baskett SA. Ethylene oxide sterilization: effect of polymer structure and sterilization conditions on residue levels. *Biomaterials*. 1980; 1(3):145-8.

Gillespie EH, Jackson JM, Owen GR. Ethylene oxide sterilization – is it safe?. *J Clin Path*. 1979; 32:1184-1187.

Graziano KU, Silva A, Bianchi ERF. Limpeza, desinfecção, esterilização de artigos e anti-sepsia. In: Fernandes AT. *Infecção hospitalar e suas interfaces na área da saúde*. São Paulo: Atheneu; 2000. p. 266-305.

Graziano KU. Processos de limpeza, desinfecção e esterilização de artigos odontomédico-hospitalares e cuidados com o ambiente de centro cirúrgico. In: Lacerda RA, coordenadora. *Controle de infecção em centro cirúrgico: fatos, mitos e controvérsias*. São Paulo: Atheneu; 2003. p. 163-195.

Guess WL. Tissue reactions to 2-chloroethanol in rabbits. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1970 Mar;16(2):382-90.

Guidolin R, Corrêa A, Cicarelli RMB, Previde E, Morais JF, Higashi HG. Esterilização de soros e vacinas por radiação gama de cobalto. *Rev Saúde Públ*. 1988; 22(2):113-7.

Handlos V. Ethylene chlorohydrin formation in radiation and ethylene oxide-sterilized poly(vinyl chloride). *Biomaterials*. 1984; 5(2):86-88.

Handlos V. Kinetics of the aeration of ethylene-oxide sterilized plastics. *Biomaterials*. 1980; 1(3):149-57.

Hardin BD, Niemeier RW, Sikov MR, Hackett PL. Reproductive-toxicologic assessment of the epoxides ethylene oxide, propylene oxide, butylene oxide, and styrene oxide. *Scand J Work Environ Health*. 1983; 9(2 Spec No):94-102.

Haugen HJ, Brunner M, Pellkofer F, Aigner J, Will J, Wintermantel E. Effect of different gamma-irradiation doses on cytotoxicity and material properties of porous polyether-urethane polymer. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2007; 80(2):415-23

Instituto Adolfo Lutz. IAL. Instituto Adolfo Lutz. 2010 [citado 2010 mai. 5]. Disponível em: <<http://www.ial.sp.gov.br/>>

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN). O IPEN. 2006b [citado 2010 mai. 5]. Disponível em: <<https://www.ipen.br/sitio/?idm=3>>

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN). Radioesterilização. 2006a [citado 2008 Ago 7]. Disponível em: <<http://www.ipen.br/sitio/?idm=253>>

International Standard Organization. ISO 10993–5. 2009. Biological evaluation of medical devices Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods.

International Standard Organization. ISO 11135–1. 2007. Sterilization of health care products – ethylene oxide – Part 1: requirements for development, validation and routine control of a sterilization process for medical devices.

Jones AB. In vitro evaluation of hemolytic and cell culture toxicity potential of residual ethylene oxide in selected medical materials. *J Biomed Mater Res*. 1979; 13(2):207-16.

LaBorde JB, Kimmel CA. The teratogenicity of ethylene oxide administered intravenously to mice. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1980; 56(1):16-22.

Lawrence WH, Itoh K, Turner JE, Autian J. Toxicity of ethylene chlorohydrin II: subacute toxicity and special tests. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1971; 60(8):1163-1168.

Lawrence WH, Turner JE, Autian J. Toxicity of ethylene chlorhydrin. I. Acute toxicity studies. J Pharm Sci. 1971; 60(4):568-71.

Léo P, Galesi ALL, Suazo CAT, Moraes AM. Células animais: conceitos básicos. In: Moraes AM, Augusto EFP, Castilho, L. Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica. São Paulo: Roca; 2007. p. 15-41.

Lindop CR, Willcox TW, McKegg PM, Harris EA. Exposure of patients to ethylene oxide during cardiopulmonary bypass using gas-sterilized pump components. J Thorac Cardiovasc Surg. 1980; 79(6):845-50.

Lipton B, Gutierrez R, Blaugrund S, Litwak RS, Rendell-Baker L. Irradiated PVC plastic and gas sterilization in the production of tracheal stenosis following tracheostomy. Anesth Analg. 1971; 50(4):578-86.

Lucas AD, Merritt K, Hitchins VM, Woods TO, McNamee SG, Lyle DB, Brown SA. Residual ethylene oxide in medical devices and device material. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2003; 66(2):548-52.

Lyarskii PP, Kopylova LS, Gleiberman SE, Zayeva GN, Kolesnikova NI. Physico-chemical and toxico-hygienic aspects of using ethylene oxide for the sterilization of articles for medical use. Part 2. Toxicity and risk of ethylene oxide entering the organism by non-inhalation routes. J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol. 1986; 30(1):33-41.

Marreco PR, da Luz Moreira P, Genari SC, Moraes AM. Department of Biotechnological Processes, School of Chemical E Effects of different sterilization methods on the morphology, mechanical properties, and cytotoxicity of chitosan membranes used as wound dressings. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2004; 71(2):268-77.

Marx GF, Steen SN; Schapira M, Erlanger HL, Arkins RE, Jadwat CM, Kepes E. Hazards associated with Ethylene oxide sterilization. N Y State J Med. 1969; 69:1319-1320.

Matsumoto T, Hardaway RM 3rd, Pani KC, Sater CM, Bartak DE, Margetis PM. Safe standard of aeration for ethylene oxide sterilized supplies. Arch Surg. 1968; 96(3):464-70.

Mc Gunnigle RG, Renner JA, Romano SJ, Abodeely RA Jr. Residual ethylene oxide: levels in medical grade tubing and effects on an in vitro biologic system. J Biomed Mater Res. 1975; 9(3):273-83.

McMahon DM, Winstead S, Weant KA. Toxic alcohol ingestions: focus on ethylene glycol and methanol. Adv Emerg Nurs J. 2009 Jul-Sep;31(3):206-13.

Mendes GC, Brandão TR, Silva CL. Ethylene oxide sterilization of medical devices: a review. Am J Infect Control. 2007;35(9):574-81.

Mochida K, Gomyoda M. Toxicity of ethylene glycol, diethylene glycol, and propylene glycol to human cells in culture. Bull Environ Contam Toxicol. 1987; 38(1):151

Moraes AM, Mendonça RZ, Suazo CAT. Meios de cultura para células animais. Moraes AM, Augusto EFP, Castilho, L. Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica. São Paulo: Roca; 2007. p. 105-121.

Moraes R. A tolerância dos polímeros à radiação. Plástico Moderno On-line. 2000 [citado 2008 Mar 28]; 312. Disponível em:
<<http://www.plastico.com.br/revista/pm312/radiacao.htm>>

Nadeau G, Cote R, Delaney FJ. Two cases of ethylene glycol poisoning. Can Med Assoc J. 1954; 70(1):69-70.

Nakata S, Umeshita K, Ueyama H, Takashina M, Noguchi S, Murata A, Ochi T. Aeration time following ethylene oxide sterilization for reusable rigid sterilization containers: concentration of gaseous ethylene oxide in containers. Biomed Instrum Technol. 2000; 34(2):121-4.

Nogueira MH, Avelar MCQ, Barreto HHC, Cardoso DP. A. Resíduos tóxicos em canulas e seringas esterilizadas e reesterilizadas com óxido de etileno. Rev Inst Adolfo Lutz. 1989; 49(1):27-34.

O'Leary RK, Guess WL. The toxicogenic potential of medical plastics sterilized with ethylene oxide vapors. J Biomed Mater Res. 1968; 2(3):297-311.

Pinto TJA. Aspectos fundamentais na validação do monitor biológico para a esterilização por óxido de etileno [Tese]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 1991.

Rela PR. Utilização da radiação ionizante na esterilização de produtos médicos e farmacêuticos. Revista da Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação. 2001 [citado 2010 Abr 19]; Disponível em: <http://www.sbcc.com.br/revistas_pdfs/ed%2004/04artigo%20tecnico2.pdf>

Rendell-Baker L, Roberts RB. Safe use of ethylene oxide sterilization in hospitals. Curr Resear. 1970; 49(6):919-921.

Rendell-Baker L. Ethylene oxide. II. Aeration. Int Anesthesiol Clin. 1972; 10(2):101-22.

Roberts RB. Gamma Rays + PVC + EO = OK. Respir Care. 1976; 21(3):223-224.

Rodolfo Jr A, Mei LHI. Mecanismos de degradação e estabilização térmica do PVC: a review. Polímeros. 2007; 17(3):263-275.

Rodolfo Jr A, Nunes LR, Ormanji W. Tecnologia do PVC. São Paulo: ProEditores / Braskem; 2002.

Rodríguez RH, Fernnández VMC, Despaigne SC, Betancourt OV. Dispositivos médicos de uso único reprocessados por esterilización química mediante óxido de etileno. Rev Cubana Hig Epidemiol. 2002; 40(2):89-94.

Rogero SO, Lugão AB, Ikeda TI, Cruz AS. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. Materials Research. 2003; 6(3):317-320.

Schiewe MC, Schmidt PM, Bush M, Wildt DE. Toxicity potential of absorbed-retained ethylene oxide residues in culture dishes on embryo development in vitro. J Anim Sci. 1985; 60(6):1610-8.

Silva MV, Pinto TJA. Reutilização simulada de produtos medico-hospitalares de uso único, submetidos à esterilização com óxido de etileno. Rev Bras Cienc Farm. 2005; 41(2):181-9.

Snellings WM, Maronpot RR, Zelenak JP, Laffoon CP. Teratology study in Fischer 344 rats exposed to ethylene oxide by inhalation. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1982; 64(3):476-81.

Sociedade Brasileira de Enfermeiros do Centro Cirúrgico, Recuperação Anestésica e Centro de Material e Esterilização. Práticas recomendadas – SOBECC. 5ª ed. São Paulo; 2009.

Souza RQ. Incompatibilidades entre radiação gama e óxido de etileno como métodos de esterilização consecutiva: fatos e mitos [Trabalho de conclusão de curso]. São Paulo: Centro Universitário São Camilo; 2007.

Stanley P, Bertranou E, Forest F, Langevin L. Toxicity of ethylene oxide sterilization of polyvinyl chloride in open-heart surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1971; 61(2):309-14.

Star EG. Gamma-Strahlen und Äthylenoxid-sterilisation. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg.* 1980; 171(1):33-41.

Steelman VM. Ethylene oxide. The importance of aeration. *AORN J.* 1992; 55(3):773-787.

Stetson JB, Withbourne JE, Eastman C. Ethylene oxide degassing of rubber and plastic materials. *Anesthesiology.* 1976; 44(2):174-180.

Tessler J. Reaction of the sterilan ethylene oxide on plastics. *Appl Microbiol.* 1961; 9:256.

Troisi FM. Chronic Intoxication by Ethylene Glycol Vapour. *Br J Ind Med.* 1950 April; 7(2): 65–69.

United States Pharmacopeia. 32 ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention; 2009.

Venezuela. Esterilización com Óxido de Etileno. COVENIN 2843, 1991.

Vidal KAL. Estudo da citotoxicidade de três cimentos obturadores endodônticos a base de óxido de zinco e eugenol em cultura de células L929 [Dissertação]. Duque de Caxias: Escola de Odontologia, Universidade do Grande Rio “José de Souza Herdy”; 2007.

Vinhas GM, Maior RMS, Almeida YMB. Estudo de propriedades de PVC modificado com grupos alquila e benzila. *Polímeros Ciência e Tecnologia*. 2005; 15(3):207-211.

Vink P, Pleijsier K. Aeration of ethylene oxide-sterilized polymers. *Biomaterials*. 1986; 7(3):225-30.

Walker WJG, Greeson CE. The toxicity of ethylene oxide. 1932; *J Hyg* 32:409-416.

Watanabe E. Estudo dos níveis residuais do óxido de etileno em sondas de borracha em função dos tipos das embalagens. *Jornada de Enfermagem em Centro Cirúrgico do Estado de São Paulo*; 1990; São José do Rio Preto: Anais; 1990 p. 405-424.

Wesley F, Rourke B, Darbishire O. The formation of persistent toxic chlorohydrins in foodstuffs by fumigation with ethylene oxide and with propylene oxide. 1965; *J Food Sci*; 30 (6), 1037-1042.

White JD. Standard aeration for gas-sterilized plastics. *J Hyg*. 1977; 79(2): 225–232.

Zanon U, Bohmgahren MF. Esterilização, desinfecção e anti-sepsia. In: Ferraz EM. *Infecção em cirurgia*. Rio de Janeiro: MEDSI; 1997. p. 577-608.

Zanon U. Esterilização, desinfecção e anti-sepsia. In: Ferraz, EM org. *Manual de controle de infecção em cirurgia*. São Paulo: EPU/Colégio Brasileiro de Cirurgias; 1982. p. 283-330.

Zanon U. Esterilização. In: Zanon U, Neves J. *Infecções hospitalares: prevenção, diagnóstico e tratamento*. Rio de Janeiro: MEDSI; 1987. p. 831-858.

Anexo A: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz – CEPIAL

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - CEPIAL
Av. Dr. Arnaldo, 355 – Sala 83 - Cerqueira César - 01246-902
Fone: 3068-2859

São Paulo, 09 de dezembro de 2009.

Protocolo: 53/2009

Projeto de Pesquisa nº: **CCD-BM- 07/09 – Análise *in vitro* da toxicidade celular de tubos de PVC esterilizados consecutivamente em raios gama e oxido de etileno.**

Pesquisador Responsável: **Claudia Regina Gonçalves**

Prezado Pesquisador

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz – CEPIAL analisou e deliberou em reunião de dezembro de 2009, em concordância com a Resolução CNS 196/96 e suas resoluções complementares, o projeto acima apresentado na categoria **APROVADO**.

Cabe lembrar que em conformidade com a Resolução 196/96 são deveres do pesquisador :

- a) comunicar, imediatamente, qualquer alteração do projeto e só prosseguir com essa alteração depois da manifestação do CEPIAL;
- b) manter sob sua guarda, pelo prazo de 5 anos e em local seguro, os dados da pesquisa contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEPIAL, para o caso de eventual auditoria;
- c) comunicar formalmente ao CEPIAL quando do encerramento deste projeto;
- d) elaborar e apresentar relatórios parciais e finais;
- e) justificar perante o CEPIAL a interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Luz Marina Trujillo
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
Instituto Adolfo Lutz - CEPIAL

Nota: A Dra. Cláudia Regina Gonçalves foi coordenadora dos experimentos realizados na Seção de Culturas Celulares do Instituto Adolfo Lutz.

Análise *in vitro* da toxicidade celular de tubos de PVC esterilizados consecutivamente em Raios Gama e Óxido de Etileno.

Anexo C – Representação gráfica das condições de esterilização do grupo G3 original

Anexo E - Representação gráfica das condições de esterilização da segunda repetição do grupo G3 e do grupo G4

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Assinatura: _____

Data: ____/____/____

Catálogo na Publicação (CIP)
Biblioteca “Wanda de Aguiar Horta”
Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo

Souza, Rafael Queiroz de

Análise *in vitro* da toxicidade celular de tubos de PVC esterilizados consecutivamente em raios gama e óxido de etileno. / Rafael Queiroz de Souza . – São Paulo, 2010.

93 p.

Dissertação (Mestrado) – Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo.

Orientadora: Prof^ª Dr^a Kazuko Uchikawa Graziano

1. Polímeros (Materiais) 2. Agente tóxico 3. Cultura de células animais I. Título