



BR01B1714

INIS-BR--3812

**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES**

**Autarquia associada à Universidade de São Paulo**

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE FILMES DE BORRACHA  
NATURAL OBTIDOS DO LÁTEX VULCANIZADO PELO  
PROCESSO CONVENCIONAL E PELO PROCESSO  
ALTERNATIVO COM RADIAÇÃO IONIZANTE**

**VÂNIA ELISABETH CAMPOS**

**Dissertação apresentada como parte  
dos requisitos para obtenção do grau  
de Mestre em Ciências na Área de  
Tecnologia Nuclear**

**Orientadora:**

**Dra. Selma Matheus Loureiro Guedes**

**SÃO PAULO**

**1997**



*À minha mãe Osmilda Fernandes Bonifácio,  
pelo carinho, incentivo e paciência.*

## AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Selma Mathews Loureiro Guedes, pela sua orientação.

À professora Dra. Olga Zazuco Higa da Supervisão de Radiobiologia TBR/IPEN, pelo aprendizado e realização de ensaios de citotoxicidade.

À professora Dra. Seico Hanada do Departamento de Farmacologia ICB/USP, pelo aprendizado e realização de ensaios de toxicidade sistêmica.

À professora Dra. Gláucia M. M. Santelli do Departamento de Histologia e Embriologia ICB/USP, pelo aprendizado e realização do estágio no Laboratório de Biologia Celular.

À professora Dra. Carmem D. Saldiva de André, à professora Dra. Silvia N. Elian e à aluna Celina Koshimizu do Centro de Estatística Aplicada IME/USP, pela realização da análise estatística.

À Dra. Mitiko Saiki da Supervisão de Radioquímica TFR/IPEN, pela realização da análise por ativação com nêutrons.

Aos engenheiros Carlos G. Silveira e Elizabeth S. Ribeiro Somessari da Divisão de Aplicações TEA/IPEN, pela irradiação do látex.

Aos diretores proprietários Adriano Dias Araújo, Fernando G. Araújo e José G. Araújo da Indústria Nacional de Artefatos de Látex Ltda. INAL, pela doação do látex e utilização de suas instalações.

À Evelyne Y. L. Vaidergorin e Selma B. Jaconis da Divisão de Química-Laboratório de Plásticos e Borracha IPT/SP, pelos ensaios de resistência à tração.

À empresa Pirelli-Cabos pela utilização do dinamômetro Instron.

Às empresas Oxiteno Ltda. e Tintas Coral S.A, pela doação de reagentes.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

À Sizue Ota Rogero pela colaboração, confiança e amizade.

Aos professores, funcionários e alunos da Supervisão de Radioensaios TBM/IPEN e da Supervisão de Radiobiologia TBR/IPEN pela colaboração e companheirismo durante a jornada.

*“Pode-se viver no mundo uma vida magnífica,  
quando se sabe trabalhar e amar.  
Trabalhar pelo que se ama e amar aquilo em que se trabalha.”*

Tolstói

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	ix
<b>ABSTRACT</b> .....	xi
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	xiii
<b>1 - INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 - ASPECTOS GERAIS</b> .....	3
<b>2.1 - LÁTEX DE BORRACHA NATURAL</b> .....	3
2.1.1 - Histórico.....	3
2.1.2 - Noções Gerais.....	5
<b>2.2 - PROCESSOS DE VULCANIZAÇÃO</b> .....	8
2.2.1 - Processo Convencional com Enxofre.....	8
2.2.2 - Processo Alternativo com Radiação Ionizante.....	13
<b>2.3 - BIOCAMPATIBILIDADE</b> .....	18
<b>3 - PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	21
<b>3.1 - CARACTERIZAÇÃO DO LÁTEX DE BORRACHA NATURAL</b> .....	21
3.1.1 - Teor de Sólidos Totais.....	22
3.1.2 - Teor de Borracha Seca.....	22
3.1.3 - Teor de Sólidos Não Borracha.....	23
3.1.4 - Teor de Coágulo.....	23
3.1.5 - Teor de Cu, Mn e Mg.....	24
3.1.6 - Estabilidade Mecânica.....	24
3.1.7 - Alcalinidade Total.....	25
3.1.8 - Alcalinidade em NH <sub>3</sub> .....	25
3.1.9 - Índice de KOH.....	26
3.1.10 - Índice de Ácidos Graxos Voláteis.....	27
3.1.11 - Viscosidade.....	28
3.1.12 - Cor.....	28

3.1.13 - Odor.....	29
<b>3.2 - VULCANIZAÇÃO.....</b>	<b>29</b>
3.2.1 - Processo Convencional.....	29
3.2.1.1 - Preparação e Análise da Solução de KOH.....	30
3.2.1.2 - Preparação e Análise das Dispersões.....	30
3.2.1.3 - Formulação.....	32
3.2.2 - Processo Alternativo.....	33
3.2.2.1 - Formulação.....	33
3.2.2.2 - Irradiação.....	34
<b>3.3 - PREPARAÇÃO DOS FILMES.....</b>	<b>35</b>
<b>3.4 - ENSAIOS.....</b>	<b>36</b>
3.4.1 - Resistência à Tração na Ruptura.....	36
3.4.1.1 - Preparação dos Corpos de Prova.....	36
3.4.1.2 - Procedimento Experimental.....	38
3.4.2 - Citotoxicidade.....	38
3.4.2.1 - Preparação dos Extratos.....	39
3.4.2.2 - Cultura Celular.....	39
3.4.3 - Toxicidade Sistêmica.....	40
3.4.3.1 - Preparação dos Extratos.....	40
3.4.3.2 - Procedimento Experimental.....	41
<b>4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>43</b>
<b>4.1 - SELEÇÃO DO LÁTEX DE BORRACHA NATURAL.....</b>	<b>43</b>
<b>4.2 - RESISTÊNCIA À TRAÇÃO.....</b>	<b>50</b>
4.2.1 - Látex de Borracha Natural Vulcanizado Sem Radiossensibilizador.....	50
4.2.2 - Látex de Borracha Natural Vulcanizado Com Radiossensibilizador.....	52
<b>4.3 - EFEITOS TOXICOLÓGICOS.....</b>	<b>55</b>
4.3.1 - Citotoxicidade.....	55
4.3.2 - Toxicidade Sistêmica.....	64

<b>5 - CONCLUSÕES.....</b>	<b>72</b>
<b>APÊNDICE - ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>75</b>
<b>A1 - FILMES DE LBN VULCANIZADO COM RADIAÇÃO IONIZANTE...75</b>	
A1.1 - Vulcanização Sem Radiossensibilizador.....	75
A1.2 - Vulcanização Com Radiossensibilizador.....	78
<b>A2 - CITOTOXICIDADE.....</b>	<b>80</b>
A2.1 - Controle Positivo e Negativo do Teste de Citotoxicidade.....	80
A2.2 - Filmes de LBN.....	82
A2.2.1 - Filme de LBN Não Vulcanizado.....	83
A2.2.2 - Filme de LBN Vulcanizado com 250kGy e Sem Radiossensibilizador.....	85
A2.2.3 - Filme de LBN Vulcanizado com 12kGy e Com Radiossensibilizador.....	87
A2.2.4 - Filme de LBN Vulcanizado com Enxofre.....	88
<b>A3 - TOXICIDADE SISTÊMICA.....</b>	<b>89</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>93</b>



# **AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE FILMES DE BORRACHA NATURAL OBTIDOS DO LÁTEX VULCANIZADO PELO PROCESSO CONVENCIONAL E PELO PROCESSO ALTERNATIVO INDUZIDO COM RAIOS GAMA**

**Vânia Elisabeth Campos**

## **RESUMO**

A vulcanização industrial do látex de borracha natural (LBN) é realizada mundialmente pelo processo convencional que utiliza o enxofre e o calor, contudo, ela pode ser realizada pelo processo alternativo que utiliza a radiação ionizante. Neste trabalho o LBN foi caracterizado em função de 13 ensaios físicos, químicos e mecânicos, os quais mostraram sua adequada qualidade. Foi realizado um estudo preliminar das propriedades toxicológicas de 4 filmes de borracha natural obtidos pelo método do derrame a partir do LBN: um não vulcanizado, um vulcanizado pelo processo convencional e dois pelo alternativo. No processo alternativo dois filmes foram obtidos com o LBN irradiado com raios gama, provenientes de uma fonte de  $^{60}\text{Co}$ , com 250kGy, na ausência de radiosensibilizador e irradiado com 12kGy na presença de 4phr de acrilato de n-butila/0,2phr de KOH. Essas doses de vulcanização foram determinadas em função da resistência à tração na ruptura. No processo convencional foi obtido um filme a partir do LBN vulcanizado com enxofre utilizando-se uma formulação clássica. Um outro filme foi obtido com LBN não vulcanizado. A avaliação preliminar da toxicidade, foi realizada em função de ensaios *in vitro* de citotoxicidade e *in vivo* de toxicidade sistêmica. Os filmes de LBN vulcanizado pelo processo alternativo são menos citotóxicos que o filme de LBN vulcanizado pelo processo convencional. O filme vulcanizado com raios gama na presença de radiosensibilizador apresentou uma citotoxicidade semelhante à do filme de LBN não vulcanizado, enquanto que, o filme vulcanizado na ausência de radiosensibilizador apresentou uma citotoxicidade ligeiramente menor. Quanto ao

ensaio de toxicidade sistêmica, tanto o filme não vulcanizado como os vulcanizados pelo processo alternativo não apresentaram nenhum efeito tóxico durante as 72 horas de experimento. Entretanto o filme vulcanizado pelo processo convencional produziu efeitos de sedação e incoordenação motora nos animais tratados com o extrato oleoso, nas primeiras 4 horas e recuperação nas horas subsequentes. O processo alternativo promoveu menores efeitos toxicológicos que o processo convencional, porque dispensa a adição de substâncias tóxicas.

# TOXICOLOGICAL EVALUATION OF NATURAL RUBBER FILMS FROM VULCANIZED LATEX BY THE CONVENTIONAL PROCESS AND THE ALTERNATIVE PROCESS BY GAMMA RAYS

Vânia Elisabeth Campos

## ABSTRACT

The industrial vulcanization of natural rubber latex (NRL) is made all over the world by conventional process using sulphur and heat but it can be made by an alternative process using ionizing radiation. In this research the NRL was tested by 13 physical, chemical and mechanical assays which showed its good quality. It was done a preliminary study of the toxicological properties of 4 natural rubber films obtained by casting process of NRL: one non vulcanized, other vulcanized by the conventional process and two vulcanized by the alternative process. In the alternative process the films were obtained by irradiation of NRL by gamma rays from the  $^{60}\text{Co}$  source at 250kGy in the absence of sensitizer and irradiated NRL at 12kGy in the presence of 4phr of n-butyl acrylate / 0.2phr of KOH. These vulcanization doses were determined from broken tensile strenght. In the convetional process, sulphur vulcanized NRL was made using a classical composition. Another film was made with non vulcanized NRL. The preliminar evaluation of the toxicological properties was made from *in vitro* citotoxicity and *in vivo* systemic toxicity assays. The LBN films vulcanized by the alternative process have less citotoxicity than the NRL film vulcanized by the conventional process. The sensitized vulcanized films by gamma rays and non vulcanized films showed similar citotoxicity while the vulcanized films without sensitizer showed a slight lower citotoxicity. The non vulcanized NRL film and the NRL films vulcanized by the alternative process did not show toxic effects in the 72 hours period of the systemic toxicity assay. However the NRL film vulcanized with sulphur induced effects like allaying and motor incoordination on the animals trated with an oil

extract at the fourth hour and recovering after that. The alternative process promoted lower toxic effects than conventional process because there was no toxic substances present.

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>2 EHA</b>	Acrilato de 2 etilhexila
<b>AA</b>	Alcalinidade em NH <sub>3</sub>
<b>An-B</b>	Acrilato de n-butila
<b>AT</b>	Alcalinidade total
<b>BS</b>	Borracha seca
<b>C</b>	Coágulo
<b>CHO</b>	Célula de ovário de hêmster
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dose letal para 50% dos animais testados
<b>d<sub>s</sub></b>	Densidade do soro
<b>DV</b>	Dose de vulcanização
<b>E</b>	Espessura do corpo de prova
<b>EM</b>	Estabilidade mecânica
<b>F</b>	Força aplicada para romper o corpo de prova
<b>f<sub>Ba(OH)<sub>2</sub></sub></b>	Fator de correção da solução de hidróxido de bário a 0,01N
<b>FCS</b>	Soro fetal bovino
<b>f<sub>HCl</sub></b>	Fator de correção da solução padrão de ácido clorídrico a 0,1N
<b>f<sub>KOH</sub></b>	Fator de correção da solução de hidróxido de potássio a 0,5N
<b>G<sub>radical</sub></b>	Número de radicais formados por 100eV de energia absorvida
<b>I<sub>AGV</sub></b>	Índice de ácidos graxos voláteis
<b>IC50%</b>	Índice de citotoxicidade que inibe a formação de 50% das colônias de células

<b>I<sub>KOH</sub></b>	Índice de KOH
<b>L</b>	Largura do corpo de prova na região de ensaio
<b>LBN</b>	Látex de borracha natural
<b>M</b>	Massa de látex correspondente a 10mL de soro acidificado
<b>m<sub>CS</sub></b>	Massa de coágulo seco
<b>m<sub>KOH</sub></b>	Massa de hidróxido de potássio
<b>m<sub>KOHS</sub></b>	Massa da solução de hidróxido de potássio
<b>m<sub>LBN</sub></b>	Massa inicial do látex de borracha natural
<b>m<sub>LS</sub></b>	Massa do látex de borracha natural seco
<b>m<sub>S</sub></b>	Massa inicial da dispersão de enxofre
<b>m<sub>SS</sub></b>	Massa da dispersão de enxofre seca
<b>m<sub>ZDEC</sub></b>	Massa inicial da dispersão de Dietilditiocarbamato de zinco
<b>m<sub>ZDECS</sub></b>	Massa da dispersão de Dietilditiocarbamato de zinco seca
<b>m<sub>ZnO</sub></b>	Massa inicial da dispersão de óxido de zinco
<b>m<sub>ZnOS</sub></b>	Massa da dispersão de óxido de zinco seca
<b>OM</b>	Óleo vegetal de milho
<b>PEG</b>	Polietileno glicol 400
<b>Ps</b>	Peso seco
<b>Pu</b>	Peso úmido
<b>RPMI-1640</b>	Meio de cultura desenvolvido por Moore e colaboradores no Roswell Park Memorial Institute
<b>RT</b>	Resistência à tração na ruptura
<b>S</b>	Soro
<b>SES</b>	Solução etanol:salina:: 1:20 v/v
<b>SNB</b>	Sólidos não borracha

<b>SS</b>	Solução salina contendo 0,9 g/L de NaCl
<b>ST</b>	Sólidos totais
<b>TMTD</b>	Dissulfeto de tetrametiltiurã
$V_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}$	Volume da solução de sulfato de amônio a 350 g/L
$V_{\text{Ba}(\text{OH})_2}$	Volume da solução de hidróxido de bário a 0,01N
$V_{\text{F}}$	Volume da solução de formaldeído a 0,5%
$V_{\text{HCl}}$	Volume da solução de ácido clorídrico 0,1N
$V_{\text{KOH}}$	Volume da solução de hidróxido de potássio a 0,5N
$V_{\text{S}}$	Volume de soro
<b>ZDBC</b>	Dibutilditiocarbamato de zinco
<b>ZDEC</b>	Dietilditiocarbamato de zinco
<b>ZDMC</b>	Dimetilditiocarbamato de zinco
<b>ZEPC</b>	Etilfenilditiocarbamato de zinco
<b>ZPC</b>	Pentametenoditiocarbamato de zinco

## Capítulo 1

# INTRODUÇÃO

A borracha natural, que é o polímero 1,4 cis poliisopreno, encontra-se dispersa em um meio essencialmente aquoso sob a forma de látex em diversos vegetais. A principal árvore produtora de borracha é a *Hevea brasiliensis* originária da região amazônica<sup>1</sup>. O látex de borracha natural (LBN) após sofrer o processo de vulcanização, que consiste em formar uma rede tridimensional entre as moléculas poliméricas da borracha, adquire propriedades elastoméricas inigualáveis, por isso tem sido a matéria prima mais utilizada para a fabricação de luvas e de preservativos. Entretanto, algumas pessoas tem desenvolvido reações adversas à esses produtos, atribuídas à presença de proteínas no LBN<sup>2,3</sup>.

Materiais alternativos tem sido investigados, principalmente para fabricação de luvas utilizadas em análises e cirurgias<sup>4</sup>. Considerações sobre materiais alternativos como PVC, poliuretano, borracha nitrílica, neopreno e copolímeros de estireno demonstram que além de maior custo e de menor desempenho, quando comparados com a borracha natural, também são possuidores de toxicidade e efeitos alérgicos<sup>5</sup>.

Pesquisas sobre processos alternativos de vulcanização do LBN como a utilização de radiação ionizante tem sido investigadas e as principais vantagens desse processo são a ausência dos produtos químicos de vulcanização utilizados no processo convencional, principalmente os aceleradores<sup>6,7</sup>. Além disso, existe a possibilidade da radiação gama causar mudanças estruturais nas proteínas<sup>8</sup> presentes no LBN, levando a uma redução das reações alérgicas a elas atribuídas<sup>9</sup>.

Pesquisadores do IPEN também têm investigado a vulcanização do látex de borracha natural induzida com radiação ionizante. Esses trabalhos têm contribuído



para o estudo das propriedades mecânicas de filmes de LBN vulcanizado com raios gama e com feixes de elétrons<sup>10</sup>, de sistemas de radiosensibilizadores<sup>11</sup>, da estabilidade do LBN irradiado<sup>12</sup>, e, desenvolvido e estudado os parâmetros do processo de fabricação de luvas cirúrgicas, em escala piloto, utilizando-se raios gama, além da avaliação econômica comparativa<sup>13</sup>. Dando continuidade à esses estudos, este trabalho têm o objetivo de iniciar uma investigação comparativa das propriedades toxicológicas de filmes de LBN vulcanizado pelo processo convencional com enxofre e pelo processo alternativo com radiação ionizante, na ausência e na presença de radiosensibilizador.

Este trabalho foi realizado em três etapas básicas: a caracterização do LBN, a vulcanização e os ensaios biológicos. A caracterização consistiu de 13 ensaios físicos, químicos e mecânicos do LBN com o objetivo de avaliar a qualidade da matéria prima, cujas metodologias serão descritas no Capítulo 3 (Parte Experimental) e os resultados apresentados no Capítulo 4 (Resultados e Discussão). A vulcanização do LBN foi realizada através de 2 processos. Um foi o convencional na presença de enxofre e calor e o outro foi induzido com raios gama na presença e na ausência de radiosensibilizador. Esses processos serão descritos no Capítulo 2 (Aspectos Gerais) e o procedimento experimental no Capítulo 3. O ensaio de tração foi utilizado para determinar a dose de vulcanização do processo induzido por radiação, o qual será descrito no Capítulo 3 e os resultados serão apresentados no Capítulo 4. Os ensaios biológicos *in vitro* de citotoxicidade e *in vivo* de toxicidade sistêmica em camundongos, de 4 filmes de LBN representativos, um do processo de vulcanização convencional, dois do processo alternativo e um da matéria prima, serão descritos no Capítulo 3 e os resultados apresentados no Capítulo 4.

## **Capítulo 2**

### **ASPECTOS GERAIS**

Neste Capítulo serão apresentados os conceitos fundamentais utilizados no desenvolvimento desse trabalho. Inicialmente é dada uma breve explanação sobre a matéria prima principal, o LBN, desde sua descoberta até sua atual comercialização. A seguir é apresentado o processo convencional de vulcanização do LBN com enxofre, atualmente utilizado pelas indústrias do mundo inteiro, e o processo alternativo de vulcanização induzido com radiação ionizante, atualmente em pesquisa no Brasil através do IPEN. Finalmente, serão apresentados aspectos relacionados à aplicação dos principais artefatos de LBN como biomateriais, bem como seus problemas toxicológicos, e a avaliação da citotoxicidade e da biocompatibilidade.

#### **2.1 - LÁTEX DE BORRACHA NATURAL**

##### **2.1.1 - Histórico**

Os mais antigos relatos sobre a borracha vieram da América Central, onde bolas e outros objetos eram fabricados com ela<sup>14</sup>. Obtinham-se essa borracha a partir do látex de árvores do gênero Castilla ou Castilloa. Colhida na selva, a borracha da Castilla, ou caucho, constituiu um modesto artigo do comércio internacional até meados do século XVIII. Por volta do século XIX, a transferência de plantas exóticas e a busca de plantas selvagens passíveis de “domesticação” (um processo gradual e em parte acidental de seleção e hibridação) eram atividades que se tornavam racionalizadas, organizadas e postas a serviço do capitalismo industrial. A Europa mandava pesquisadores à procura de espécies desconhecidas que

pudessem servir como matéria prima, remédio ou ornamento. Naquela época a “domesticação” das árvores produtoras de borracha foi uma grande descoberta botânica.

Em 1736 Charles Marie de La Condamine coletou amostras de borracha da Castilla no Equador, onde era chamada *caoutchouc* ou *hévé*<sup>14</sup>. Em 1775 outro naturalista francês, Fusée Aublet, publicou uma descrição acurada de uma árvore produtora de borracha, nativa das Guianas, que batizou de *Hevea guianensis*<sup>14</sup>.

Em Belém, perto da foz do Amazonas, atraiu a atenção das autoridades coloniais portuguesas outro tipo de borracha, chamada “seringa”. Por volta de 1839, Belém realizava um comércio ativo de sapatos feitos de “seringa”<sup>14</sup>. No mesmo período, Charles Goodyear, ampliara muitíssimo as aplicações potenciais da borracha graças à descoberta da possibilidade dela ser estabilizada quimicamente com a mistura de enxofre em presença de calor, que é um processo conhecido sob o nome de vulcanização<sup>1</sup>.

Em 1854, chegaram ao Jardim Botânico Real de Kew em Londres espécimes completas de pau-seringa, quando Richard Spruce voltou de suas longas viagens pela América do Sul<sup>14</sup>. Em 1865, Jean Mueller von Argau publicou uma monografia em *Linnaea*, suprimindo o nome genérico alternativo *Siphonia* e aplicando *Hevea brasiliensis* à espécie levada de Belém por F. G. Sieber, que parecia ser da verdadeira “seringa” do comércio<sup>14</sup>. Enfim, a árvore da borracha havia recebido uma designação científica estável e os futuros pesquisadores teriam condições de saber mais ou menos o que estavam buscando.

A borracha tornou-se o material preferido para a confecção de gaxetas para máquinas à vapor. Assim, essa matéria prima, acompanhou o ferro e o aço onde quer que se instalassem máquinas industriais, bombas de minas e ferrovias. A borracha também era essencial nas correias e tubos de máquinas e em 1874

começou a ser aplicada nos fios telegráficos. Não demorou muito para que se concebesse a idéia de “domesticar” as árvores produtoras de borracha.

No Extremo Oriente, as plantações de seringueira tiveram início a partir de 70.000 sementes daqui levadas por Henry Wickham e plantadas no Kew Gardens, em Londres<sup>15</sup>. Dessas sementes vingaram cerca de 2.000, sendo que a maioria das mudas foram transplantadas no Ceilão, onde se aclimataram perfeitamente.

Com a invenção do pneumático e a expansão da indústria automobilística nos Estados Unidos, os preços do látex extraído das seringueiras da Amazônia explodiram e a produção brasileira cresceu rapidamente. Em 1907, a borracha já é responsável por 23% do valor das exportações brasileiras. O recorde ocorre em 1912 quando são exportadas 42 mil toneladas de borracha. A partir de 1910, no entanto, holandeses e ingleses desenvolvem plantações planejadas e com grande produtividade na Indonésia, Ceilão e Malásia<sup>14</sup>. Em 1919 a borracha asiática já inunda o mercado internacional, onde, das 423 mil toneladas comercializadas, apenas 34 mil toneladas são brasileiras. Consequentemente, a produção da Amazônia definha e toda a região entra em decadência<sup>14</sup>.

Países como a Malásia, Ceilão, Sumatra e Java tornaram-se imensos campos de investimento e em 1995 a Tailândia, a Malásia, e a Indonésia tornam-se os principais produtores de borracha natural<sup>16</sup>.

### 2.1.2 - Noções Gerais

A principal árvore produtora de LBN é a *Hevea brasiliensis* da família das Euphorbiaceae (seringueira) originária da região setentrional da América do Sul<sup>1</sup>. As plantações da *Hevea brasiliensis* apresentam uma densidade de aproximadamente 450 árvores por hectare, e começam a produzir após 7 a 8 anos de plantio<sup>1</sup>. As árvores obtidas por reprodução sexuada de sementes, ou seja,

germinação de material obtido por polinização controlada a partir de clones (grupo de plantas resultantes de propagação vegetativa de uma única árvore), apresentam um baixo índice de produção. Por outro lado, a propagação vegetativa da *Hevea brasiliensis* efetuada, principalmente, através da enxertia por borbulha de material proveniente de clones conhecidos sobre cavalos obtidos por germinação de sementes não clonais, produz árvores geneticamente homogêneas com a planta de origem e com uma alta produção<sup>1</sup>.

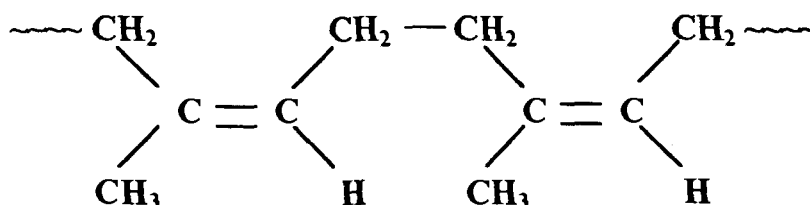
O LBN está contido no sistema de vasos laticíferos situados no córtex da árvore, formando um feixe helicoidal ascendente, que leva o alimento para as partes superiores da árvore<sup>17</sup>. Para se efetuar a sangria da seringueira, ou seja, a extração da borracha da árvore, remove-se uma película de casca ao longo da superfície do corte, para seccionar os vasos laticíferos e permitir o escoamento do LBN para o exterior<sup>17</sup>. O mesmo corte é reaberto a cada sangria pela retirada de mais uma camada delgada de casca, o que propicia novo fluxo de LBN. A inclinação do corte possibilita o escoamento do LBN até uma tigela onde será colhido.

O LBN fresco é constituído, basicamente, por três componentes fundamentais: a borracha, composta quase que exclusivamente pelo hidrocarboneto isoprênico; o soro, que contém em solução substâncias de natureza protéica e sais minerais; e os componentes não borracha, constituídos pelos lutóides e partículas Frey-Wyssling<sup>17</sup>. Assim, o LBN pode ser considerado um sistema coloidal polifásico, sendo a fase dispersa constituída de micelas de borracha, lutóides e partículas Frey-Wyssling, e o meio dispersivo constituído do soro aquoso.

As partículas de Frey-Wyssling em pequena quantidade são constituídas de carotenóides e lipídios conferindo, por isso, à borracha, a coloração mais ou menos amarela<sup>18</sup>. Os componentes dos lutóides são proteínas, fosfolipídios e sais minerais<sup>18</sup>. Os lutóides são partículas de dimensão maior que a das micelas da borracha e se acham circundados por uma tênue e muito frágil membrana. O soro é constituído, basicamente, por carboidratos, proteínas, sais minerais e

microorganismos, o que torna o LBN um produto perecível<sup>18</sup>. De 8 a 10 horas após a colheita ele coagula espontaneamente, separando a borracha em forma de coágulo que com o correr do tempo adquire cheiro putrefato.

As micelas de borracha com dimensão de 0,001 a 0,2 $\mu$  são dotadas de movimento Browniano e carga elétrica negativa<sup>18</sup>. Sob o ponto de vista químico, a borracha é constituída do polímero 1,4 cis poliisopreno na forma coloidal cuja estrutura química é dada a seguir.



O conteúdo de borracha seca (BS) é variável, notando-se que as primeiras sangrias, em árvores virgens ou em árvores após um repouso prolongado, produzem maior quantidade de BS, porém menor quantidade de LBN. Na medida em que as sangrias se sucedem, a quantidade de LBN aumenta e o conteúdo de BS decresce, até um certo limite<sup>17</sup>. O conteúdo de BS também decresce após períodos chuvosos ou em seguida a aplicação de estimulantes. O LBN apresenta um conteúdo de BS em torno de 30% a 35%, enquanto que o teor de sólidos totais (ST) é mais elevado, apresentando uma diferença entre BS e ST da ordem de 3,5%<sup>17</sup>. Entretanto esta diferença varia para cada região e, principalmente, época do ano e clone.

Na sangria, o LBN fresco recolhido na tigela está sujeito à ação de bactérias, assim, afim de evitar a coagulação, utilizam-se agentes de preservação como 1,6% de amônia na fase aquosa<sup>1</sup>. A amônia, apesar de ser um excelente agente de estabilização do LBN, apresenta propriedades antissépticas deficientes, razão pela qual, em casos específicos podem ser associados certos agentes de assepsia como o sal de sódio do pentaclorofenol<sup>17</sup>.

O LBN fresco passa por um processo de concentração (retirada de água) elevando o teor de BS para 60%. A concentração pode ser alcançada, geralmente, por via físico-mecânica (centrifugação) ou físico-química (cremagem ou evaporação). A centrifugação é o processo mais importante de concentração do LBN, abrangendo praticamente 88% da produção da Malásia, sendo os 12% restantes representados em partes iguais pelas concentrações por evaporação e por cremagem<sup>1</sup>. Esse processo realiza-se através de uma centrífuga de alta rotação onde são removidas as impurezas grosseiras (borra) e parte do soro do LBN fresco. Ao LBN concentrado por esse processo é adicionado amônia até o teor de 0,65%, m/m sobre o LBN, ou 1,6% de NH<sub>3</sub> na fase aquosa<sup>1</sup>. A embalagem é feita em tambores, que em casos especiais, podem ser revestidos internamente com polietileno<sup>17</sup>.

## 2.2 - PROCESSOS DE VULCANIZAÇÃO

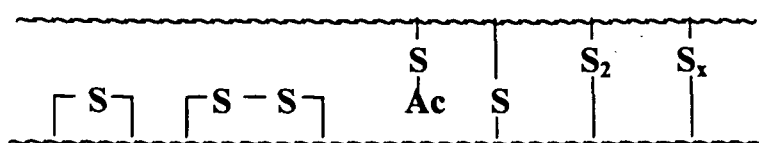
A vulcanização pode ser definida como o processo que provoca a transformação das propriedades plásticas da borracha, para elásticas<sup>1</sup>. O processo convencional, consiste da reação do enxofre com a borracha na presença de calor<sup>1,19</sup>, enquanto que, o processo alternativo consiste na vulcanização ou reticulação do LBN induzida com radiação ionizante, que ocorre à temperatura ambiente<sup>6</sup>. Ambos os processos promovem transformações nas propriedades do polímero, que concedem ao produto acabado melhores propriedades.

### 2.2.1 - Processo Convencional com Enxofre

No processo convencional, o sistema de vulcanização do LBN atualmente empregado é constituído pelo agente de vulcanização, o ativador e o acelerador<sup>1,19</sup>.

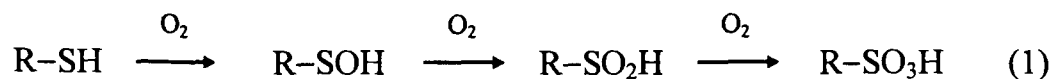
O agente de vulcanização pode ser classificado em dois grupos. O primeiro, o enxofre (S<sub>8</sub>), geralmente na forma rômica é o mais comum<sup>1</sup>. Na vulcanização, as macromoléculas poliméricas da borracha são ligadas por pontes de enxofre, e em

um sistema eficiente, as ligações são efetuadas por mono e dissulfetos e não deve ocorrer nenhuma formação de grupos cíclicos. As pontes intermoleculares de polissulfetos ou grupos cíclicos intramoleculares são termicamente mais fracos e estão sujeitos a sucessivas reações à medida que a borracha envelhece, promovendo alteração das suas propriedades mecânicas. Tipos de pontes de enxofre que podem existir num sistema convencional de vulcanização são mostrados abaixo, onde Ac é o acelerador<sup>1</sup>.

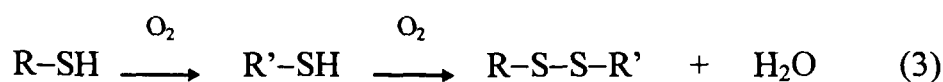
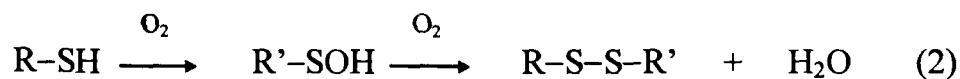


O segundo grupo de agentes de vulcanização, chamado de doadores de enxofre, compreende certos aceleradores contendo enxofre, que são compostos que se decompõem a determinadas temperaturas, liberando quantidades apreciáveis de enxofre<sup>1</sup>. Quando são utilizados estes aceleradores, o enxofre elementar poder ser reduzido ao mínimo, ou mesmo eliminado.

Os átomos de enxofre são sujeitos à reações de oxidação e redução<sup>20</sup>. As principais reações em compostos orgânicos serão discutidas a seguir. Os tióis podem ser oxidados à ácido sulfônico embora esse mecanismo não seja muito claro:

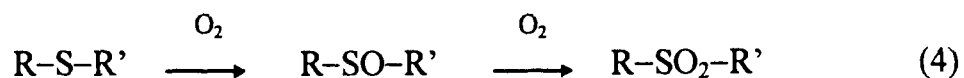


Outro mecanismo possível para oxidação dos tióis é a sua transformação em dissulfetos:

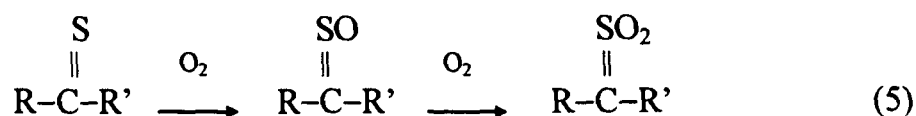




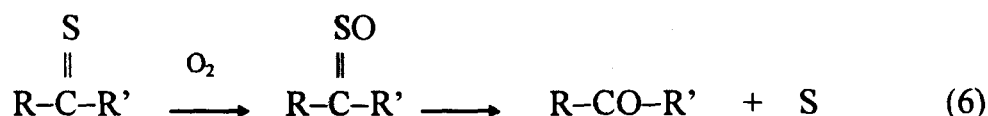
Os sulfetos podem também ser oxigenados da seguinte forma:



Tiocarbonilas também podem ser oxigenados assim:



Outro mecanismo proposto, que ocorre também com tioamidas e tiurãs, envolve um rearranjo com a expulsão do enxofre:



O produto  $\text{R-CO-R}'$  formado reage rapidamente com substâncias nucleofílicas de macromoléculas biológicas promovendo efeitos tóxicos significantes. Acredita-se que tal mecanismo possa explicar a carcinogenicidade de um número de tioamidas<sup>20</sup>. Por outro lado, enxofre que não reage e migra para a superfície do produto de borracha pode promover irritação da pele<sup>21</sup>.

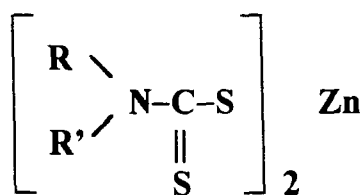
O enxofre reage lentamente com a borracha, por isso, a ausência de aceleradores tornaria antieconômica a vulcanização do LBN e a fabricação de seus artefatos. Assim, os aceleradores, substâncias que aumentam a velocidade de vulcanização, reduzem o tempo necessário para que o vulcanizado adquira suas melhores características e, além disso, os aceleradores melhoram as propriedades físicas em geral, principalmente, a resistência ao envelhecimento.

Os aceleradores podem ser classificados de acordo com sua composição química, assim como quanto à sua velocidade de ação na vulcanização da borracha<sup>1</sup>. Os principais tipos de aceleradores em uso comercial são dados na Tabela 1.

Tabela 1 - Principais tipos de aceleradores comerciais utilizados na vulcanização da borracha<sup>1</sup>.

Tipos	Exemplos	Velocidade de vulcanização
Aminas	Hexametilenotetramina (HMT)	lenta
Guanidina	Difenil guanidina (DPG) Diortotoluil guanidina (DOTG)	média
Tiazóis	Mercaptobenzotiazol (MBT) Dissulfeto de mercaptobenzotiazila (MBTS)	semi-rápida
Sulfenamidas	N-ciclohexil 2-benzotiazil sulfenamida (CBS)	rápida
Tiurãs	Dissulfeto de tetrametiltiurã (TMTD) Monossulfeto de tetrametiltiurã (TMTM)	muito rápida
Ditiocarbamatos	Dietil ditiocarbamato de zinco (ZDEC) Dibutil ditiocarbamato de zinco (ZDBC) Dimetil ditiocarbamato de zinco (ZDMC) Pentametileno ditiocarbamato de zinco (ZPC) Etil fenil ditiocarbamato de zinco (ZEPC)	ultra rápida

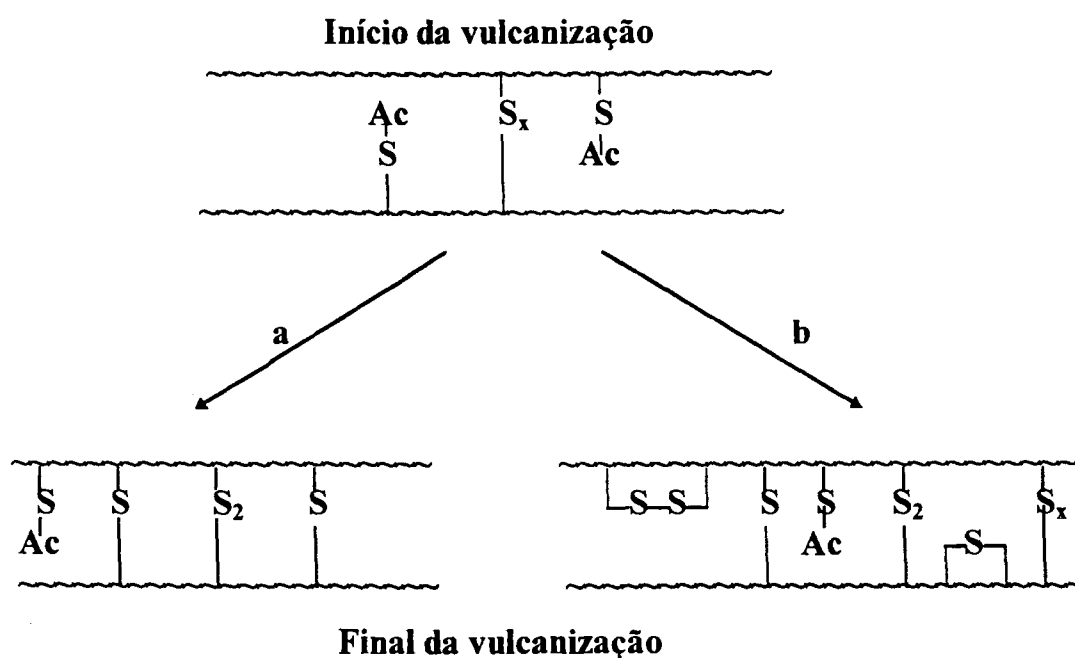
O uso de ultra-aceleradores na vulcanização do LBN, como os da família dos ditiocarbamatos, é comum devido ao processo ser realizado em temperaturas abaixo de 100°C<sup>19</sup>. Os ditiocarbamatos são empregados, principalmente, em artigos claros ou translúcidos, como luvas, cateteres, etc<sup>22</sup>. Os mais empregados são os sais de zinco, cuja fórmula genérica é dada a seguir.



Investigações realizadas em chupetas, bicos de mamadeira, brinquedos, luvas e balões, demonstraram contaminação desses produtos por nitrosaminas, que são compostos carcinogênicos<sup>23,24</sup>. A contaminação de aminas por seus correspondentes N-nitroso análogos e o uso de derivados de dialquilaminas de aceleradores e estabilizadores, utilizados no processo convencional de vulcanização do LBN, promovem a contaminação por nitrosaminas em produtos de borracha<sup>23</sup>.

Os aceleradores do tipo ditiocarbamatos podem causar a formação de amins e de dissulfeto de carbono. Essas amins com óxidos de nitrogênio, originários do processo de secagem ou do meio ambiente, podem formar nitrosaminas<sup>25</sup>. Vários países têm limitado a concentração de nitrosaminas e compostos N-nitrosos nos produtos e no ambiente da fábrica de borracha. A Europa iniciou a regulamentação para concentração de nitrosaminas (máximo 10ppb) e compostos N-nitrosos (máximo 100ppb) em chupetas e bicos de mamadeira, entretanto, não é fácil obter esses valores utilizando o processo convencional de vulcanização<sup>6</sup>.

Outro composto importante na vulcanização convencional é o óxido de zinco, que é usado para aumentar a velocidade de vulcanização pela ativação do acelerador. O mecanismo baseia-se na formação, juntamente com o acelerador, de um sal complexo que, em presença de calor, reage com o enxofre promovendo mais rapidamente e eficientemente a vulcanização da borracha<sup>1</sup>. Sistemas de vulcanização do LBN com enxofre e acelerador com alta concentração de zinco (a) promovem estruturas reticuladas mais estáveis e produtos com melhores propriedades mecânicas, quando comparados com os de baixa concentração de zinco (b), como é mostrado a seguir<sup>26</sup>:



Outra preocupação é a poluição ambiental causada por produtos de LBN quando incinerados, principalmente, pela formação de gases tóxicos como  $\text{SO}_2$  e  $\text{CO}$ , que causam intensa irritação nos olhos e problemas respiratórios<sup>21</sup>, e suas cinzas, principalmente de  $\text{ZnO}$ , que podem causar tosse, febre e problemas pulmonares<sup>21</sup>.

### 2.2.2 - Processo Alternativo com Radiação Ionizante

A radiação ionizante ou radiação de alta energia, compreende radiações eletromagnéticas (raios-x e raios- $\gamma$ ), partículas (partículas  $\alpha$ , partículas  $\beta$ , feixe de elétrons, prótons e nêutrons) e fragmentos de fissão<sup>27</sup>. As radiações mais empregadas na indústria são, a radiação gama emitida por uma fonte de radioisótopo de  $^{60}\text{Co}$  ou de  $^{137}\text{Cs}$ , feixes de elétrons de alta energia provenientes de máquinas aceleradoras e radiações ultravioleta provenientes de lâmpadas de mercúrio ( $\lambda < 200\text{nm}$ ).

A vulcanização do LBN induzida com radiação ionizante, normalmente raios gama, tem sido investigada desde os anos 60, entretanto este processo não têm sido usado industrialmente, principalmente, devido ao alto custo da irradiação<sup>6</sup>. Atualmente, essa situação têm sido modificada, devido a progressos na redução do custo e devido à necessidade de soluções para problemas relacionados à saúde de usuários de produtos de LBN vulcanizado pelo processo convencional<sup>6</sup>.

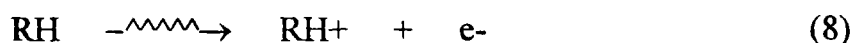
Estudos sobre a vulcanização do LBN com feixes de elétrons, demonstram que este tipo de irradiação promove efeito semelhante ao dos raios gama<sup>28</sup>. Essa irradiação é considerada mais econômica, entretanto, apresenta baixa penetração na matéria. Por isso, a vulcanização do LBN em pesquisas, normalmente, é realizada com raios gama.

O radioisótopo  $^{60}\text{Co}$ , comumente usado como fonte de radiação gama, tem uma meia-vida de 5,3 anos e emite principalmente partículas  $\beta$  de no máximo 0,31MeV, que são absorvidas pelo material que contém a fonte, e raios- $\gamma$  de 1,33MeV e 1,17MeV<sup>29</sup>. O seu decaimento é representado assim:  $^{60}\text{Co} \rightarrow \beta, \gamma \rightarrow ^{60}\text{Ni}$ . Esta fonte é produzida pela irradiação do  $^{59}\text{Co}$  em um reator nuclear, segundo a reação nuclear:  $^{59}\text{Co} (n, \gamma) ^{60}\text{Co}$ .

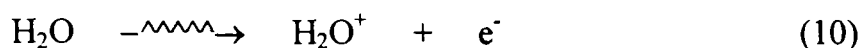
O efeito predominante da interação da radiação gama com a matéria é o espalhamento Compton. Neste processo, o fóton interage tanto com elétrons ligados ao núcleo atômico como com elétrons livres, espalhando-se. Parte da energia do fóton incidente pode ser usada para arrancar o elétron do seu orbital com considerável energia cinética ou acelerar o elétron livre, e o restante da energia continua no fóton espalhado<sup>29</sup>. A interação do fóton com o núcleo atômico de um material pode ser negligenciada se a energia for menor que 10MeV e se o material for constituído apenas de núcleos leves, como é o caso dos polímeros orgânicos (LBN). Assim, a interação dessa energia ocorre à nível eletrônico, não tornando o material radioativo.

A interação da radiação ionizante (feixe de elétrons ou raios gama) com o LBN, promove a formação de radicais livres provenientes da radiólise do polímero e da água, os quais promovem a formação de ligações intermoleculares entre os átomos de carbono das macromoléculas poliméricas da borracha<sup>30</sup>. As equações que seguem, mostram a interação da radiação ionizante com materiais poliméricos, representados por RH, e a água<sup>27</sup>.

A reação primária da interação da radiação com a molécula polimérica irá formar uma molécula excitada ou íons:



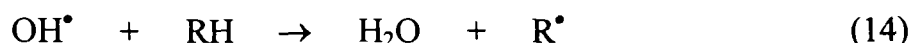
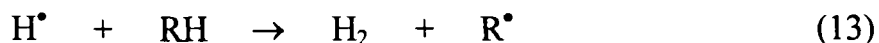
A interação da radiação com a água, também formará uma molécula excitada ou íons:



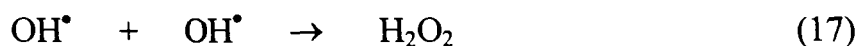
As moléculas excitadas podem perder o excesso de energia em processos de relaxação ou sofrer cisão homolítica com a formação de radicais livres:



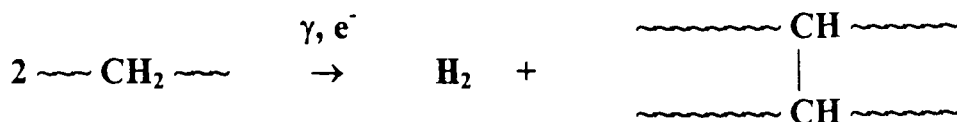
Esses radicais podem reagir com as moléculas poliméricas estáveis produzindo mais radicais:



A recombinação dos radicais livres pode resultar, na formação de água, hidrogênio molecular, peróxidos e na reticulação das moléculas poliméricas:



Durante a irradiação do LBN a cadeia carbônica das moléculas poliméricas também é rompida mas a reticulação ocorre em maior grau<sup>31</sup>. Assim a vulcanização do LBN induzida com radiação ionizante pode ser representada assim:



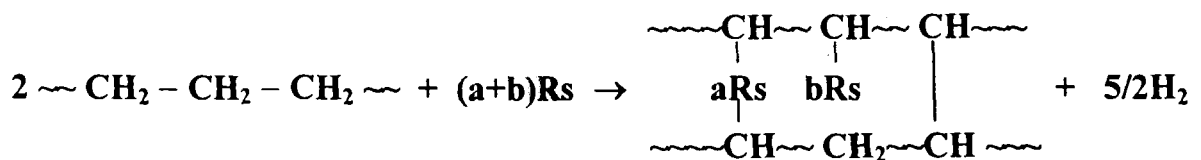
Esse processo de vulcanização só deve ser utilizado industrialmente para borracha natural na forma de látex, porque o  $G_{\text{radical}}$  (número de radicais formados por 100eV de energia absorvida) da borracha seca é muito pequeno, da ordem de 0,5, enquanto que no LBN as espécies radiolíticas provenientes da água favorecem a reticulação<sup>32</sup>.

Na vulcanização do LBN com raios gama, a DV, que é a dose para se obter o máximo de resistência à tração de filmes de LBN irradiado, é da ordem de 250 a 350kGy, o que é uma dose muito elevada para encontrar aplicação industrial<sup>6</sup>. Por isso, estudos realizados com o uso de compostos com alto valor de  $G_{\text{radical}}$ , chamados radiosensibilizadores, capazes de promover a vulcanização em doses menores, tornam a radiação ionizante um processo de vulcanização industrialmente viável<sup>11,13,33,34,35,36</sup>. O hidrocarboneto tetracloreto de carbono,  $G_{\text{radical}} = 70$  têm sido usado como radiosensibilizador para o processo de vulcanização do LBN induzida com radiação ionizante<sup>32</sup>, entretanto, esse composto é considerado tóxico<sup>21</sup>.

Monômeros acrílicos, principalmente monômeros polifuncionais, são radiosensibilizadores usados em radiação ionizante por aumentar a produção de enxertia sob certas condições de irradiação, acelerar a taxa de polimerização, acelerar a promoção de ligações cruzadas em processos de cura, e necessitar de menores doses de radiação para vulcanização do LBN<sup>37</sup>. Estudo com os radiosensibilizadores dimetacrilato de neopentilglicol, diacrilato de neopentilglicol e tetracloreto de carbono, demonstraram que o diacrilato de neopentilglicol é um eficiente radiosensibilizador<sup>6</sup>, entretanto, os diacrilatos promovem, normalmente, de moderada a severa irritação da pele<sup>37</sup>.

Os acrilatos monofuncionais como acrilato de 2etilhexila (2EHA) e o An-B também têm sido investigados, embora, em relação aos diacrilatos, apresentem menor eficiência de reticulação<sup>6</sup>.

Estudos sobre o mecanismo de vulcanização do isopreno líquido com 2EHA<sup>38</sup> e do LBN irradiado com monoacrilatos<sup>39</sup>, sugerem que as ligações cruzadas são formadas por radicais do radiosensibilizador enxertados na cadeia principal do polímero. Assim, a estrutura das ligações das macromoléculas poliméricas da borracha na vulcanização do LBN com radiação ionizante e um radiosensibilizador acrilato monofuncional pode ser representada assim:



Estudo sobre a fabricação de luvas, em escala piloto, pelo processo de vulcanização do LBN induzida com radiação ionizante e com 2EHA<sup>6</sup>, demonstraram que os artefatos adquirem cheiro, devido à presença de resíduos de 2EHA que são dificilmente removidos, e que provavelmente, devem causar irritação da pele ou outros efeitos adversos aos usuários.

O An-B pode ser removido mais facilmente dos artefatos que o 2EHA devido à sua maior pressão de vapor, em relação ao 2EHA, entretanto, esse radiosensibilizador pode causar aumento da viscosidade do LBN e promover coagulação. Estudos sobre a aplicação do An-B como radiosensibilizador na vulcanização do LBN<sup>11,36</sup>, demonstraram que o uso do KOH como estabilizador do LBN é muito eficiente.

Avaliações toxicológicas de filmes de LBN com An-B<sup>7</sup> demonstraram, em teste de implante em músculo de coelhos, que eles promovem leve reação inflamatória do tecido muscular, e que essa reação é passageira. Assim a escolha do



radiossensibilizador, para benefício dos usuários de artefatos de LBN, deve basear-se na busca de um equilíbrio das propriedades físicas, necessárias para vulcanização, e toxicológicas, necessárias para a utilização.

### 2.3 - BIOCMPATIBILIDADE

A tecnologia de materiais poliméricos trouxe uma grande contribuição na área da saúde para a confecção de produtos médico-hospitalares, odontológicos e farmacêuticos. Atualmente, de aproximadamente 400.000 produtos médicos, cerca de 400 são feitos de LBN e o grupo mais importante desses produtos são os preservativos e luvas médicas<sup>40</sup> O LBN também está presente em acessórios, como máscaras e tubos utilizados em sala de cirurgia. Outra aplicação é encontrada em produtos para crianças, como chupetas, bicos de mamadeira, balões e brinquedos.

Segundo Park<sup>41</sup>, biomateriais são tudo que, de modo contínuo ou intermitente, entra em contato com fluidos corpóreos, mesmo que esteja localizado fora do corpo. Eles envolvem uma variedade de produtos cujo contato com os fluidos do corpo pode ser realizado de diferentes maneiras e por variados períodos, e cujo grau de risco à saúde exige consciente avaliação de sua aplicabilidade.

Manifestações toxicológicas de um biomaterial resultam, primeiramente, da liberação de seus constituintes químicos levando a uma resposta local na pele, resposta toxicológica sistêmica, resposta alérgica e respostas carcinogênica, teratogênica e/ou mutagênica<sup>42</sup>. A ISO 10993<sup>43</sup> é uma combinação de numerosas normas internacionais, com o objetivo de avaliar biologicamente os produtos médicos, através do auxílio na seleção de testes aplicáveis relativos à função e ao tipo de contato do material com o corpo. Os testes incluem citotoxicidade, irritabilidade, sensibilidade, toxicidade sistêmica, mutagenicidade, etc, e fornecem uma resposta de segurança em relação ao uso do produto. Na avaliação não existe a necessidade do conhecimento dos constituintes químicos do material para realizar a

análise, e a resposta da avaliação é feita por integração do resultado do teste com a análise do risco-benefício para o usuário. Isso significa que produtos médicos não têm que ser completamente livre de efeitos adversos, e sim que os benefícios sejam significativamente maiores que esses efeitos clínicos adversos, da mesma forma que esse material deve ser capaz de realizar a função proposta para sua aplicação<sup>44</sup>.

Os problemas associados ao uso de produtos de LBN são causados principalmente por proteínas, produtos químicos de vulcanização e aditivos em pó<sup>9,44</sup>. As proteínas do LBN são naturais da própria árvore *Hevea brasiliensis* e são extraídas juntamente com a borracha durante a sangria. Essas proteínas, que em parte são destruídas ou removidas durante o processo industrial, ainda permanecem no produto final e podem migrar para a superfície do artefato entrando em contato com o tecido humano e causando reações alérgicas do tipo I. Essas reações podem ser locais ou generalizadas, como urticária, rinite, conjuntivite, asma e em caso extremo reações anafiláticas que podem levar o indivíduo à morte<sup>45,46</sup>. O problema causado por produtos químicos empregados para promover a vulcanização do LBN, principalmente aceleradores como os carbamatos e tiurãs, é a reação alérgica do tipo IV. Esses produtos podem causar dermatite de contato, vermelhidão, coceira, etc<sup>22,47</sup>. Outro problema é a irritação causada por aditivos, principalmente em luvas, como produto químico em pó usado como desmoldante, que desenvolvem sintomas semelhantes a das reações alérgicas e podem interferir com o resultado do teste de sensibilização *in vivo*<sup>44</sup>. Por outro lado, as proteínas e produtos químicos de vulcanização também podem ser adsorvidos e/ou absorvidos pelas partículas do pó e causar reações alérgicas por inalação ou deposição na pele<sup>48,49</sup>.

Testes *in vitro* são habitualmente efetuados como testes de triagem no início da avaliação da biocompatibilidade de materiais. O ensaio de citotoxicidade, teste *in vitro*, é muito utilizado no prognóstico da toxicidade de materiais<sup>43,50</sup>. A ISO 10.993-5<sup>51</sup> refere-se ao teste de citotoxicidade, como um teste *in vitro* de aplicabilidade geral usado largamente com o objetivo de sugerir, a partir de seus resultados, um plano de testes posteriores aplicáveis ao material. As vantagens desse

teste é que ele é muito sensível e seus resultados obtidos pela formação de colônias celulares, inibição de crescimento de células, etc, fornecem informação integrada dos componentes do material com o meio biológico. A dificuldade de interpretação do teste é quando seus valores positivos não correlacionam com testes *in vivo*. Por outro lado, quando o resultado da citotoxicidade é negativo, fornece grande margem de segurança em relação à ausência de toxicidade no material.

O uso de testes *in vivo* para a caracterização da resposta biológica, visa avaliar a resposta do animal, parcialmente ou como um todo, em relação ao tratamento efetuado com o material. A ISO 10993-11<sup>52</sup> refere-se ao teste de toxicidade sistêmica, que avalia a resposta biológica do organismo inteiro em relação aos constituintes liberados pelo material. Evidências clínicas e experimentais de efeitos sistêmicos de biomateriais é extremamente raro. Entretanto, uma severa toxicidade sistêmica com morte do animal, indica grande possibilidade de risco à saúde humana e o material não deve ser empregado para aplicações médicas<sup>42,43</sup>.

## Capítulo 3

### PARTE EXPERIMENTAL

Neste Capítulo será apresentada a metodologia usada ao longo do desenvolvimento desse trabalho. Inicialmente o LBN foi caracterizado através de análises físicas e químicas e formulado para vulcanização pelo processo convencional com enxofre e pelo processo alternativo com raios gama. No processo alternativo foram irradiadas duas séries de LBN, uma na ausência e outra na presença de radiosensibilizador. Posteriormente foram realizados testes de resistência à tração (RT) dos filmes dos LBN irradiados com diferentes doses para determinação das DV correspondentes de cada série, e, do filme vulcanizado com enxofre. Encerrada esta etapa, foram preparados filmes representativos dos processos de vulcanização e, um filme do LBN não vulcanizado. Esses filmes foram submetidos aos testes biológicos *in vitro* de citotoxicidade e *in vivo* de toxicidade sistêmica em camundongos.

#### 3.1 - CARACTERIZAÇÃO DO LÁTEX DE BORRACHA NATURAL

O LBN comercial da Almatex, concentrado a 60%, tipo alto teor de amônia, proveniente da Malásia foi submetido a ensaios físicos e químicos para avaliação de sua qualidade. Os resultados obtidos foram comparados com especificações e utilizados na formulação.

As soluções utilizadas foram preparadas com reagentes de grau analítico e água deionizada, exceto o oleato de potássio de grau comercial da Química Anastácio S.A. As pesagens até 100g foram realizadas em uma balança analítica da Mettler modelo AE 200 e acima de 100g em uma balança semi-analítica da Mettler

modelo PE 360. As medidas de pH foram feitas em um pH-metro da Micronal modelo 374 com um eletrodo tipo calomelano. As medidas de viscosidade foram feitas com um viscosímetro da Brookfield modelo LVF a 25°C. As secagens realizadas na temperatura de  $100 \pm 2^\circ\text{C}$  foram feitas em estufa da Fanem modelo 315 SE, e na temperatura de  $70 \pm 2^\circ\text{C}$  foram feitas em uma estufa com circulação de ar da Fanem modelo 320 SE. As filtragens de látex foram realizadas em peneira de aço inoxidável com malha de  $180\mu$ . Os ensaios foram realizados em duplicata e o resultado foi calculado como a média de duas determinações. Todos esses ensaios que serão descritos a seguir, exceto a determinação do teor de Cu, Mn e Mg, foram realizadas segundo a norma ABNT EB226/89<sup>53</sup>:

### 3.1.1 - Teor de Sólidos Totais

Pesou-se o LBN em um pesa filtro previamente tarado e em seguida colocou-se o pesa filtro em uma estufa a  $100 \pm 2^\circ\text{C}$  por 2 horas. Posteriormente foi resfriado em um dessecador e pesado. As determinações da porcentagem de ST foram efetuadas através da equação 19, onde  $m_{LS}$  é a massa do LBN seco em g e  $m_{LBN}$  é a massa inicial do LBN em g.

$$ST = 100m_{LS} / m_{LBN} \quad (19)$$

### 3.1.2 - Teor de Borracha Seca

Em um béquer previamente tarado e contendo cerca de 10g de LBN adicionou-se 15mL de água deionizada para atingir um teor de ST de aproximadamente 25%. Em seguida foi acrescentada uma solução de ácido acético a 2%, sob agitação lenta e constante, até coagulação completa do LBN. O béquer foi colocado em um banho termostático da Quimis a  $70^\circ\text{C}$  onde permaneceu em repouso por 15 minutos e,

posteriormente, o coágulo foi lavado em água corrente e passado em uma calandra por várias vezes. O filme assim obtido foi seco em estufa a  $70 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 16 horas e posteriormente resfriado em dessecador e pesado. As determinações da BS foram efetuadas através da equação 20, onde  $m_{CS}$  é a massa do coágulo seco em g.

$$BS = 100m_{CS} / m_{LBN} \quad (20)$$

### 3.1.3 - Teor de Sólidos Não Borracha

O teor de sólidos não borracha (SNB), em porcentagem, foi calculado a partir dos teores de ST e de BS determinados nos itens 3.1.1 e 3.1.2, respectivamente, e através da equação 21.

$$SNB = ST - BS \quad (21)$$

### 3.1.4 - Teor de Coágulo

O LBN pesado foi diluído com 200mL de solução de oleato de potássio a 5%. Filtrou-se esta mistura através de uma peneira previamente tarada. O coágulo retido foi lavado com a solução de oleato de potássio a 5% e em seguida com água deionizada até eliminar visualmente os resíduos de sabão. Secou-se o coágulo em estufa a  $70 \pm 2^\circ\text{C}$  por 16 horas e pesou-se, após esfriamento prévio em dessecador. As determinações foram calculadas conforme a equação 22 onde C é a porcentagem de coágulo.

$$C = 100m_{CS} / m_{LBN} \quad (22)$$

### 3.1.5 - Teor de Cu, Mn e Mg

Os teores de Cu, Mn e Mg foram determinados por análise por ativação com nêutrons, na Divisão de Radioquímica do IPEN.

Cerca de 150mg de borracha, obtido do filme de LBN não vulcanizado, foi pesado em um invólucro de plástico de polietileno, previamente limpo com solução de ácido nítrico diluído e água destilada, e irradiado com nêutrons no reator nuclear IEA-R1, juntamente com os padrões sintéticos dos elementos Cu, Mn e Mg. O ensaio foi realizado com irradiações curtas de 5 minutos sob fluxo de nêutrons térmicos de  $4,25 \times 10^{11} \text{ n.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

As atividades gama induzidas aos elementos da amostra e dos padrões sintéticos, após adequados tempos de decaimento, foram medidas no detetor de Ge hiperpuro. Os espectros gama foram processados usando o programa de computação VISPECT2 e os radioisótopos formados foram identificados pela energia dos raios gama emitidos e a sua meia vida. As concentrações dos elementos foram calculadas pelo método comparativo de análise por ativação com nêutrons.

### 3.1.6 - Estabilidade Mecânica

Pesou-se aproximadamente 100g de LBN e adicionou-se 12mL de solução aquosa de amônia a 1,6% para atingir aproximadamente 55% de ST. A seguir, o LBN diluído foi aquecido a 36°C em um banho termostático da Quimis, e imediatamente filtrado. Em seguida, pesou-se cerca de 80g de LBN filtrado no frasco de ensaio do agitador mecânico da Fisaton modelo 714 de  $14000 \pm 200\text{rpm}$ . O agitador foi acionado e o LBN submetido à agitação. Periodicamente, sem parar o aparelho, foi imerso um bastão de vidro no LBN e friccionado uma única vez sobre a palma da mão, até ser verificada a ocorrência de coágulos puntiformes. A

estabilidade mecânica (EM) do LBN foi expressa como o número de segundos gastos desde o início do teste até o seu ponto final.

### 3.1.7 - Alcalinidade Total

Pesou-se o LBN em erlenmeyer de 500mL e adicionou-se 300mL de água deionizada. Imediatamente o recipiente foi tampado para evitar perda de amônia. Adicionou-se algumas gotas de solução de vermelho de metila a 0,1% e titulou-se com solução padrão de ácido clorídrico a 0,1N com fator de correção 1,018 até o ponto de viragem do indicador. As determinações da porcentagem de alcalinidade total (AT) foram efetuadas através da equação 23, onde  $N_{HCl}$ ,  $f_{HCl}$  e  $V_{HCl}$  são a normalidade, o fator de correção e o volume em mL da solução de HCl a 0,1N, respectivamente.

$$AT = 1,7 N_{HCl} f_{HCl} V_{HCl} / m_{LBN} \quad (23)$$

### 3.1.8 - Alcalinidade em $NH_3$

A alcalinidade em  $NH_3$  (AA) na fase aquosa, em porcentagem, foi determinada a partir dos resultados do teor de ST e da AT, conforme os itens 3.1.1 e 3.1.7, respectivamente, e através da equação 24.

$$AA = AT / 1 - 10^{-2} ST \quad (24)$$



### 3.1.9 - Índice de KOH

Pesou-se 81g de LBN contendo aproximadamente 50g de ST em um béquer de 400mL. Ajustou-se o conteúdo de amônia para aproximadamente 0,5% da fase aquosa adicionando 20mL de uma solução de formaldeído a 0,5% (1mL  $\cong$  0,0189 NH<sub>3</sub>) com agitação lenta e constante. Calculou-se o volume em mL da solução de formaldeído ( $V_F$ ) conforme equação 25.

$$V_F = m_{LBN} (100 - ST) (AA - 0,50) / 189 \quad (25)$$

Após o ajuste, foi adicionado 65mL de água deionizada no LBN para atingir aproximadamente 30% de ST. Foram adicionados incrementos de 1mL de solução de hidróxido de potássio a 0,5N, com fator de correção 1,055, e determinou-se o pH para cada incremento através da leitura direta no visor do pH-metro. O ponto de inflexão da curva de titulação acha-se aproximadamente dentro do incremento no qual o primeiro diferencial,  $\Delta\text{pH}/\Delta\text{mL}$ , é máximo. A Tabela 2 mostra que foram encontrados os valores 0,28 e 0,30 para as duplicatas 01 e 02 respectivamente e o ponto final da titulação, entre os incrementos de 11 e 12mL.

Tabela 2 - Valores experimentais de pH do LBN para incrementos de 1mL de solução de KOH a 0,5N.

Amostra 01				Amostra 02			
KOH (mL)	pH	1ºDiferencial ( $\Delta\text{pH}/\Delta\text{mL}$ )	2ºDiferencial ( $\Delta(\Delta\text{pH}/\Delta\text{mL})$ )	KOH (mL)	pH	1ºDiferencial ( $\Delta\text{pH}/\Delta\text{mL}$ )	2ºDiferencial ( $\Delta(\Delta\text{pH}/\Delta\text{mL})$ )
1	10,57	-	-	1	10,49	-	-
2	10,63	0,06	-	2	10,58	0,09	-
3	10,69	0,06	0,00	3	10,66	0,08	0,01
4	10,76	0,07	0,01	4	10,74	0,08	0,00
5	10,85	0,09	0,02	5	10,84	0,10	0,02
6	10,93	0,08	0,01	6	10,94	0,10	0,00
7	11,04	0,11	0,03	7	11,05	0,11	0,01
8	11,16	0,12	0,01	8	11,18	0,13	0,02
9	11,32	0,16	0,04	9	11,38	0,20	0,07
10	11,54	0,22	0,06	10	11,61	0,23	0,03
11	11,81	0,27	0,05	11	11,91	0,26	0,03
12	12,09	0,28	0,01	12	12,17	0,30	0,04
13	12,33	0,26	0,02	13	12,40	0,28	0,02
14	12,49	0,16	0,10	14	12,57	0,17	0,11

A posição mais provável dentro do incremento foi obtida pela razão de valores adjacentes do segundo diferencial,  $0,01/0,01+0,02$  para a amostra 01 e  $0,04/0,04+0,02$  para a amostra 02. Portanto foram gastos 11,33mL e 11,67mL de solução de KOH a 0,5N, respectivamente. O cálculo do índice de KOH ( $I_{\text{KOH}}$ ) foi realizado através da equação 26, onde  $N_{\text{KOH}}$ ,  $f_{\text{KOH}}$  e  $V_{\text{KOH}}$  são a normalidade, o fator de correção e o volume em mL da solução de KOH a 0,5N, respectivamente.

$$I_{\text{KOH}} = 561 N_{\text{KOH}} f_{\text{KOH}} V_{\text{KOH}} / ST_{\text{mLBN}} \quad (26)$$

### 3.1.10 - Índice de Ácidos Graxos Voláteis

Pesou-se 50g de LBN em um béquer de 250mL. Adicionou-se 50mL de solução de sulfato de amônio a 350 g/L e agitou-se com um bastão de vidro. O béquer foi colocado em um banho termostático da Quimis a 70°C até ocorrer coagulação completa. Deixou-se em repouso por 1 hora. Filtrou-se o soro e recolheu-se o filtrado em um erlenmeyer de 50mL. Foi transferido 25mL do filtrado (soro) para um segundo erlenmeyer de 250mL e adicionado 5 mL de uma solução aquosa de ácido sulfúrico 2:5 v/v. Tampou-se o erlenmeyer e agitou-se até completa homogeneização da solução. Foi transferido 10mL de soro acidificado para a câmara interna do destilador Markham e efetuou-se a destilação. Após coletar 100mL do destilado, este foi transferido para um erlenmeyer de 250mL e titulado rapidamente com solução de hidróxido de bário a 0,01N com fator de correção 1,003 em presença da solução indicadora de azul de bromotimol alcoólico a 10g/L. Foi realizada uma prova em branco, porém com a substituição das 50g de látex por 20mL de água deionizada e o restante da análise seguiu o mesmo procedimento. As determinações do índice de ácidos graxos voláteis ( $I_{\text{AGV}}$ ) foram realizadas conforme a equação 27, onde  $N_{\text{Ba(OH)}_2}$ ,  $f_{\text{Ba(OH)}_2}$  e  $V_{\text{Ba(OH)}_2}$  são a normalidade, o fator de correção e o volume em mL da solução de  $\text{Ba(OH)}_2$  a 0,01N, respectivamente.

$$I_{AGV} = 561 N_{Ba(OH)_2} f_{Ba(OH)_2} V_{Ba(OH)_2} / M ST \quad (27)$$

M,  $V_S$  e  $V_{(NH_4)_2SO_4}$  são, respectivamente, a massa de LBN correspondente a 10 mL de soro acidificado, volume do soro (25mL) e o volume da solução de sulfato de amônio a 350 g/L (50mL) (equação 28)

$$M = m_{LBN} V_S / 3 (V_{(NH_4)_2SO_4} + S) \quad (28)$$

S e  $d_S$  (equação 29) são, respectivamente, o soro em mL e a sua densidade, cujo valor é de  $1,02 \text{ g/cm}^3$ , obtido na norma ABNT-EB226/89<sup>53</sup>.

$$S = 100 - BS / 2 d_S \quad (29)$$

### 3.1.11 - Viscosidade

Pesou-se 500g de LBN, previamente filtrado, em um béquer de 600mL e adicionou-se 13mL de água deionizada para atingir um teor de ST de aproximadamente 60%. As medidas de viscosidade foram obtidas utilizando-se o fuso número 1, cuja leitura foi feita na escala 100 com velocidade de 30 rpm. A viscosidade foi determinada multiplicando-se o valor da leitura na escala 100 por 2 e expressa em centipoises.

### 3.1.12 - Cor

Uma amostra de LBN foi colocada sobre uma placa de Petri e posteriormente depositada sobre um fundo branco onde sua cor foi verificada visualmente.

### 3.1.13 - Odor

Transferiu-se aproximadamente 2mL de LBN para um tubo de ensaio e adicionou-se 10 mL de solução saturada de ácido bórico para neutralizar a amônia. Agitou-se e verificou-se o odor.

## 3.2 - VULCANIZAÇÃO

Nesta etapa, o LBN analisado foi formulado e vulcanizado conforme o processo empregado. Inicialmente, no processo convencional, as matérias primas foram adicionadas ao LBN na forma de dispersões e a vulcanização foi atingida após cerca de 3 horas de aquecimento a 70°C. O LBN neste estágio de vulcanização é denominado, industrialmente pré-vulcanizado. No processo alternativo, foram preparadas duas séries de amostras, sem e com radiosensibilizador, e ambas submetidas à irradiação com raios gama, na presença de ar e na temperatura ambiente.

### 3.2.1 - Processo Convencional

Neste processo todos os reagentes foram de grau comercial, tais como enxofre rômico ( $S_8$ ) como agente de vulcanização, dietilditiocarbamato de zinco (ZDEC) como acelerador de processo, óxido de zinco como ativador do acelerador e um sal sódico orgânico como agente de dispersão. A água utilizada foi deionizada. Utilizou-se um moinho de bolas para a preparação das dispersões e um equipamento de aço inoxidável aquecido por vapor de água, ambos de fabricação própria e cedido pela Indústria Nacional de Artefatos de Látex Ltda (INAL).

### 3.2.1.1 - Preparação e Análise da Solução de KOH

A solução de KOH foi preparada a 10% para formulação do LBN e os valores de ST foram determinados conforme item 3.1.1. A Tabela 3 mostra o teor de ST da solução de KOH, onde o resultado é apresentado como a média de duas determinações.

Tabela 3 - Determinação do teor de sólidos totais da solução de KOH.

Amostra	$m_{\text{KOHs}}$ (g)	$m_{\text{KOH}}$ (g)	ST (%)	ST médio (%)
01	2,047	0,206	10,063	10,08
02	2,009	0,203	10,104	

O valor de 10,08% de ST da solução de KOH correspondente à concentração que foi utilizada na formulação do LBN para a vulcanização do processo convencional.

### 3.2.1.2 - Preparação e Análise das Dispersões

As dispersões aquosas foram obtidas diminuindo-se o tamanho da partícula do sólido, em presença de um agente de dispersão e empregando-se um moinho de bolas onde foi ocupado 50% de seu volume por bolas e ar; cerca de 30% pela dispersão, que preencheu os vazios entre as bolas até um pouco acima da superfície delas e o restante do volume foi destinado para a zona de vapores. As dispersões foram baseadas em formulações clássicas<sup>1</sup>.

#### 1 - Dispersão de enxofre (50%)

Enxofre.....	50,0g
Agente de dispersão.....	2,5g
Água deionizada.....	47,5g
	-----
	100,0g

Tempo de batimento = 72 horas

**2 - Dispersão de ZDEC (50%)**

ZDEC.....	50,0g
Agente de dispersão.....	2,5g
Água deionizada.....	47,5g
	-----
	100,0g

Tempo de batimento = 48 horas

**3 - Dispersão de Óxido de Zinco (50%)**

ZnO.....	50,0g
Agente de dispersão.....	1,5g
Amônia 24%.....	0,2g
Água deionizada.....	48,3g
	-----
	100,0g

Tempo de batimento = 24 horas

Ao término da moagem foram coletadas amostras das dispersões para verificação do tamanho da partícula e para a determinação da porcentagem de ST. As dispersões apresentaram partículas menores que  $5\mu$ , conforme determinação através do microscópio Olympus da Micronal modelo CBA que permitiram a sua utilização nas formulações. Os teores de ST das dispersões foram determinados conforme item 3.1.1. e o resultado apresentado como a média de duas determinações (Tabelas 4 a 6).

Tabela 4 - Determinação do teor de sólidos totais da dispersão de enxofre.

Amostra	$m_s$ (g)	$m_{SS}$ (g)	ST (%)	ST médio (%)
01	2,005	1,016	50,673	50,63
02	2,026	1,025	50,592	

Tabela 5 - Determinação do teor de sólidos totais da dispersão de ZDEC.

Amostra	m <sub>ZDEC</sub> (g)	m <sub>ZDECS</sub> (g)	ST (%)	ST médio (%)
01	1,963	0,975	49,668	49,67
02	1,864	0,926	49,678	

Tabela 6 - Determinação do teor de sólidos totais da dispersão de ZnO.

Amostra	m <sub>ZnO</sub> (g)	m <sub>ZnOS</sub> (g)	ST (%)	ST médio (%)
01	1,863	0,930	49,919	49,84
02	1,975	0,983	49,772	

Os teores de ST das dispersões de enxofre, ZDEC e ZnO de 50,63%, 49,67% e 49,84%, respectivamente, foram utilizados na formulação do LBN.

### 3.2.1.3 - Formulação

A formulação do LBN é normalmente baseada no peso seco dos ingredientes a serem adicionados. A matéria prima básica é o polímero, que entra em 100 partes por peso seco (Ps), ou seja, 100 phr e os demais produtos variam em função dessas 100 partes. Na prática os compostos foram adicionados ao LBN baseados em seus respectivos pesos úmidos (Pu) e calculados conforme a equação 30.

$$Pu = 100Ps / ST \quad (30)$$

O LBN foi formulado baseado em uma formulação clássica de balão infantil<sup>1</sup> com ligeiras modificações (Tabela 7).

Tabela 7 - Formulação do LBN na vulcanização pelo processo convencional

Matéria Prima	Peso seco (phr)	Concentração (%)	Peso úmido (g)
LBN	100,0	60,17 <sup>a</sup>	166,20
Solução de KOH a 10%	0,2	10,08 <sup>b</sup>	1,99
Dispersão de ZnO a 50%	0,3	49,84 <sup>b</sup>	0,60
Dispersão de ZDEC a 50%	0,6	49,67 <sup>b</sup>	1,21
Dispersão de enxofre a 50%	0,8	50,63 <sup>b</sup>	1,58

<sup>a</sup> Valor obtido pelo ensaio de borracha seca

<sup>b</sup> Valor obtido pelo ensaio de sólidos totais

As modificações foram a ausência da solução de Emulvin N a 20%, a ausência de pigmento e a adição da solução de KOH a 10,08%. Esse procedimento foi adotado afim de padronizar os dois processos de vulcanização.

A solução de KOH foi adicionada ao LBN no pré-vulcanizador que permaneceu sob agitação lenta por 15 minutos para completa homogeneização. Em seguida foram acrescentadas as dispersões e iniciou-se o processo de vulcanização por calor. A agitação foi mantida constante durante todo o processo que durou por volta de 3 horas a 70°C. O nível de pré-vulcanização foi verificado pelo teste de coagulação com clorofórmio de grau comercial que consiste em misturar partes iguais de LBN pré-vulcanizado e clorofórmio, e agitar com um bastão de vidro até coagulação completa. A coagulação ocorre em poucos minutos e visualmente os coágulos são classificados quanto à pré-vulcanização, segundo seu aspecto, sendo adotado 4 números para essa classificação onde o n° 1 é considerado o estágio inicial e o n°4 considerado o estágio mais avançado<sup>19</sup>. Esse teste foi adotado no experimento, no estágio mais avançado, para definir o ponto final de pré-vulcanização. Após esse processo o látex pré-vulcanizado foi resfriado e ajustado para 50% de ST com uma solução de hidróxido de amônio a 0,1%.

### **3.2.2 - Processo Alternativo**

Neste processo todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, exceto o An-B, que foi de grau comercial. A água utilizada foi deionizada.

#### **3.2.2.1 - Formulação**

Foram preparadas 2 séries de amostras. A primeira série consiste de amostras de LBN apenas diluída a 50% de ST com uma solução de hidróxido de amônio a 0,1%. A segunda série foi formulada com radiosensibilizador como mostra a



Tabela 8 e os Pu dos compostos foram calculados da mesma forma que no processo convencional, exceto o An-B que foi adicionado diretamente ao LBN<sup>11</sup>. A solução de KOH a 10,08% utilizada nesta formulação foi a mesma utilizada no processo convencional.

Tabela 8 - Formulação do LBN na Vulcanização pelo Processo Alternativo

Matéria Prima	Peso seco (phr)	Concentração (%)	Peso úmido (g)
LBN	100	60,17 <sup>a</sup>	166,20
Solução de KOH a 10%	0,2	10,08 <sup>b</sup>	1,99
An-B	4,0	100 <sup>c</sup>	4,0

<sup>a</sup> Valor obtido pelo ensaio de borracha seca, <sup>b</sup> Valor obtido pelo ensaio de sólidos totais, <sup>c</sup> Valor teórico.

A solução de KOH foi adicionada ao LBN que permaneceu sob agitação lenta por 15 minutos para completa homogeneização. O KOH foi utilizado como estabilizador para impedir a desestabilização do LBN pela adição do An-B<sup>36</sup>. Em seguida foi acrescentado lentamente o An-B e mantido sob agitação lenta por 1 hora utilizando-se o agitador magnético da Fisaton modelo 701. Após esse processo as amostras foram diluídas para aproximadamente 50% de ST com uma solução de hidróxido de amônio a 0,1%.

### 3.2.2.2 - Irradiação

A vulcanização do látex foi induzida com raios gama provenientes de uma fonte de <sup>60</sup>Co, tipo panorâmica da Yoshizawa Kiko Co Ltd. As amostras foram acondicionadas em frascos de polietileno com capacidade para 250mL e com tampa rosqueável onde permaneceram em repouso por 16 horas antes de serem irradiadas<sup>11,54</sup>. A taxa de dose aplicada foi de 0,9kGy/h. O intervalo de dose para a primeira série de amostras sem radiosensibilizador foi de 0 a 440kGy e para a segunda série, com radiosensibilizador, foi de 0 a 35kGy. As irradiações foram realizadas à temperatura ambiente e na presença de ar. Nenhum efeito sobre a utilização de diferentes taxas de dose tem sido observado para intervalos de 0,1 a

10,0kGy/h<sup>6</sup>. Quanto à irradiação ser realizada na presença de ar, nenhum efeito de inibição da reação de vulcanização tem sido observado, provavelmente devido à limitada difusão do oxigênio nas partículas de borracha natural<sup>6</sup>. Em relação à temperatura de irradiação, testes realizados a 60°C resultaram no abaixamento da RT e portanto não existe razão para realizar o processo com temperaturas maiores<sup>6</sup>. Após a irradiação as amostras de LBN permaneceram em repouso por 24 horas antes da preparação de seus respectivos filmes<sup>11,54</sup>.

### 3.3 - PREPARAÇÃO DOS FILMES

Nesta etapa, foram preparados filmes das amostras das duas séries de LBN irradiado, com e sem radiosensibilizador, com o objetivo de se determinar as DV correspondentes, através de ensaios de RT na ruptura. Além destes, foram preparados também filmes representativos dos processos de vulcanização, bem como um filme de LBN não vulcanizado, para serem utilizados nos ensaios biológicos. O filme de LBN não vulcanizado também foi usado para a caracterização do LBN através da análise por ativação com nêutrons, enquanto que, o filme de LBN vulcanizado com enxofre também foi usado para a avaliação de sua propriedade mecânica, através do ensaio de RT na ruptura.

A preparação dos filmes foi realizada filtrando-se as amostras de LBN e derramado-as em recipientes de vidro de 170 x 200 x 2mm, os quais foram colocados sobre uma superfície nivelada para manter a uniformidade da espessura. A gelificação ocorreu de maneira uniforme, com a mesma forma do recipiente, porém com o volume contraído. Em seguida, os filmes foram lixiviados com água deionizada em um banho termostático da Quimis a 70°C por 15 minutos e submetidos à secagem em estufa da Fanem com circulação de ar, a 70°C por uma hora e meia<sup>36,54,55</sup>.

Um esquema de obtenção dos filmes de LBN não vulcanizado, vulcanizado pelo processo convencional na presença de enxofre e pelo processo alternativo induzido com raios gama na presença e na ausência de radiosensibilizador, conforme Figura 1, foi elaborado com o objetivo de visualizar as diferenças entre os processos de vulcanização e as etapas padronizadas da obtenção dos filmes utilizados nos ensaios biológicos.

### **3.4 - ENSAIOS**

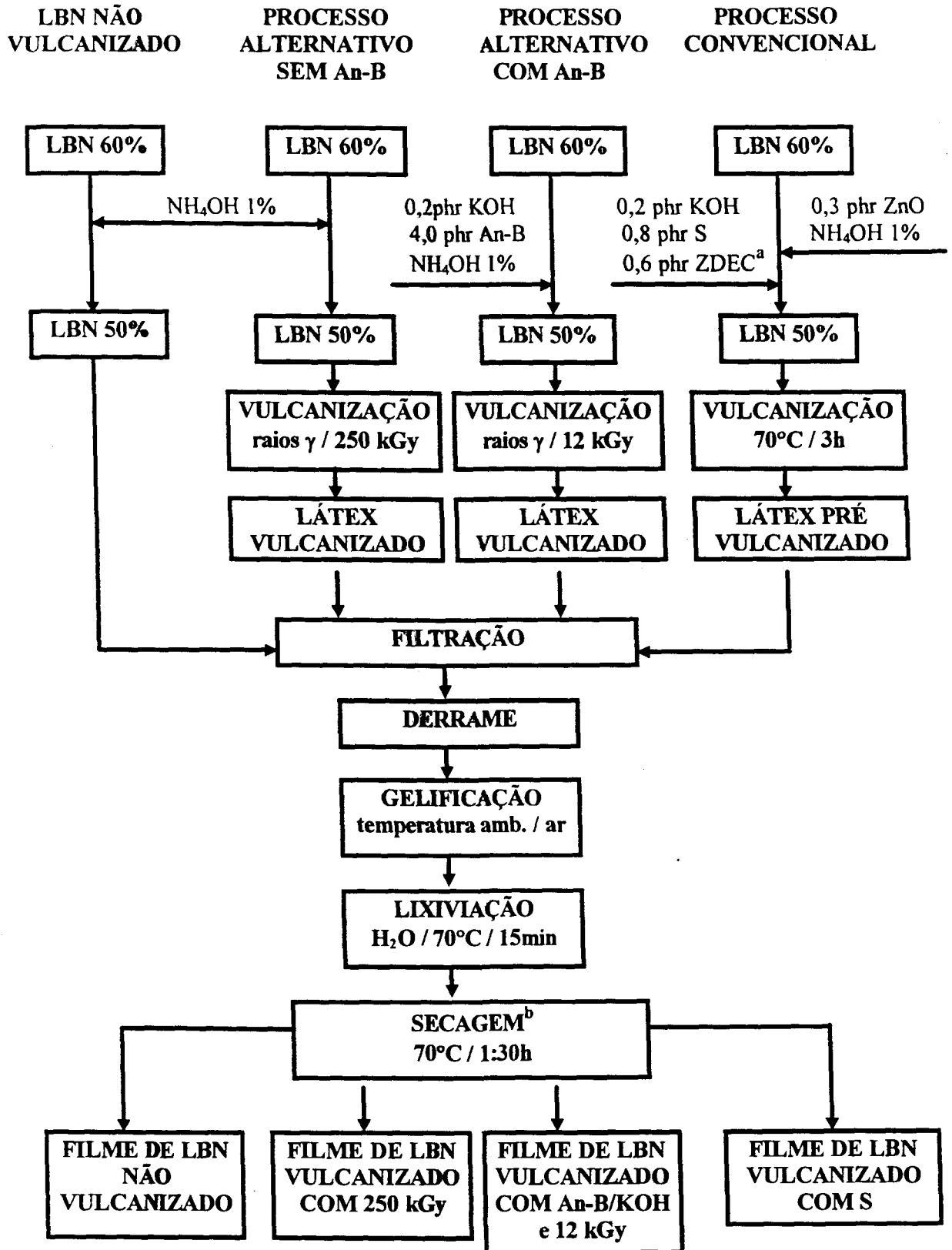
Esta etapa compreende a metodologia aplicada para a realização do teste mecânico de RT na ruptura dos filmes de LBN irradiado na presença e na ausência de radiosensibilizador, não vulcanizado e vulcanizado com enxofre, além dos testes *in vitro* e *in vivo* realizados com os filmes de LBN não vulcanizado e vulcanizados pelos processos convencional e alternativo.

#### **3.4.1 - Resistência à Tração na Ruptura**

O ensaio foi realizado, conforme a norma ASTM D412/92<sup>56</sup>. Utilizou-se um dinamômetro Instron série IX Automated Materials Testing System v4.05a, para a série de LBN vulcanizada sem radiosensibilizador, e uma máquina universal de ensaios da EMIC modelo MEM 2000 para a série de LBN vulcanizada com radiosensibilizador e vulcanizada com enxofre. O ensaio foi realizado a 23°C e 50% de umidade com uma velocidade de afastamento de garras de 500 mm/min.

##### **3.4.1.1 - Preparação dos Corpos de Prova**

Foram cortados 05 corpos de prova de cada filme de LBN vulcanizado com raios gama, com uma faca da Parabor modelo C com largura do cunho de 6,28mm.



<sup>a</sup> Dietilditiocarbamato de zinco    <sup>b</sup> No processo convencional ocorre secagem e vulcanização

Figura 1 - Esquema de obtenção dos filmes de látex de borracha natural.

A espessura foi calculada como a média de três determinações efetuadas na região central e extremas da porção paralela central do corpo de prova. Utilizou-se um micrômetro vertical graduado em 0,001mm da Mitutoyo para medição das espessuras e os corpos de prova que apresentaram diferença entre as três medidas de espessura, superior ao limite máximo de variação de 0,08mm, foram descartados.

### 3.4.1.2 - Procedimento Experimental

Os corpos de prova foram submetidos à uma força de tração até a ruptura. Os valores da RT na ruptura, em MPa, foram calculados conforme a equação 31, onde F é a força aplicada para romper o corpo de prova em kgf, E é a espessura do corpo de prova em mm e L é a largura do corpo de prova na região de ensaio, que é a mesma que a do cunho da faca modelo C (6,28mm). O resultado da RT para cada filme de LBN foi expresso como a média de três determinações.

$$RT = 9,807 F / E L \quad (31)$$

### 3.4.2 - Citotoxicidade

O ensaio foi realizado conforme ISO 10993-5/92<sup>51</sup>, em condições assépticas em uma capela de fluxo laminar Trox modelo FLV. Foram utilizadas células de ovário de hamster chinês K-1 da American Type Culture Collection (CHO), cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 e soro fetal bovino (FCS) da Cultilab Materiais para Cultura de Células Ltda. A penicilina - estreptomicina e tripsina, utilizadas no cultivo, foram da Sigma Chemical Co. Os demais reagentes foram de grau analítico e a água utilizada foi destilada.

### 3.4.2.1 - Preparação dos Extratos

Para realizar a extração dos componentes de cada filme, usou-se 0,2g de material de teste/mL de meio de cultura constituído por RPMI 1640 com 10% de soro fetal bovino (RPMI+FCS) e 100 µg/mL de penicilina-estreptomicina. Os quatro filmes de LBN foram pesados e cortados em tiras de 30 x 1 x 1mm e colocados em frascos de vidro esterilizados e autoclavados a 121°C durante 20 minutos em uma autoclave Phoenix. Após a esterilização foi adicionado o meio de cultura aos frascos com o material de teste e estes colocados em uma estufa da Fanen a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  por 72 horas para extração. O extrato foi diluído com meio de cultura RPMI+FCS e o material de teste foi descartado. Utilizou-se a solução de fenol a 2%, como controle positivo e polietileno de alta densidade como controle negativo do teste de citotoxicidade.

### 3.4.2.2 - Cultura Celular

As células CHO foram cultivadas em frascos contendo meio RPMI+FCS e em estufa da Forma Scientific modelo 3159, a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ , em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  e 95% de ar umidificado. Após a reprodução celular, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com uma solução tampão de fosfato, livre de íons cálcio e magnésio. Em seguida as células foram tratadas com uma solução de tripsina a 0,25% para seu descolamento dos frascos e transferidas para uma centrífuga da Fanen modelo 204NR de 1000rpm onde, após 5 minutos de centrifugação, foram lavadas com a solução tampão. As células foram ressuspensas em meio RPMI+FCS e ajustadas para uma concentração de 100 células/mL. Foram colocados 2mL da suspensão de células em placas para cultura de 60mm de diâmetro e incubada por 4 horas para adesão nas placas. O meio foi então removido das placas e substituído por 5mL de meio de cultura fresco, como controle, ou 5mL de extrato do material de teste diluído. Cada concentração de extrato foi testada em triplicata. As células foram incubadas em estufa a  $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  e 95% de ar

umidificado por 7 dias para a formação das colônias. Após esse período, o extrato foi removido das placas e as colônias formadas foram fixadas com uma solução de formol a 10% e coloridas com Giemsa. O excesso de corante foi retirado com água e as placas colocadas para secar. O número de colônias visíveis na placa foi contado. O Índice de Citotoxicidade (IC50% - concentração de extrato que inibe a formação de 50% das colônias em relação ao controle) foi estimado, ajustando modelos matemáticos às curvas construídas a partir da porcentagem de colônias formadas em relação ao controle, versus a concentração do extrato expressa em porcentagem.

### **3.4.3 - Toxicidade Sistêmica**

O ensaio de toxicidade sistêmica em camundongos foi baseado nas normas ISO 10993-11/93<sup>52</sup>, USP 23-NF18/95<sup>57</sup> e ASTM F619/91<sup>58</sup>. O animal utilizado foi o camundongo da raça Balb/c do sexo masculino, pesando entre 17 a 23 gramas e reproduzido no Biotério do IPEN. Utilizou-se ração da marca Nuvital e água potável na alimentação dos animais. Os meios extratores foram preparados com reagentes de grau analítico e água destilada.

#### **3.4.3.1 - Preparação dos Extratos**

Os extratos foram preparados usando, para cada filme, 0,5g de material de teste/mL de meio extrator. Assim, os 4 filmes de LBN foram pesados e cortados, individualmente, em tiras de 30 x 1 x 1mm e colocados em frascos de vidro esterilizados e autoclavados a 121°C durante 20 minutos em autoclave vertical da Phoenix. Após a esterilização, os meios extratores foram adicionados aos tubos de vidro com o material de teste e estes colocados em uma estufa da Fanen a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  por 72 horas para extração. Foram utilizados 4 meios extratores: solução 0,9 g/L de NaCl ou salina (SS), solução etanol:salina (SES) 1:20 v/v, polietileno glicol 400 (PEG) da Oxiteno e óleo vegetal de milho, (OM). Então, foram preparados 4

extratos para cada filme, sendo cada extrato acompanhado de um controle constituído somente pelo meio extrator. O PEG do controle e do extrato foram diluídos com SS na proporção de 1g de PEG em 4mL de solução para fornecer 250mg de PEG/mL.

### 3.4.3.2 - Procedimento Experimental

Os animais foram aleatoriamente distribuídos em grupos de cinco unidades. Cada animal foi identificado através da marcação na cauda e submetido a pesagem. Os animais foram aclimatados a  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  e receberam ração e água *aa libitum*. Os extratos foram administrados por via intraperitoneal na dose de 20 mL/kg conforme preconizado na Farmacopéia Americana<sup>57</sup> e na norma ISO 10993-11/93<sup>52</sup> com ligeiras modificações. As modificações introduzidas, em relação às normas, foram a utilização da via de administração intraperitoneal para todos os tratamentos, a redução do volume de administração para 20 mL/Kg e a dose do PEG para 5 g/kg.

A cavidade peritoneal apresenta rica vascularização, permitindo uma absorção rápida do extrato, e em pesquisas laboratoriais, a via intraperitoneal é de uso rotineiro, em substituição à via intravenosa<sup>59</sup>. Além de que, a via intravenosa presta-se principalmente, à obtenção de concentrações sanguíneas elevadas e efeitos imediatos, exigindo muito mais cuidado com efeitos adversos, que a via intraperitoneal. A redução do volume de administração de 50 mL/kg para 20 mL/kg<sup>58</sup> foi realizada como medida preventiva de efeitos adversos causados por excesso de volume de líquido nos camundongos. O valor do PEG foi reduzido em relação ao recomendado pela norma devido à dose de 10 g/kg ter promovido sedação nos animais de controle nas primeiras 4 horas após os tratamentos, o que pode ser explicado devido ao valor muito próximo da dose letal (DL<sub>50</sub>) de 14,5 g/kg<sup>60</sup>. Os animais foram observados quanto a sinais e sintomas apresentados, imediatamente após os tratamentos até a 4<sup>a</sup> hora, e a intervalos de 24 horas até 72 horas. Foram confrontados o comportamento dos animais inoculados com o material



de teste com os dos animais de controle, ou seja, inoculados somente com o meio extrator. Ao final das 72 horas todos os animais foram pesados e o experimento encerrado.

## Capítulo 4

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados experimentais serão apresentados e discutidos inicialmente quanto a seleção e caracterização do LBN. A seguir, será discutido o efeito da dose na propriedade de RT dos filmes de LBN vulcanizado pelo processo alternativo, e conseqüentemente, a obtenção da DV correspondente, além de avaliar os valores de RT dos filmes representativos de ambos os processos, convencional e alternativo, e compará-los com especificações. Finalizando, serão discutidos os efeitos toxicológicos apresentados pelos 4 filmes de LBN: filme não vulcanizado, vulcanizado com enxofre, vulcanizado com raios gama e vulcanizado com raios gama e An-B.

#### 4.1 - SELEÇÃO DO LÁTEX DE BORRACHA NATURAL

O LBN em estudo, foi centrifugado uma única vez, como ocorre normalmente com os LBN comercializados, e classificado como HA. As Tabelas 9 e 10, mostram a classificação do LBN centrifugado, segundo as normas ABNT EB226/89<sup>53</sup> e ISO 2004/88<sup>61</sup>.

A seleção do LBN para a vulcanização pelo processo alternativo, foi baseada em estudos sobre sua vulcanização com radiação ionizante<sup>62</sup>, que sugerem a utilização do tipo HA, por proporcionar uma DV menor e um valor de RT maior. Adotou-se o mesmo tipo de LBN para o processo convencional, pois não foi

encontrado na literatura nenhum estudo indicando um tipo específico de LBN para este processo.

Tabela 9 - Tipos de LBN concentrado por centrifugação conforme ABNT EB226/89<sup>53</sup>.

<b>Tipos</b>	<b>Descrição</b>
A1	Látex concentrado por centrifugação, preservado somente com alto teor de amônia, ou com alto teor de amônia e outros agentes de preservação.
A2	Látex concentrado por centrifugação, preservado com baixo teor de amônia e com outros agentes de preservação.

Tabela 10 - Tipos de LBN concentrado por centrifugação conforme ISO 2004/88<sup>61</sup>.

<b>Tipos</b>	<b>Descrição</b>
HA	Látex concentrado por centrifugação preservado com amônia, e com uma alcalinidade superior a 0,60% (m/m) sobre o LBN.
LA	Látex concentrado por centrifugação preservado com amônia e com outros agentes de preservação, e com uma alcalinidade inferior a 0,29% (m/m) sobre o LBN.
XA	Látex concentrado por centrifugação preservado com amônia e com outros agentes de preservação, e com uma alcalinidade superior a 0,30% (m/m) sobre o LBN.

Pesquisa realizada sobre os efeitos de substâncias não borracha do LBN na vulcanização induzida com radiação, sugere que parte dessas substâncias solúveis em meio aquoso, que atuam como inibidores da vulcanização, são removidas na primeira centrifugação, melhorando assim a eficiência da radiação. Consecutivas centrifugações, ao contrário, abaixam os valores máximos de RT<sup>63</sup>. Assim o LBN selecionado, centrifugado uma única vez, também favorece a vulcanização induzida com radiação ionizante.

Outros estudos, como por exemplo sobre o LA-TZ, que é um LBN com baixo teor de amônia e preservado com dissulfeto de tetrametilurã (TMTD) e ZnO, necessita, geralmente, de uma DV maior que a do LBN com alto teor de amônia, pois o TMTD atua como um capturador de radicais, diminuindo, conseqüentemente, as ligações cruzadas entre as macromoléculas poliméricas da borracha<sup>6</sup>. Portanto a escolha do LBN preservado com alto teor de amônia foi feita por atender tanto aos requisitos da vulcanização induzida com radiação ionizante como os da realizada na presença de enxofre e calor.

O LBN é natural, e por isso, tanto a sua composição como o seu comportamento, físico, químico e mecânico, são complexos. Muitos parâmetros que influenciam o crescimento da árvore, processos de preservação e centrifugação, também afetam a qualidade do LBN, que por sua vez também influenciam as características e qualidades do produto final. Por isso o LBN comercial foi submetido a ensaios físicos e químicos cujos resultados, apresentados como a média de duas determinações, são apresentados nas Tabelas 11 a 19.

Foram determinados no LBN os valores de 61,57% de ST (Tabela 11) e 60,17% de BS (Tabela 12). Esses valores são importantes para a determinação da quantidade de produtos químicos a serem adicionados ao LBN para sua vulcanização. Além disso, são pré requisitos para a realização de outros ensaios. O conteúdo de SNB foi de 1,40%.

Tabela 11 - Determinação do teor de sólidos totais do LBN.

Amostra	m <sub>LBN</sub> (g)	m <sub>LS</sub> (g)	ST (%)	ST médio (%)
01	2,013	1,238	61,500	61,57
02	2,015	1,242	61,637	

Tabela 12 - Determinação do teor de borracha seca do LBN.

Amostra	$m_{LBN}$ (g)	$m_{CS}$ (g)	BS (%)	BS média (%)
01	10,091	6,072	60,172	60,17
02	10,007	6,022	60,177	

No LBN foi determinado 0,65% de AT (Tabela 13) e 1,70% de AA na fase aquosa (Tabela 14). Esses valores demonstram adequada preservação e provável inibição da atividade microbiológica.

Tabela 13 - Determinação da alcalinidade total do LBN.

Amostra	$m_{LBN}$ (g)	$V_{HCl}$ (mL)	AT (%)	AT média (%)
01	5,015	18,9	0,652	0,65
02	5,049	19,2	0,658	

Tabela 14 - Determinação da alcalinidade em  $NH_3$  do LBN.

Amostra	AA (%)	AA média (%)
01	1,697	1,70
02	1,712	

O  $I_{KOH}$ , foi de 0,68 (Tabela 15). Esse índice é definido como o número de gramas de KOH equivalente aos ácidos presentes como sais de amônia, em uma quantidade de LBN contendo 100g de ST. Esse valor está relacionado com a atividade microbiana, entretanto, ele não distingue os sais de amônia de ácidos não voláteis (ácido oléico, esteárico, polipeptídeos e proteínas), cujos ânions elevam a estabilidade do LBN, dos ácidos voláteis que o desestabilizam.

Tabela 15 - Determinação do índice de KOH do LBN.

Amostra	$m_{LBN}$ (g)	$V_{KOH}$ (mL)	$I_{KOH}$	$I_{KOH}$ médio
01	81,01	11,33	0,67	0,68
02	81,02	11,67	0,69	

O  $I_{AGV}$  determinado foi de 0,03 (Tabela 16), um valor que assegura boas condições de preservação do LBN. Os ânions de ácidos graxos voláteis (ácido acético, ácido fórmico e ácido propiônico) são formados pela ação de microorganismos sobre certos carboidratos presentes no soro, e seus valores, fornecem uma medida da extensão da atividade microbiana que está ocorrendo no LBN, desde a sua extração da árvore<sup>18</sup>. Por isso, quanto menor forem seus valores, maior é a estabilidade do LBN quanto à degradação microbiológica.

Tabela 16 - Determinação do índice de ácidos graxos voláteis do LBN.

Amostra	$m_{LBN}$ (g)	$V_{KOH}$ (mL)	$I_{AGV}$	$I_{AGV}$ médio
01	50,037	1,9	0,029	0,03
02	50,051	2,1	0,032	

O conteúdo de coágulo de 0,005% (Tabela 17), indica baixa concentração de fragmentos do polímero, nata ou substâncias estranhas ao LBN de partículas superiores a 180 $\mu$ . Assim esse valor indica um bom grau de estabilidade quanto à coacervação do polímero.

Tabela 17 - Determinação do teor de coágulo do LBN.

Amostra	$m_{LBN}$ (g)	$m_{CS}$ (g)	C (%)	C médio (%)
01	200,07	0,008	0,004	0,005
02	200,05	0,012	0,006	

O valor da EM foi de 670 segundos (Tabela 18). Esse valor corresponde à medida de resistência do LBN quanto as influências mecânicas que tendem a desestabilizá-lo através do aumento do número de colisões das partículas. Portanto valores mais elevados são desejados.

Tabela 18 - Determinação da estabilidade mecânica do LBN.

Amostra	EM (s)	EM média (s)
01	668	670
02	672	

Quanto à viscosidade do LBN, o valor determinado foi de 107 cP (Tabela 19). Esse valor é importante para o controle da espessura do filme de LBN.

Tabela 19 - Determinação da viscosidade do LBN.

Amostra	Leitura (escala 100)	Viscosidade (cP)	Viscosidade média (cP)
01	53	106	107
02	54	108	

Os resultados das características do LBN concentrado por centrifugação e preservado com amônia foram comparados com a especificação brasileira de LBN concentrado ABNT EB226/89<sup>53</sup> e a especificação internacional ISO 2004/88<sup>61</sup> (Tabela 20).

Quanto aos teores de Cu e Mn, apenas o Mn foi detectado e o valor foi de 277ppb, muito inferior ao limite máximo de 8ppm. Por outro lado, alguns pesquisadores<sup>6</sup>, sugerem um limite máximo de 10ppm de Mg, porque atribuem a este íon os efeitos de abaixamento da RT. Por isso, neste estudo foi determinado o conteúdo de 63ppm de Mg, que pode justificar o valor de 670s da EM, que é ligeiramente superior ao limite mínimo de 540s, especificado pelas normas. Assim, pode-se prever que os valores de RT dos filmes deste LBN não serão muito elevados.

Tabela 20 - Características do LBN comercial.

Ensaio	Unidades	Resultados	A.B.N.T EB 226/89 <sup>53</sup>	ISO 2004/88 <sup>61</sup>
Sólidos Totais	%	61,57	mín. 61,5	mín. 61,5
Borracha Seca	%	60,17	mín. 60,0	mín. 60,0
Sólidos Não Borracha	%	1,4	máx. 2,0	máx. 2,0
Borra	%	nr <sup>a</sup>	máx. 0,1	máx. 0,1
Coágulo	%	0,005	máx. 0,05	máx. 0,05
Viscosidade	cP	107	60-180	-
Estabilidade Mecânica	s	670	540-1800	mín. 650
Alcalinidade Total	%	0,65	-	mín 0,60
Alcalinidade em NH <sub>3</sub>	%	1,70	≥ 1,6	-
Índice de KOH	-	0,68	máx. 0,80	máx. 1,0
Índice de Ácidos Graxos Voláteis	-	0,030	máx. 0,20	máx 0,20
Cu	ppm	nd <sup>b</sup>	máx. 8	máx. 8
Mn	ppm	(277)10 <sup>-3</sup>	máx. 8	máx. 8
Cor	-	branco	não pronunciada azul ou cinza	não pronunciada azul ou cinza
Odor	-	não putrefato	não putrefato	não putrefato

<sup>a</sup> não realizado, <sup>b</sup> não detectado à nível de ppm.



Os valores de borra, não foram determinados porque são, normalmente, parâmetros de controle do produtor, e não são fornecidos no laudo de análise da matéria prima.

Nenhum dos resultados obtidos pela caracterização do LBN ultrapassaram os limites estabelecidos pelas normas ABNT EB226/89<sup>53</sup> e ISO 2004/88<sup>61</sup>. Essas normas especificam os limites aceitáveis para os ensaios físicos e químicos do LBN que asseguram, a qualidade da matéria prima, assim o LBN foi considerado adequado para utilização neste estudo.

## **4.2 - RESISTÊNCIA À TRAÇÃO**

### **4.2.1 - Látex de Borracha Natural Vulcanizado Sem Radiossensibilizador**

A Figura 2, obtida da Tabela 21, mostra a curva ajustada, segundo um modelo de regressão polinomial do segundo grau<sup>64</sup> (Apêndice), da RT de filmes de LBN vulcanizado sem radiossensibilizador, em intervalos de dose de 0 a 440kGy, onde cada ponto do gráfico corresponde à média de 3 determinações experimentais.

Para este LBN, vulcanizado sem radiossensibilizador, estimou-se conforme modelo de regressão polinomial do 2º grau, o valor da DV em 233kGy, e o valor máximo da RT em 17,81MPa (Apêndice). Entretanto, utilizou-se neste estudo a DV de 250kGy por motivos de facilidade operacional, uma vez que, esse valor encontra-se no intervalo de confiança de 95% da curva ajustada e não produz diferenças significantes no valor da RT máxima.

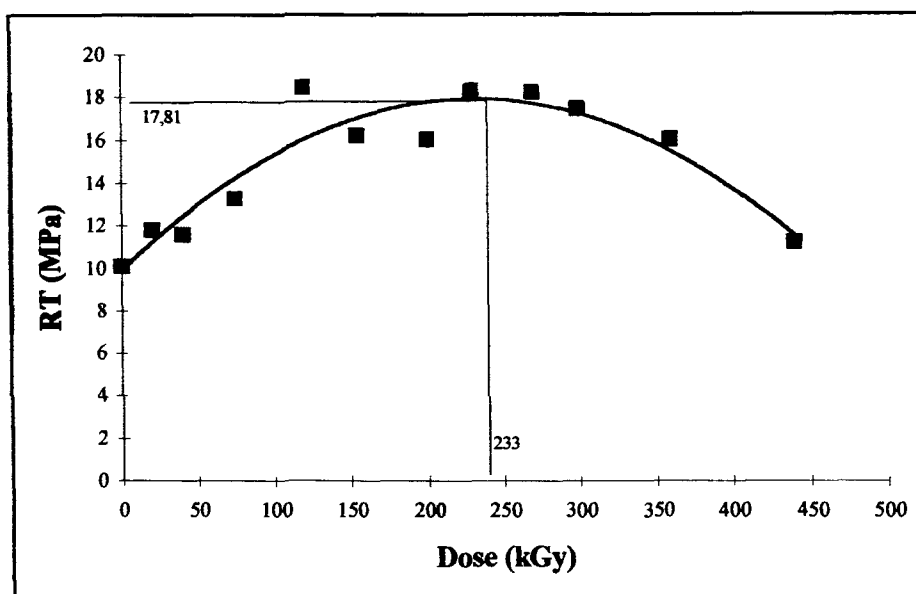


Figura 2 - Efeito da dose na resistência à tração de filmes de LBN vulcanizado com raios gama na ausência de radiosensibilizador.

Tabela 21 - Valores experimentais da resistência à tração de filmes de LBN vulcanizado com raios gama na ausência de radiosensibilizador.

Dose (kGy)	Resistência à Tração (MPa)			
	Corpo de prova			Média
	1	2	3	
0	10,22	9,71	10,31	10,08
20	11,96	11,58	11,85	11,80
40	9,65	12,51	12,55	11,57
75	13,90	12,93	12,98	13,27
120	17,49	19,16	18,75	18,47
155	18,78	13,69	16,24	16,24
200	16,66	15,16	16,30	16,04
230	16,95	19,05	18,84	18,28
270	16,59	19,06	19,08	18,24
300	17,42	17,05	17,92	17,43
360	16,47	16,20	15,44	16,04
440	12,45	10,59	10,65	11,23

Nesse processo de vulcanização, sem radiosensibilizador, a vulcanização desenvolvida, ocorre através da formação de macrorradicais poliméricos que reagem entre si, promovendo a reticulação direta entre os átomos de carbono, e a formação de radicais provenientes da radiólise da água, que participam de forma indireta na reticulação das macromoléculas poliméricas<sup>27,30</sup>.

#### 4.2.2 - Látex de Borracha Natural Vulcanizado Com Radiosensibilizador

A Figura 3, obtida da Tabela 22, mostra a curva ajustada, segundo modelo de regressão segmentada<sup>64</sup> (Apêndice), da RT de filmes de LBN vulcanizado com radiosensibilizador (An-B/KOH), em intervalos de dose de 0 a 35 kGy, onde cada ponto do gráfico corresponde à média de 3 determinações.

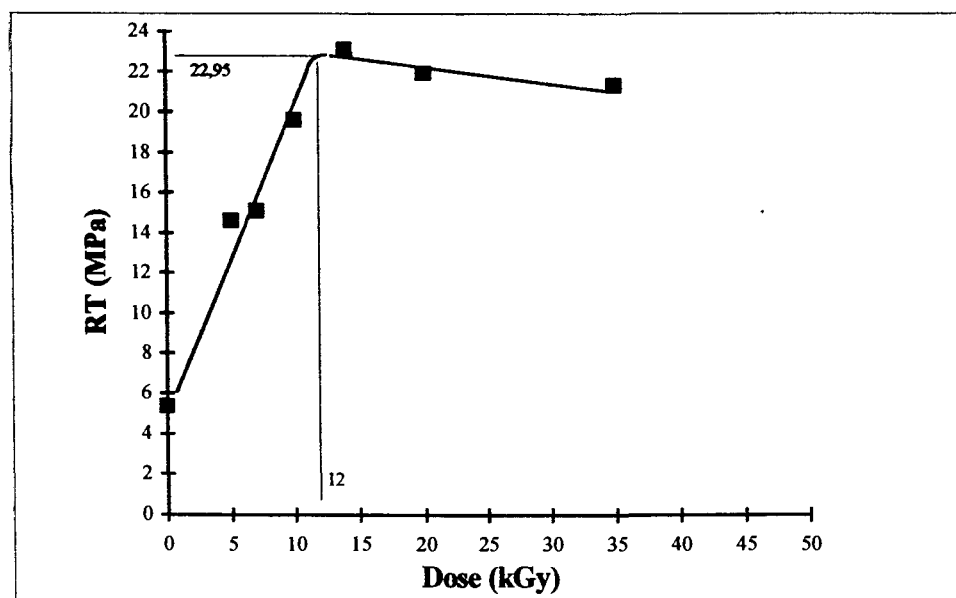


Figura 3 - Efeito da dose na resistência à tração de filmes de LBN vulcanizado com raios gama na presença do radiosensibilizador.

Para o LBN com radiosensibilizador (An-B/KOH), segundo modelo de regressão segmentada, estimou-se a DV em 12kGy, e o valor máximo da RT foi de

22,95MPa (Apêndice). Assim, o uso do An-B como radiosensibilizador, abaixou cerca de 20 vezes o valor da DV, devido, ao seu alto valor de  $G_{\text{radical}}$ , que promoveu um aumento na velocidade reticulação.

Tabela 22 - Valores experimentais da resistência à tração de filmes de LBN vulcanizado com raios gama na presença de radiosensibilizador.

Dose (kGy)	Resistência à Tração (MPa)			
	Corpo de prova			Média
	1	2	3	
0	5,38	5,49	5,20	5,36
5	14,92	14,41	14,47	14,60
7	14,91	15,36	15,00	15,09
10	18,51	20,96	19,28	19,58
14	22,52	23,01	23,80	23,11
20	22,23	22,04	21,52	21,93
35	20,39	21,32	22,22	21,31

Neste processo de vulcanização do LBN, com o radiosensibilizador An-B, os radicais acrílicos reagem com o radical polimérico através do processo de enxertia<sup>38,39</sup>. Desta forma, a evolução da seqüência acrílica enxertada no radical polimérico é interrompida quando encontra um outro radical polimérico. Assim, a reticulação ocorre durante a irradiação, através de uma ponte acrílica intermolecular<sup>38</sup>. As vantagens deste processo são a viabilidade de reticulação entre radicais distantes e a presença de duplas ligações que servem de sítios ativos para a formação da ponte acrílica, que permitem a formação da estrutura reticulada<sup>38</sup>. Também ocorre a reticulação das moléculas do 1,4 cis poliisopreno como na vulcanização sem radiosensibilizador.

Em ambas as curvas experimentais, os valores da RT dos filmes de LBN (Figuras 2 e 3) aumentaram com o aumento da dose até um valor máximo e depois,

decreceram, devido ao aumento das ligações cruzadas que a partir de um certo grau de reticulação começam a impedir a mobilidade das moléculas<sup>65</sup>.

Valores de RT de filmes de LBN vulcanizado com 250kGy, An-B e 12kGy, e com enxofre, foram comparados com especificações de luvas (Tabela 24). O valor da RT do filme de LBN vulcanizado com enxofre foi determinado como a média de 3 determinações (Tabela 23).

Tabela 23 - Valores experimentais da resistência à tração do filme de LBN vulcanizado com enxofre.

<b>Resistência à Tração (MPa)</b>			
Corpo de prova			Média
1	2	3	
23,36	23,24	23,43	23,34

Tabela 24 - Resistência à tração de filmes de LBN e de especificações de luvas.

<b>Filmes de LBN</b>	<b>RT (MPa)</b>	<b>ASTM D3577/91<sup>66</sup></b> Luvas cirúrgicas Tipo I	<b>ASTM D3577/91<sup>66</sup></b> Luvas cirúrgicas Tipo II	<b>ASTM D3578/95<sup>67</sup></b> Luvas para exame
<b>Vulcanizado com enxofre</b>	23,34	mínimo 24,0MPa	mínimo 17,0MPa	mínimo 14,0MPa
<b>Vulcanizado com 250kGy</b>	17,75	-	-	-
<b>Vulcanizado com 12kGy e An-B/KOH</b>	22,95	-	-	-

Os valores de RT na ruptura de 23,34MPa e 22,95MPa, dos filmes de LBN vulcanizado com enxofre e com An-B/KOH e 12 kGy, respectivamente, são semelhantes e maiores que aquele vulcanizado com 250kGy de 17,75MPa. Essa diferença entre os valores de RT dos filmes vulcanizados com radiação ionizante, também ocorreu em estudos de outros pesquisadores<sup>11,36</sup>.

Os valores de RT dos filmes vulcanizados, por ambos os processos, poderiam ser melhorados, provavelmente, utilizando-se um LBN com maior estabilidade mecânica<sup>6</sup>, com menores teores de Mg<sup>6</sup>, e com um pós-tratamento com calor<sup>55</sup>. Por outro lado, os valores das RT dos filmes vulcanizados com enxofre e vulcanizado com raios gama na presença de radiosensibilizador, comparadas com as especificações de luvas, são satisfatórios para aplicação de alguns artefatos. Assim todos esses filmes são representativos para investigações toxicológicas.

### **4.3 - EFEITOS TOXICOLÓGICOS**

#### **4.3.1 - Citotoxicidade**

A citotoxicidade foi expressa como IC50%, ou seja, índice citotóxico que expressa a porcentagem de extrato dos materiais, que inibe a formação de 50% das colônias de células. As Tabelas 25 e 26 mostram o número de colônias de células CHO formadas quando submetidas ao contato com extratos diluídos de polietileno de alta densidade e solução de fenol a 0,2%, controles negativo e positivo, respectivamente, do teste de citotoxicidade.

Para a cultura celular, foi utilizada a célula de ovário de hamster chinês (CHO) K1, devido a sua linhagem estabelecida ser de uso rotineiro nas pesquisas da Supervisão de Radiobiologia.

Tabela 25 - Valores experimentais do nº de colônias de células CHO formadas quando submetidas ao contato com extrato do polietileno de alta densidade (controle negativo).

Amostra	Concentração do Extrato (%)			
	0,0	60,0	80,0	100,0
01	126	123	126	133
02	117	131	110	131
03	120	114	108	128
<b>Média</b>	121	122	115	131
<b>Formação de colônias em relação ao extrato 0,0<sup>a</sup> (%)</b>	100	101	95	108

<sup>a</sup> Quociente entre o número médio de colônias contadas para cada concentração do extrato e o número médio de colônias contadas para o extrato 0,0.

Tabela 26 - Valores experimentais do nº de colônias de células CHO formadas quando submetidas ao contato com solução de fenol a 0,2% (controle positivo).

Amostra	Concentração do Extrato (%)					
	0,0	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0
01	173	145	82	54	33	0
02	172	152	78	60	23	0
03	181	155	77	56	25	0
<b>Média</b>	175	151	79	57	27	0
<b>Formação de colônias em relação ao extrato 0,0<sup>a</sup> (%)</b>	100	86	45	33	15	0

<sup>a</sup> Quociente entre o número médio de colônias contadas para cada concentração do extrato e o número médio de colônias contadas para o extrato 0,0.

A Figura 4 mostra as curvas ajustadas do controle positivo e negativo do teste de citotoxicidade, segundo um modelo de regressão linear simples<sup>64</sup>.

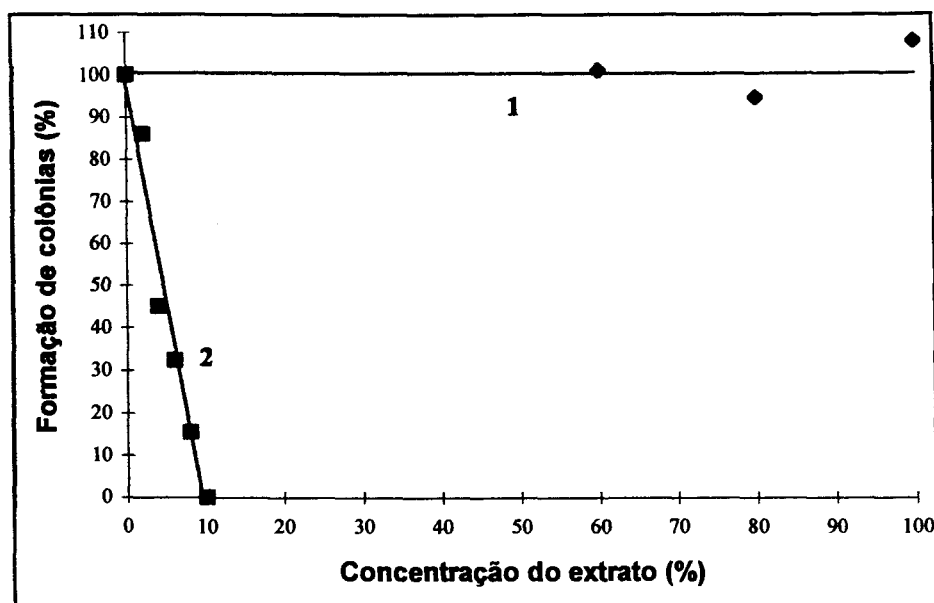


Figura 4 - Curva ajustada da citotoxicidade do polietileno de alta densidade-controle negativo (1) e da solução de fenol a 0,2%-controle positivo, (2).

Para o controle negativo não foi detectado inclinação da reta ajustada (Apêndice), ou seja, o extrato de polietileno de alta densidade não inibiu a formação de colônias, e portanto foi representado por um valor de  $IC_{50\%} > 100$ . Para o controle positivo o  $IC_{50\%}$  foi estimado em 4,66% com um intervalo de confiança de 95% = [3,65 ; 5,68].

As Tabelas 27 a 30, mostram o número de colônias de células CHO formadas quando submetidas ao contato dos extratos diluídos dos 4 filmes de LBN em estudo. Os extratos foram preparados utilizando-se meio de cultura com soro e mantendo-se o material em contato com o meio à 37°C por 72 horas, devido ao requisito da norma quanto às condições de uso do material e do meio extrator.



Tabela 27 - Valores experimentais do nº de colônias de células CHO formadas quando submetidas ao contato com extrato de filme de LBN vulcanizado com enxofre.

Amostra	Concentração do Extrato (%)					
	0,0	2,5	5,0	7,5	10,0	20,0
01	114	107	0	0	0	0
02	122	119	0	0	0	0
03	120	108	0	0	0	0
<b>Média</b>	119	111	0	0	0	0
<b>Formação de colônias em relação ao extrato 0,0<sup>a</sup> (%)</b>	100	94	0	0	0	0

<sup>a</sup> Quociente entre o número médio de colônias contadas para cada concentração do extrato e o número médio de colônias contadas para o extrato 0,0.

Tabela 28 - Valores experimentais do nº de colônias de células CHO formadas quando submetidas ao contato com extrato de filme de LBN vulcanizado com 250kGy.

Amostra	Concentração do Extrato (%)								
	0,0	30,0	40,0	50,0	60,0	70,0	80,0	90,0	100,0
01	103	100	100	81	26	0	0	0	0
02	103	110	100	79	25	0	0	0	0
03	111	105	99	90	32	0	0	0	0
<b>Média</b>	106	105	100	83	28	0	0	0	0
<b>Formação de colônias em relação ao extrato 0,0<sup>a</sup> (%)</b>	100	99	94	78	26	0	0	0	0

<sup>a</sup> Quociente entre o número médio de colônias contadas para cada concentração do extrato e o número médio de colônias contadas para o extrato 0,0.

Tabela 29 - Valores experimentais do nº de colônias de células CHO formadas quando submetidas ao contato com extrato de filme de LBN vulcanizado com An-B e 12kGy.

Amostra	Concentração do Extrato (%)								
	0,0	30,0	40,0	50,0	60,0	70,0	80,0	90,0	100,0
01	119	110	98	83	0	0	0	0	0
02	103	105	96	49	0	0	0	0	0
03	107	112	84	80	0	0	0	0	0
<b>Média</b>	110	109	93	71	0	0	0	0	0
<b>Formação de colônias em relação ao extrato 0,0<sup>a</sup> (%)</b>	100	99	84	64	0	0	0	0	0

<sup>a</sup> Quociente entre o número médio de colônias contadas para cada concentração do extrato e o número médio de colônias contadas para o extrato 0,0.

Tabela 30 - Valores experimentais do nº de colônias de células CHO formadas quando submetidas ao contato com extrato de filme de LBN não vulcanizado.

Amostra	Concentração do Extrato (%)								
	0,0	30,0	40,0	50,0	60,0	70,0	80,0	90,0	100,0
01	100	108	91	45	0	0	0	0	0
02	113	103	85	41	0	0	0	0	0
03	106	101	97	42	0	0	0	0	0
<b>Média</b>	106	104	91	43	0	0	0	0	0
<b>Formação de colônias em relação ao extrato 0,0<sup>a</sup> (%)</b>	100	98	86	40	0	0	0	0	0

<sup>a</sup> Quociente entre o número médio de colônias contadas para cada concentração do extrato e o número médio de colônias contadas para o extrato 0,0.

A citotoxicidade dos extratos dos filmes de LBN é mostrada na curva experimental da Figura 5.

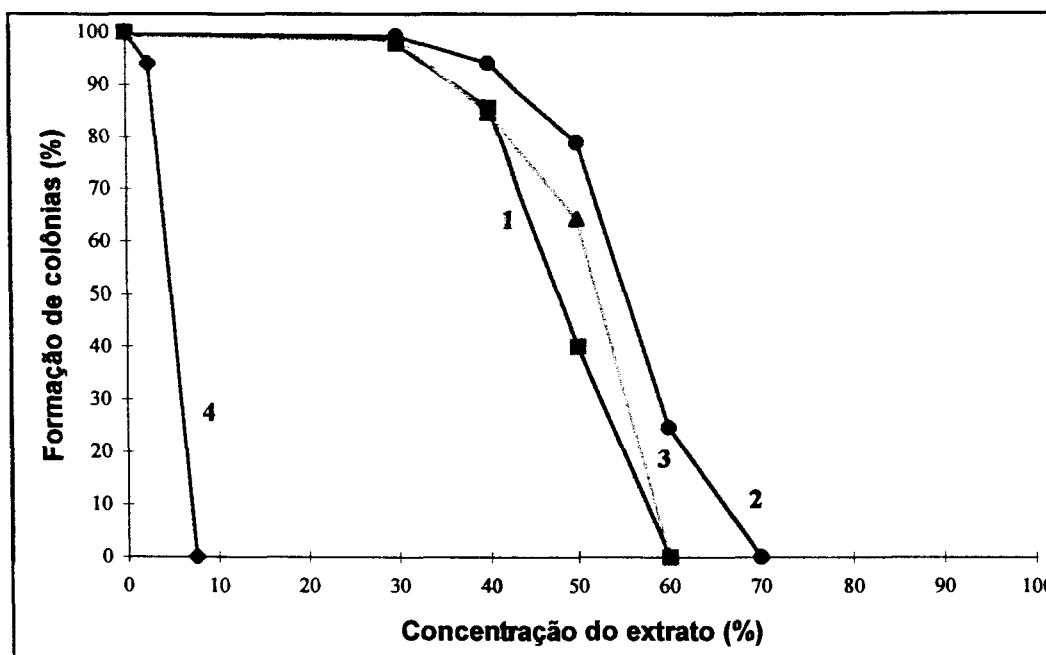


Figura 5 - Citotoxicidade dos filmes de LBN: não vulcanizado (1) vulcanizado com 250 kGy (2), vulcanizado com An-B/KOH e 12 kGy (3) e vulcanizado com enxofre (4).

Para calcular o IC50% dos filmes de LBN, ajustaram-se os modelos de regressão logística<sup>68</sup> para os filmes de LBN vulcanizado com radiação ionizante e não vulcanizado, e o modelo de Gompertz<sup>69</sup> para o filme de LBN vulcanizado com enxofre (Apêndice). Os valores estimados dos IC50% e seus intervalos de confiança a 95% são mostrados na Tabela 31.

Os extratos dos filmes de LBN não vulcanizado e vulcanizado com radiação ionizante, inibiram a formação de 50% das colônias, nas concentrações estimadas de 47,47 a 54,81%. Por outro lado, uma pequena concentração de 2,81% do extrato do filme de LBN vulcanizado com enxofre, foi suficiente para inibir o mesmo número de colônias, equivalendo a um índice de toxicidade de aproximadamente 17 vezes maior.

Tabela 31 - Valores das estimativas e intervalos de confiança dos índices de citotoxicidade (IC50%) dos filmes de LBN

Filme de LBN	Dose kGy	An-B phr	S phr	IC50%	Erro Padrão	Limite Inferior	Limite Superior
1 <sup>a</sup>	-	-	-	47,47	0,60	46,31	48,64
2 <sup>b</sup>	250	-	-	54,81	0,72	53,39	56,23
3 <sup>b</sup>	12	4	-	49,77	1,21	47,40	52,14
4 <sup>c</sup>	-	-	0,8	2,81	-	-	-
<b>Controle positivo<sup>d</sup></b>				4,66	0,52	3,65	5,68
<b>Controle negativo<sup>e</sup></b>				>100	-	-	-

<sup>a</sup> Filme de LBN não vulcanizado <sup>b</sup> Processo alternativo <sup>c</sup> Processo convencional <sup>d</sup> Solução de fenol a 0,2%

<sup>e</sup> Polietileno de alta densidade

O valor estimado da citotoxicidade do filme de LBN vulcanizado com enxofre, IC50% de 2,81, indica que ele é o mais citotóxico dentre os quatro tipos de filmes de LBN avaliados, e esta citotoxicidade foi atribuída ao composto dietilditiocarbamato de zinco usado como acelerador no processo, cujo efeito tóxico já foi relatado por outros pesquisadores<sup>22,70,71</sup>.

O IC50% do filme de LBN não vulcanizado, estimado em 47,47%, demonstra a existência de substâncias tóxicas presentes naturalmente na matéria prima, enquanto que, o processo de vulcanização com radiação ionizante, não apresentou nenhum efeito além da citotoxicidade inicial.

Segundo alguns pesquisadores<sup>6,72</sup>, a citotoxicidade apresentada pelos filmes de LBN irradiados, devido à substâncias tóxicas presentes naturalmente no LBN, poderia ser diminuída por tratamento com solução alcalina. Além disso, o uso da radiação ionizante na vulcanização do LBN poderia promover a desnaturação das proteínas presentes no LBN, levando a uma redução das reações alérgicas à elas atribuídas<sup>6,9</sup>.

Os valores estimados dos IC50% dos filmes de LBN vulcanizado pelo processo alternativo foram comparados com o filme não vulcanizado. Foram determinados os intervalos de confiança para as diferenças de suas IC50% à um nível de significância global<sup>73</sup> de  $\alpha=5\%$  e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 32.

Tabela 32 - Comparação entre os valores de IC50% dos filmes de LBN vulcanizado com radiação ionizante e do filme de LBN não vulcanizado.

Comparação (filmes)	Diferença (IC50%)	Erro Padrão	Limite Inferior	Limite Superior
1 <sup>a</sup> e 2 <sup>b</sup>	7,34	0,94	5,33	9,33
1 <sup>a</sup> e 3 <sup>c</sup>	2,30	1,35	-0,57	5,17
2 <sup>b</sup> e 3 <sup>c</sup>	-5,04	1,41	-8,04	-2,04

<sup>a</sup> Filme de LBN não vulcanizado

<sup>b</sup> Processo alternativo com 250kGy

<sup>c</sup> Processo alternativo com 12kGy e An-B/KOH

Comparando os intervalos de confiança do filme vulcanizado com An-B/KOH e 12kGy, com o filme de LBN não vulcanizado, nenhuma diferença significativa foi observada, porém em relação ao filme de LBN vulcanizado com 250kGy, os intervalos de confiança comprovam que são diferentes.

Analisando os intervalos de confiança da diferença entre o IC50% do filme vulcanizado com 250kGy com o filme de LBN não vulcanizado, e analisando seus respectivos valores de IC50% na Tabela 31, o filme irradiado com 250kGy apresentou uma pequena diminuição da citotoxicidade, sugerindo que, um provável aumento da cisão das moléculas pela radiação, tenha promovido uma maior lixiviação das substâncias citotóxicas presentes no LBN.

Pesquisa realizada por Tsuchiya e colaboradores<sup>7</sup>, com filmes de LBN vulcanizado com radiação ionizante, foram avaliadas toxicologicamente através de testes de citotoxicidade, implante em músculo de coelhos e hemólise. Os autores demonstraram que a citotoxicidade dos filmes de LBN vulcanizados com radiação ionizante são menores que dos filmes vulcanizados com enxofre, e que no teste *in vivo* os filmes vulcanizados com radiação ionizante apresentaram leve reação inflamatória do tecido muscular, mas essa reação foi passageira, e que os filmes utilizados nesse experimento apresentaram atividade hemolítica. Combinando esses resultados, os autores concluíram que os filmes vulcanizados com radiação ionizante são mais seguros para aplicações como biomaterial, que aqueles vulcanizados com enxofre, não sendo entretanto, inertes do ponto de vista toxicológico. Neste atual trabalho, os resultados de citotoxicidade também comprovam menores efeitos tóxicos dos filmes de LBN vulcanizados por irradiação que pelo método convencional com enxofre.

Ikarashi e colaboradores<sup>22</sup>, em estudos comparativos da toxicidade de materiais de LBN vulcanizado com enxofre utilizando testes *in vitro* e *in vivo*, mostraram um coeficiente de correlação de 0,80 entre os resultados da citotoxicidade e o teste de implante em músculo de coelhos. Nesse estudo, a inflamação do tecido foi o índice de avaliação do teste *in vivo*, que apresentou melhor resposta quantitativa para comparação com os resultados do IC50% da inibição da formação de colônias pelos extratos dos materiais. O autor realizou seus estudos com amostras de luvas cirúrgicas e domésticas de LBN vulcanizadas pelo processo convencional, onde determinou quantidades significantes do acelerador de processo do tipo ditiocarbamato. Os ensaios de citotoxicidade realizados com os extratos dos materiais de LBN e com vários aceleradores de processo do tipo ditiocarbamato e mercaptobenzotiazol e antioxidantes permitiram avaliar a forte citotoxicidade promovida pelos aceleradores. Os mercaptobenzotiazóis, no teste de

citotoxicidade, mostram menor toxicidade que os ditiocarbamatos. Esses apresentaram a seguinte ordem decrescente de toxicidade: ZDMC > ZDEC = ZPC > ZEPC > ZDBC. Embora nesses artefatos também sejam utilizados antioxidantes, substâncias utilizadas para promover a proteção do artefato da degradação oxidativa, nesse estudo o autor demonstrou que a toxicidade do material é devido, na maioria, mais aos aceleradores do que aos antioxidantes. Segundo Ikarashi e colaboradores<sup>22</sup> a citotoxicidade determinada pelo método de extração e formação de colônias, teve uma correlação melhor com a resposta do tecido muscular, que o ensaio pelo método de difusão com agar<sup>74</sup> e, aparentemente, aquele ensaio foi mais objetivo, devido a sua descrição quantitativa da toxicidade como IC50% e a facilidade da simples contagem de colônias. Ikarashi juntamente com Nakamura e colaboradores<sup>71</sup> já haviam demonstrado, em estudos anteriores, que a citotoxicidade e a irritabilidade de tecidos, provocada por produtos de LBN, são devido, principalmente, a resíduos de ditiocarbamatos, entretanto não haviam determinado seu grau de correlação dos testes *in vitro* e *in vivo*.

Trabalhos realizados com cateteres urinários de LBN vulcanizado convencionalmente, também demonstram forte toxicidade em cultura de células e em testes *in vivo* desses produtos<sup>47,75</sup>.

#### 4.3.2 - Toxicidade Sistêmica

A toxicidade sistêmica aguda em camundongos, dos 4 tipos de filmes de LBN foi avaliada em termos da mortalidade e do peso corpóreo dos animais testados, juntamente com os sinais e sintomas desenvolvidos durante o período de 72 horas de experimento. As Tabelas 33 a 36 mostram os valores médios  $\pm$  desvio padrão do

peso corpóreo e a mortalidade de 5 camundongos por tratamento, submetidos ao teste de toxicidade sistêmica dos filmes de LBN.

Tabela 33 - Valores médios do peso corpóreo e mortalidade de camundongos submetidos ao teste de toxicidade sistêmica do filme de LBN não vulcanizado.

Meio extrator, Via e Dose	Extrato		Controle			
	Peso Corpóreo <sup>a</sup> (g)		Mortalidade <sup>b</sup>	Peso Corpóreo <sup>a</sup> (g)		Mortalidade <sup>b</sup>
0 <sup>o</sup> Dia	3 <sup>o</sup> Dia	0 <sup>o</sup> Dia		3 <sup>o</sup> Dia		
<b>SS</b> I.P.; 20 mL/kg	20,50±0,39	21,90±0,61	0/5	20,36±0,34	22,13±0,16	0/5
<b>SES</b> I.P.; 20 mL/kg	20,54±0,44	22,09±0,60	0/5	20,44±0,31	22,03±0,61	0/5
<b>PEG-400</b> I.P.; 5 g/kg	20,48±0,64	22,79±1,37	0/5	21,16±0,69	23,77±1,61	0/5
<b>OM</b> I.P.; 20 mL/kg	nr	nr	nr	nr	nr	nr

<sup>a</sup> Média ± desvio padrão de 5 camundongos, <sup>b</sup> n° de mortos/n° de animais testados, nr = não realizado

O teste de toxicidade sistêmica do filme de LBN não vulcanizado não foi realizado com o meio extrator oleoso, devido à solubilidade do material nesse solvente.

Nenhum extrato dos filmes causou a mortalidade dos animais testados durante o período experimental de 72 horas.

Todos os animais, submetidos ao teste, ganharam peso durante o período do experimento.



Tabela 34 - Valores médios do peso corpóreo e mortalidade de camundongos submetidos ao teste de toxicidade sistêmica do filme de LBN vulcanizado com enxofre.

Meio extrator, Via e Dose	Extrato			Controle		
	Peso Corpóreo <sup>a</sup> (g)		Mortalidade <sup>b</sup>	Peso Corpóreo <sup>a</sup> (g)		Mortalidade <sup>b</sup>
0 <sup>o</sup> Dia	3 <sup>o</sup> Dia	0 <sup>o</sup> Dia		3 <sup>o</sup> Dia		
<b>SS</b> I.P.; 20 mL/kg	18,95±0,33	21,91±0,48	0/5	18,81±0,30	21,61±1,60	0/5
<b>SES</b> I.P.; 20 mL/kg	19,18±0,58	21,42±1,34	0/5	19,76±0,23	22,56±0,26	0/5
<b>PEG-400</b> I.P.; 5 g/kg	20,76±0,46	23,10±1,16	0/5	20,66±0,77	23,31±0,77	0/5
<b>OM</b> I.P.; 20 mL/kg	18,94±0,25	20,86±1,04	0/5	18,88±0,23	21,62±0,46	0/5

<sup>a</sup> Média ± desvio padrão de 5 camundongos, <sup>b</sup> n° de mortos/n° de animais testados.

Tabela 35 - Valores médios do peso corpóreo e mortalidade de camundongos submetidos ao teste de toxicidade sistêmica do filme de LBN vulcanizado com 250kGy.

Meio extrator, Via e Dose	Extrato			Controle		
	Peso Corpóreo <sup>a</sup> (g)		Mortalidade <sup>b</sup>	Peso Corpóreo <sup>a</sup> (g)		Mortalidade <sup>b</sup>
0 <sup>o</sup> Dia	3 <sup>o</sup> Dia	0 <sup>o</sup> Dia		3 <sup>o</sup> Dia		
<b>SS</b> I.P.; 20 mL/kg	22,45±1,36	24,24±2,61	0/5	22,05±1,63	23,98±1,52	0/5
<b>SES</b> I.P.; 20 mL/kg	21,51±0,65	23,47±1,64	0/5	23,30±0,45	25,31±0,62	0/5
<b>PEG-400</b> I.P.; 5 g/kg	21,04±0,98	23,22±0,70	0/5	21,51±1,19	24,19±0,69	0/5
<b>OM</b> I.P.; 20 mL/kg	21,68±0,52	23,22±0,70	0/5	22,23±1,06	23,97±0,79	0/5

<sup>a</sup> Média ± desvio padrão de 5 camundongos, <sup>b</sup> n° de mortos/n° de animais testados.

Tabela 36- Valores médios do peso corpóreo e mortalidade de camundongos submetidos ao teste de toxicidade sistêmica do filme de LBN vulcanizado com An-B/KOH e 12kGy.

Meio extrator, Via e Dose	Extrato			Controle		
	Peso Corpóreo <sup>a</sup> (g)		Mortalidade <sup>b</sup>	Peso Corpóreo <sup>a</sup> (g)		Mortalidade <sup>b</sup>
0 <sup>o</sup> Dia	3 <sup>o</sup> Dia	0 <sup>o</sup> Dia		3 <sup>o</sup> Dia		
<b>SS</b> I.P.; 20 mL/kg	19,92±0,31	22,06±0,42	0/5	19,85±0,47	22,07±0,45	0/5
<b>SES</b> I.P.; 20 mL/kg	20,21±0,09	22,44±0,31	0/5	20,11±0,63	22,47±1,12	0/5
<b>PEG-400</b> I.P.; 5 g/kg	20,80±0,70	23,45±1,00	0/5	21,09±0,72	23,52±1,06	0/5
<b>OM</b> I.P.; 20 mL/kg	20,14±0,33	22,16±0,65	0/5	19,78±0,45	21,81±0,60	0/5

<sup>a</sup> Média ± desvio padrão de 5 camundongos, <sup>b</sup> n° de mortos/n° de animais testados.

Um resumo das variações médias do peso corpóreo dos camundongos submetidos ao teste de toxicidade sistêmica de todos os filmes de LBN é mostrado na Tabela 37.

Tabela 37 - Variação média de peso corpóreo de camundongos submetidos ao teste de toxicidade sistêmica de filmes de látex de borracha natural.

Meio extrator, Via e Dose	Variação de peso corpóreo <sup>a</sup> (g)							
	Filme de LBN não vulcanizado		Filme de LBN vulcanizado com 250kGy		Filme de LBN vulcanizado com An-B e 12 kGy		Filme de LBN vulcanizado com enxofre	
	Extrato	Controle	Extrato	Controle	Extrato	Controle	Extrato	Controle
<b>SS</b> I.P.; 20 mL/kg	1,40±0,71	1,77±0,33	1,79±1,42	1,93±1,00	2,14±0,20	2,22±0,42	2,96±0,49	2,80±1,72
<b>SES</b> I.P.; 20 mL/kg	1,55±0,53	1,59±0,63	1,96±1,57	2,01±0,70	2,23±0,27	2,36±0,57	2,24±1,11	2,80±0,39
<b>PEG-400</b> I.P.; 5 g/kg	2,31±1,23	2,62±1,22	2,62±1,09	2,68±0,88	2,65±0,51	2,43±0,40	2,34±1,10	2,65±0,27
<b>OM</b> I.P.; 20 mL/kg	-	-	1,54±1,04	1,74±1,30	2,02±0,35	2,03±0,21	1,93±0,92	2,73±0,48

<sup>a</sup> Média ± desvio padrão de 5 camundongos.

Ajustaram-se quatro modelos de análise de variância<sup>73</sup> (Apêndice) e, conforme indicou a análise descritiva, as variações médias de massa dos camundongos são iguais para todos os tratamentos.

Os sinais e sintomas dos animais foram acompanhados, imediatamente após os tratamentos até a 4<sup>a</sup> hora, e a intervalos de 24 horas até 72 horas (Tabelas 38 a 41).

Tabela 38 - Observações dos sinais e sintomas de camundongos submetidos a toxicidade sistêmica do filme de LBN não vulcanizado.

Meio extrator	Sinais e Sintomas <sup>a</sup>									
	Imediatamente		4 horas		24 horas		48 horas		72 horas	
	Extrato	Controle	Extrato	Controle	Extrato	Controle	Extrato	Controle	Extrato	Controle
SS	an	an	an	an	an	an	an	an	an	an
SES	an	an	an	an	an	an	an	an	an	an
PEG-400	an	an	an	an	an	an	an	an	an	an
OM	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr

<sup>a</sup> 5 camundongos por tratamento, an = aparência normal, nr = não realizado.

Tabela 39 - Observações dos sinais e sintomas de camundongos submetidos a toxicidade sistêmica do filme de LBN vulcanizado com enxofre.

Meio extrator	Sinais e Sintomas <sup>a</sup>									
	Imediatamente		4 horas		24 horas		48 horas		72 horas	
	Extrato	Controle	Extrato	Controle	Extrato	Controle	Extrato	Controle	Extrato	Controle
SS	an	an	an	an	an	an	an	an	an	an
SES	an	an	an	an	an	an	an	an	an	an
PEG-400	an	an	an	an	an	an	an	an	an	an
OM	s im	an	s im	an	an	an	an	an	an	an

<sup>a</sup> 5 camundongos por tratamento, an = aparência normal, nr = não realizado, s = sedação, im = incoordenação motora.

Os animais testados com o extrato oleoso do filme de LBN vulcanizado com enxofre apresentaram incoordenação motora e sedação nas primeiras 4 horas de tratamento. Após esse período, os animais, observados visualmente, mostraram aparência normal até completar as 72 horas de observação do experimento. Portanto as substâncias dos filmes de LBN vulcanizado com enxofre, que causaram as reações tóxicas *in vivo*, mesmo que passageiras, foram devido aos produtos químicos utilizados no processo de vulcanização. Estes produtos promoveram uma resposta mais aguda no meio oleoso, confirmando a importância da capacidade extratora do solvente empregado.

Tabela 40 - Observações dos sinais e sintomas de camundongos submetidos a toxicidade sistêmica do filme de LBN vulcanizado com 250 kGy.

Meio extrator	Sinais e Sintomas <sup>a</sup>										
	Imediatamente		4 horas		24 horas		48 horas		72 horas		
	Extrato	Controle	Extrato	Controle	Extrato	Controle	Extrato	Controle	Extrato	Controle	
SS	an	an	an	an	an	an	an	an	an	an	an
SES	an	an	an	an	an	an	an	an	an	an	an
PEG-400	an	an	an	an	an	an	an	an	an	an	an
OM	an	an	an	an	an	an	an	an	an	an	an

<sup>a</sup> 5 camundongos por tratamento, an = aparência normal.

Os filmes de LBN não vulcanizado e vulcanizado com radiação ionizante, na presença e na ausência de radiosensibilizador, apesar de apresentarem fraca citotoxicidade, não apresentaram toxicidade no teste *in vivo*.

Tabela 41 - Observações dos sinais e sintomas de camundongos submetidos a toxicidade sistêmica do filme de LBN vulcanizado com An-B/KOH e 12 kGy.

Meio extrator	Sinais e Sintomas <sup>a</sup>									
	Imediatamente		4 horas		24 horas		48 horas		72 horas	
	Extrato	Controle	Extrato	Controle	Extrato	Controle	Extrato	Controle	Extrato	Controle
SS	an	an	an	an	an	an	an	an	an	an
SES	an	an	an	an	an	an	an	an	an	an
PEG-400	an	an	an	an	an	an	an	an	an	an
OM	an	an	an	an	an	an	an	an	an	an

<sup>a</sup> 5 camundongos por tratamento, an = aparência normal.

O teste de toxicidade sistêmica aguda em camundongos, quando não resulta em morte, mostra uma certa dificuldade de observação e quantificação da manifestação dos sintomas de toxicidade, dando origem à uma interpretação subjetiva. Entretanto, mesmo que não medida, é evidente que as reações anormais do teste *in vivo* foram promovidas por substâncias extraídas de filmes de LBN convencionalmente vulcanizado.

Trabalhos de outros pesquisadores<sup>75,76</sup>, detectaram toxicidade em produtos comerciais de LBN no teste de injeção sistêmica e tratamento com o extrato oleoso, que resultaram na mortalidade dos animais.

Segundo Wilsnack<sup>76</sup>, em estudos de biocompatibilidade de produtos médico-hospitalares, utilizando testes *in vitro* e *in vivo*, do total de produtos de borracha testados, 22% apresentaram toxicidade *in vitro* e *in vivo*, 43% apresentaram toxicidade no teste *in vitro* sem apresentar efeito no teste *in vivo*, e 35% não apresentaram toxicidade. O ensaio *in vitro* foi realizado utilizando-se cultura de

células WI-38 e os testes *in vivo*, foram realizados por injeção sistêmica em ratos, e testes intracutâneo e implante muscular em coelhos. Dos testes positivos com cultura celular, apenas 0,75% apresentou toxicidade na injeção sistêmica em tratamento com extrato oleoso, 37,5% apresentaram toxicidade no teste intracutâneo com o extrato oleoso e 17% foi considerado tóxico pelo teste de implante intramuscular. Pode-se dizer que nenhum teste positivo *in vivo* foi negativo *in vitro*, e que a discrepância entre os testes *in vitro* e *in vivo*, pode ser atribuída à diferença na eficiência de extração dos meios extratores.

Os resultados apresentados neste trabalho, evidenciaram a maior sensibilidade do teste *in vitro* para detectar efeitos tóxicos de substâncias extraíveis de materiais.

## **Capítulo 5**

### **CONCLUSÕES**

O LBN é um produto natural sujeito a alterações com perda de suas propriedades, por isso é necessário a seleção e caracterização dessa matéria prima para a obtenção de boas propriedades mecânicas de seus produtos. Assim, o LBN foi selecionado e caracterizado por 13 ensaios físicos, químicos e mecânicos, e considerado adequado, conforme especificações nacional e internacional. Entretanto, um teste adicional avaliando a concentração de Mg presente no LBN, confirmou, como observado por outros pesquisadores<sup>6</sup>, a influência desse cátion sobre a estabilidade mecânica e conseqüentemente o abaixamento da RT. Por outro lado a comparação desses valores com as especificações de luvas, demonstraram que as RT foram satisfatórias para aplicações em alguns artefatos. Portanto, para o objetivo deste trabalho, que é a investigação dos efeitos tóxicos atribuídos às substâncias utilizadas nos diferentes processos de vulcanização, o LBN foi considerado adequado.

O LBN foi vulcanizado por 2 processos diferentes: o convencional que utiliza enxofre e calor e o processo alternativo que utiliza a radiação ionizante, e neste trabalho, o LBN foi vulcanizado com raios gama. Foram obtidos 4 filmes de LBN pelo método do derrame: um filme não vulcanizado, para avaliação da toxicidade das substâncias naturalmente presentes no LBN; um filme vulcanizado convencionalmente com enxofre, para avaliação dos efeitos tóxicos dos produtos químicos de vulcanização utilizados neste processo; e dois filmes vulcanizados pelo processo alternativo com raios gama, na ausência e na presença de radiosensibilizador, para verificação dos efeitos tóxicos da utilização do radiosensibilizador. No processo alternativo as respectivas DV foram obtidas a partir da resistência à tração na ruptura, que é a propriedade mecânica mais sensível

aos efeitos da dose para essa determinação<sup>6</sup>. Esta propriedade, também foi utilizada para comprovar a representatividade dos filmes em relação aos processos de vulcanização. A DV do LBN, vulcanizado com raios gama na ausência do radiosensibilizador, foi de 233kGy, que é uma dose muito elevada para ser aplicada industrialmente. Para o LBN vulcanizado com o sistema de radiosensibilizador 4phr de An-B/0,2phr de KOH a DV foi diminuída para 12kGy, o que comprova a eficiência do radiosensibilizador que reduziu a dose em cerca de 95%. Assim também fica claro a importância do radiosensibilizador para tornar viável, industrialmente, este processo alternativo de vulcanização.

Em ambos os processos estudados, foram adicionadas ao LBN substâncias necessárias à vulcanização, e algumas delas podendo tornar o produto final tóxico. Assim, com o objetivo de avaliar, comparativamente, os efeitos tóxicos dos filmes obtidos a partir de ambos os processos de vulcanização foram realizados ensaios biológicos *in vitro* de citotoxicidade e *in vivo* de toxicidade sistêmica.

Conforme os índices de citotoxicidade, o valor estimado para o filme de LBN vulcanizado com enxofre, IC50% de 2,81, indicou que ele é o mais citotóxico dentre os quatro tipos de filmes de LBN estudados. Esta citotoxicidade foi atribuída aos produtos químicos de vulcanização normalmente utilizados por esse processo, visto que foi utilizado o mesmo LBN para a vulcanização dos dois processos, além da padronização da obtenção dos 4 filmes utilizados nesta avaliação. Outros pesquisadores também tiveram resultados semelhantes<sup>22,70,71,72</sup>.

Os valores de IC50% dos filmes de LBN não vulcanizado e vulcanizado com raios gama, na ausência e na presença de radiosensibilizador, foram muito próximos, por isso foi necessário o emprego de técnicas estatísticas sofisticadas para análise dos resultados, o que exigiu a colaboração de professores do IME/USP. O IC50% do filme de LBN não vulcanizado, estimado em 47,47%, demonstrou a existência de substâncias tóxicas presentes naturalmente na matéria prima. Essa citotoxicidade aumenta quando são adicionados os produtos químicos de



vulcanização do processo convencional e não sofre alteração com a adição do radiosensibilizador An-B (IC50% de 49,77). Assim o processo de vulcanização com raios gama na presença do An-B, não apresentou nenhum efeito tóxico além da citotoxicidade própria do LBN. O filme vulcanizado com raios gama sem radiosensibilizador (IC50% de 54,81), mostrou uma redução da citotoxicidade do filme não vulcanizado que foi atribuída ao aumento da cisão das moléculas pela radiação, que promoveu uma maior lixiviação das substâncias citotóxicas presentes no LBN. Assim, um tema interessante que se pode sugerir, é estudar o efeito da dose e das condições de lixiviação na citotoxicidade de filmes de LBN vulcanizado pelo processo alternativo, com a perspectiva de diminuí-la. De uma maneira geral, os filmes de LBN vulcanizado com radiação ionizante são menos citotóxicos que os filmes de LBN vulcanizado convencionalmente, o que também foi verificado por outros pesquisadores<sup>7,9,72</sup>.

A toxicidade sistêmica foi investigada utilizando-se 4 extratos de cada filme representativo de LBN, que foram: uma solução salina, uma solução etanol/salina, polietileno glicol 400 e óleo de milho. Apenas o filme de LBN vulcanizado com enxofre apresentou efeitos de sedação e incoordenação motora nos animais testados com o extrato oleoso somente nas primeiras 4 horas de tratamento. Os filmes de LBN não vulcanizado e vulcanizado com raios gama não promoveram nenhum efeito tóxico. Assim fica evidente que, as substâncias dos filmes de LBN vulcanizado com enxofre, que causaram as reações tóxicas *in vivo*, mesmo que passageiras, foram os produtos químicos imprescindíveis ao processo de vulcanização convencional, conforme detectado por outros pesquisadores<sup>75,76</sup>.

Assim, pelos estudos realizados no presente trabalho, conclui-se que os filmes de LBN vulcanizado pela radiação ionizante promovem efeitos toxicológicos menores que aqueles vulcanizados pelo processo convencional com enxofre, quando avaliados por testes "*in vitro*" de citotoxicidade e "*in vivo*" de toxicidade sistêmica.

## **Apêndice**

### **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

#### **A1 - FILMES DE LBN VULCANIZADO COM RADIAÇÃO IONIZANTE**

##### **A1.1 - Vulcanização Sem Radiossensibilizador**

Para a determinação da DV dos filmes de LBN vulcanizado sem radiossensibilizador, ajustou-se um modelo de regressão polinomial do segundo grau<sup>64</sup> aos dados de RT e dose na faixa de 0 a 440kGy. A partir desse modelo, estimou-se a DV por ponto e por intervalo. A descrição da análise estatística é dada pela equação abaixo, onde:  $Y_i$  é a resistência à tração do  $i$ -ésimo filme de LBN, em MPa,  $i = 1, \dots, 12$ ;  $X_i$  é a  $i$ -ésima dose de radiação, em kGy,  $i = 1, \dots, 12$ ;  $\beta_j$  são os parâmetros do modelo,  $j = 0, 1, 2$ ; e  $\varepsilon_i$  é o erro aleatório,  $i = 1, \dots, 12$ .

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_i + \beta_2 X_i^2 + \varepsilon_i$$

As suposições desse modelo são as seguintes:

$$\varepsilon_i \sim N(0, \sigma^2);$$

$\varepsilon_i$  independentes

Esse modelo tem como características a existência de um ponto de máximo, e crescimento e decrescimento da variável resposta, resistência à tração, (Y) em função da variável independente, dose, (X) com igual velocidade (simetria).

Os parâmetros foram estimados ( $\Xi$ ) através do método de mínimos quadrados, utilizando o pacote estatístico Minitab for Windows versão 10.2. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela A1.

Tabela A1 - Estimativas dos parâmetros do modelo de regressão e respectivos erros padrão

Parâmetro	Estimativa do parâmetro	Erro padrão da estimativa
$\beta_0$	9,88080	0,73360
$\beta_1$	0,06907	0,00838
$\beta_2$	-0,00015	0,00001

Resultados dos testes  $t^{64}$  para os parâmetros do modelo mostraram que todos os parâmetros estimados são significativamente diferentes de zero (nível descritivo  $(p) < 0,001$ ). Assim, o modelo ajustado foi:

$$\Xi_{Y_i} = 9,880 + 0,069X_i - 0,00015 X_i^2$$

A validade das suposições do modelo foi verificada através de uma análise de resíduos<sup>64</sup>. O gráfico da Figura A1, mostra uma relação aproximadamente linear entre os resíduos observados e seus valores esperados sob a hipótese de normalidade, indicando que a suposição de normalidade dos dados observados foi satisfeita.

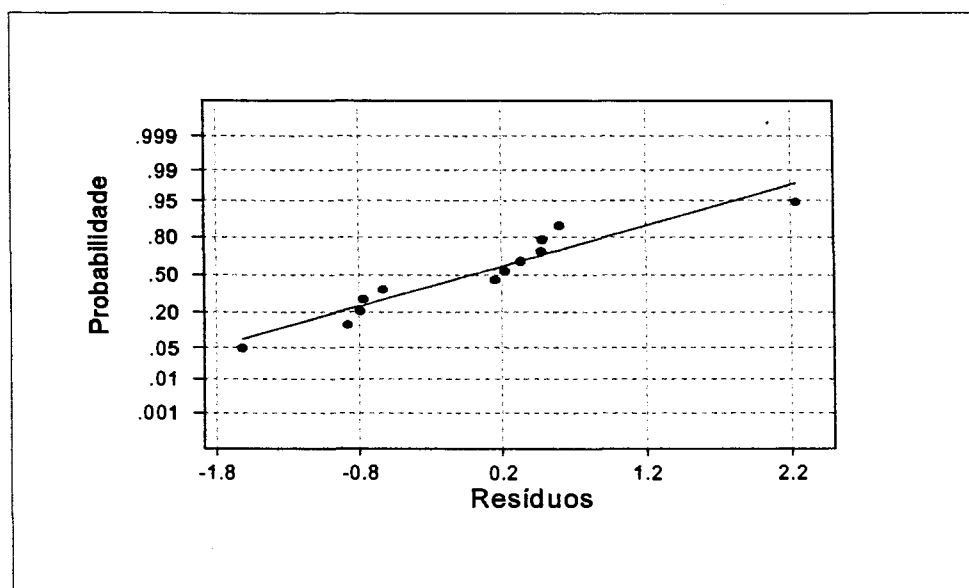


Figura A1 - Gráfico de probabilidade normal dos resíduos do modelo que relaciona resistência à tração e dose de radiação no processo de vulcanização sem radiosensibilizador.

Para testar essa suposição, foi realizado o teste de Shapiro-Wilk<sup>73</sup>, que confirmou a normalidade dos resíduos ( $p > 0,10$ ). A Figura A2 apresenta o gráfico dos resíduos padronizados em função dos valores ajustados da variável RT.

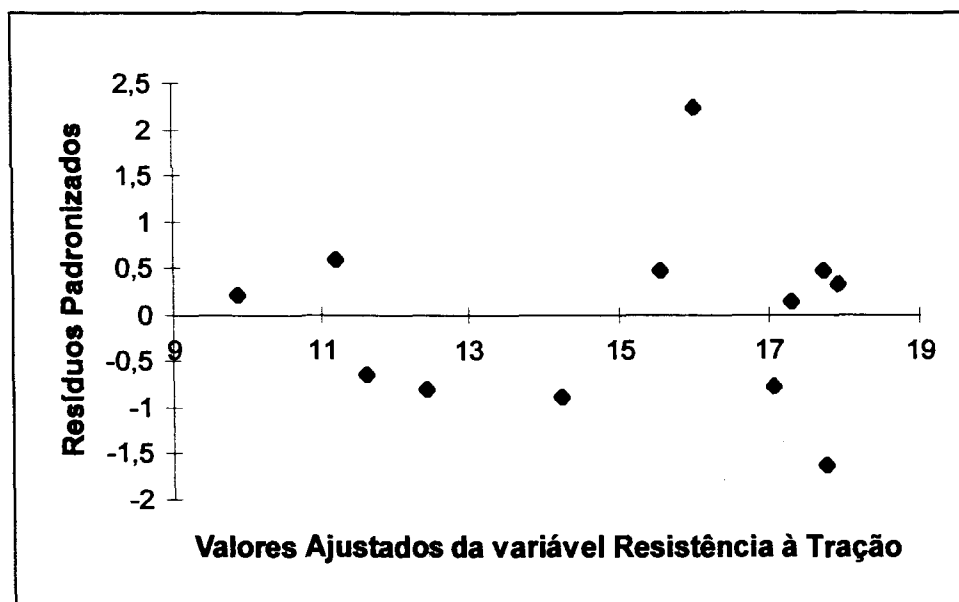


Figura A2 - Gráfico dos resíduos do modelo que relaciona resistência à tração e dose de radiação no processo de vulcanização sem radio-sensibilizador em função dos valores ajustados

A análise da Figura A2 mostra que os resíduos estão bem distribuídos em uma faixa restrita entre -2 e 2,5. Esse fato indica que a suposição de homocedasticidade (igualdade de variâncias) dos erros foi satisfeita e que o modelo adotado é adequado aos dados observados.

A DV de radiação em função dos parâmetros do modelo é dada pelo ponto de máximo do polinômio do segundo grau, ou seja:

$$DV = - \frac{\beta_1}{2 \beta_2}$$

Assim, substituindo-se os parâmetros  $\beta_1$  e  $\beta_2$  por suas respectivas estimativas na equação anterior, obteve-se a estimativa da DV ( $\Xi_{DV}$ ), como segue:

$$\exists DV = \frac{-0,06907}{(-2)*(-0,00015)} = 233,21\text{kGy}$$

A estimativa do erro padrão ( $\exists_{EP}$ ) do estimador da DV foi calculada através do método Delta<sup>78</sup>, resultando em:

$$\exists EP (\exists DV) = 28,25$$

Um intervalo de confiança (IC) para a DV, com coeficiente de confiança de 95%, foi construído a partir das estimativas acima, obtendo-se:

$$IC (DV; 95\%) = [177,84 ; 288,58]$$

### A1.2 - Vulcanização Com Radiossensibilizador

Para a determinação da DV dos filmes de LBN vulcanizado com radiossensibilizador, ajustou-se um modelo de regressão segmentada<sup>64</sup> aos dados de RT e dose na faixa de 0 a 35kGy. Assim, foram ajustadas duas retas: uma para doses menores que 10kGy e outra para doses maiores que 14kGy. Extrapolando-se as retas ajustadas no intervalo de 10 a 14kGy, considerou-se como DV o ponto de interseção entre as duas retas ajustadas, construindo-se, também, um intervalo de confiança para esse ponto. A descrição da análise estatística é dada a seguir, onde  $Y_i$  é a resistência à tração do  $i$ -ésimo filme de LBN, em MPa,  $i = 1, \dots, 7$ ;  $X_i$  é a  $i$ -ésima dose de radiação, em kGy,  $i = 1, \dots, 7$ ; e  $\varepsilon_i$  é o erro aleatório,  $i = 1, \dots, 7$ .

$$Y_i = \beta_{10} + \beta_{11}X_i + \varepsilon_i \quad \text{se } 0 \text{ kGy} < X_i \leq 10\text{kGy}$$

$$Y_i = \beta_{20} + \beta_{21}X_i + \varepsilon_i, \quad \text{se } X_i \geq 14\text{kGy}$$

As suposições desse modelo são as seguintes:

$$\varepsilon_i \sim N(0, \sigma^2)$$

$\varepsilon_i$  independentes.

A interpretação dos parâmetros pode ser feita da seguinte forma:  $\beta_{10}$ : resistência à tração do filme de LBN esperada para a dose de radiação nula (i.e. resistência à tração da matéria-prima bruta);  $\beta_{11}$ : “acrécimo” médio na resistência à tração para um aumento de uma unidade na dose de radiação, para doses menores que a dose de 10kGy;  $\beta_{21}$ : “acrécimo” médio na resistência à tração para um aumento de uma unidade na dose de radiação, para dose maiores que a dose de 14kGy. Os parâmetros foram estimados através do método de mínimos quadrados, utilizando o pacote estatístico Minitab for Windows versão 10.2. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela A2:

Tabela A2- Estimativas dos parâmetros dos modelos de regressão e respectivos erros padrão

Parâmetro	Estimativa do parâmetro	Erro padrão da estimativa
$\beta_{10}$	5,978	1,2200
$\beta_{11}$	1,3962	0,1850
$\beta_{20}$	23,8930	0,8542
$\beta_{21}$	-0,0772	0,0347

Portanto, os modelos ajustados foram:

$$\exists_{Y_i} = 5,978 + 1,396X_i \quad \text{se } 0 \text{ kGy} < X_i \leq 10\text{kGy}$$

$$\exists_{Y_i} = 23,893 - 0,077X_i \quad \text{se } X_i \geq 14\text{kGy}$$

Para estes ajustes, não foi feita análise de resíduos, pois o número de observações é muito pequeno (quatro para o primeiro modelo e três para o segundo).

A DV em função dos parâmetros dos modelos é dada pelo ponto de interseção entre as funções das retas esperadas, ou seja:

$$DV = - \frac{\beta_{20} - \beta_{10}}{\beta_{11} - \beta_{21}}$$

Substituindo-se  $\beta_{10}$ ,  $\beta_{11}$  e  $\beta_{20}$  por suas respectivas estimativas na equação anterior, obteve-se:

$$\Xi_{DV} = - \frac{23,8930 - 5,9780}{1,3962 + 0,0772} = 12,16\text{kGy}$$

Novamente, utilizou-se o método Delta para a estimação do erro padrão do estimador da DV, que resultou em:

$$\Xi_{EP}(\Xi_{DV}) = 1,01$$

Utilizando as estimativas acima, construiu-se um intervalo de confiança para a DV, com coeficiente de confiança de 95%, obtendo-se:

$$\text{IC (DV; 95\%)} = [10,18 ; 14,13]$$

## A2 - CITOTOXICIDADE

### A2.1 - Controles Positivo e Negativo do Teste de Citotoxicidade

Para a determinação do IC50% dos controles positivo e negativo do teste de citotoxicidade, foi ajustado um modelo de regressão linear simples<sup>64</sup>. Para o controle negativo (polietileno de alta densidade), não foi detectado inclinação da reta ajustada ( $p > 0,60$ ). Para o controle positivo (solução de fenol a 0,2%), os parâmetros do modelo de regressão linear foram estimados através do método de mínimos quadrados, utilizando o pacote estatístico Minitab for Windows versão 10.01. Os resultados são apresentados na Tabela A3.

Tabela A3 - Estimativas dos parâmetros dos modelos de regressão linear e respectivos erros padrão estimados do controle positivo.

Parâmetro	Estimativa do parâmetro	Erro padrão da estimativa
$\beta_0$	0,9829	0,0033
$\beta_1$	-0,1036	0,0001

Resultados dos testes t mostraram que todos os parâmetros estimados são significativamente diferentes de zero ( $p\text{-value} < 0,001$ ). Assim, o modelo ajustado onde,  $Y_i$  é a proporção de colônias de células de CHO formadas na  $i$ -ésima concentração da solução de Fenol, e  $X_i$  é a  $i$ -ésima concentração da solução de Fenol,  $i=1, \dots, 6$ , é dado a seguir:

$$Y_i = 0,983 - 0,104 X_i$$

Salienta-se que o modelo ajustado só é válido para concentrações entre 0 e 10%, pois, acima desses valores, obter-se-iam valores negativos para a variável proporção de colônias formadas. A validade das suposições do modelo não foram verificadas devido ao pequeno número de observações. Para o cálculo do IC50% do controle positivo, utilizou-se a seguinte equação:

$$\text{IC50\% do controle positivo} = - \frac{0,50 - \beta_0}{\beta_1}$$

Substituindo-se os parâmetros  $\beta_0$  e  $\beta_1$  por suas respectivas estimativas na equação anterior, obteve-se:

$$\Xi_{\text{IC50\% do controle positivo}} = - \frac{0,50 - 0,983}{-0,104} = 4,66\%$$

A estimativa do erro padrão do estimador do IC50% foi calculada através do método Delta, resultando em:

$$\Xi_{\text{EP}}(\Xi_{\text{IC50\%}}) = 0,52$$

Um intervalo de confiança para o IC50% do controle positivo, com coeficiente de confiança de 95%, é dado por:

$$\text{IC}(\text{IC50\%}; 95\%) = [3,65 ; 5,68]$$



## A2.2 - Filmes de LBN

Para determinação do IC50% dos filmes de LBN não vulcanizado, filme de LBN vulcanizado com 250kGy sem radiosensibilizador e filme de LBN vulcanizado com 12kGy com radiosensibilizador, ajustou-se o modelo de regressão logística<sup>68</sup>. A descrição da análise estatística é dada a seguir, onde:  $\pi_j(X_i)$  é a proporção de colônias formadas na i-ésima concentração do extrato do filme j, sendo j=1, para o filme de LBN não vulcanizado; j=2, para o filme de LBN vulcanizado com 250kGy, sem radiosensibilizador e j=3, para o filme de LBN vulcanizado com 12kGy, com radiosensibilizador;  $X_i$  é a i-ésima concentração do extrato do filme de LBN, em porcentagem,  $0 \leq X_i \leq 100$ .

$$\pi_j(X_i) = \frac{\exp(\beta_{0j} + \beta_{1j}X_i)}{1 + \exp(\beta_{0j} + \beta_{1j}X_i)}$$

Interpretação dos parâmetros:

A transformação do logito é definida como:  $g(x) = \ln \frac{\pi(x)}{1-\pi(x)}$

$\beta_{0j}$ : valor do logito para a concentração nula;

$\beta_{1j}$ : “acrécimo” no logito para um aumento de uma unidade na concentração do extrato do filme de LBN.

No caso do modelo logístico, o IC50% em função dos parâmetros  $\beta_{ij}$  é dada pela concentração  $X_i$  tal que  $\pi_j(X_i)=0,50$ , ou seja:

$$\text{IC50\%} = - \frac{\beta_{0j}}{\beta_{1j}}$$

Para determinação do IC50% do filme de LBN vulcanizado com enxofre, ajustou-se o modelo de Gompertz<sup>69</sup>. A descrição da análise estatística é dada a seguir, onde:  $\pi_4(X_i)$  é a proporção de colônias formadas na i-ésima concentração do

extrato do filme de LBN vulcanizado com enxofre;  $X_i$  é a  $i$ -ésima concentração do extrato do filme de LBN vulcanizado com enxofre, em porcentagem,  $0 \leq X_i \leq 100$ .

$$\pi_4(X_i) = \exp\left(-\exp(\beta_{04} + \beta_{14} X_i)\right)$$

Interpretação dos parâmetros:

A transformação gompito é definida por :  $g(x) = \ln(-\ln(\pi(x)))$ .

$\beta_{04}$ : valor do gompito para a concentração nula;

$\beta_{14}$ : “acrécimo” no gompito para um aumento de uma unidade na concentração do extrato do filme de LBN.

No caso do modelo de Gompertz, o IC50% em função dos parâmetros  $\beta_{ij}$  é dada por:

$$IC50\% = - \frac{\ln(-\ln 0,50) - \beta_{04}}{\beta_{14}}$$

Ambos os modelos apresentam como características a forma sigmoideal e assíntotas zero e um. A diferença básica entre os dois modelos é o fato de que o modelo logístico é reflexivamente simétrico em relação ao seu ponto de inflexão, ao contrário do modelo de Gompertz. Os resultados dos ajustes realizados são dados a seguir.

#### A2.2.1 - Filme de LBN Não Vulcanizado

Os parâmetros do modelo de regressão logística foram estimados através do método de máxima verossimilhança, utilizando o pacote estatístico SAS versão 6.04. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela A4.

Resultados dos testes da razão de verossimilhança mostraram que todos os parâmetros estimados são significativamente diferentes de zero ( $p < 0,001$ ).

Tabela A4 - Estimativas dos parâmetros do modelo de regressão logística e respectivos erros padrão estimados.

Parâmetro	Estimativa do parâmetro	Erro padrão estimado
$\beta_{01}$	12,6356	1,1393
$\beta_{11}$	-0,2662	0,0236

Assim, o modelo ajustado foi:

$$\exists \pi_1 (X_i) = - \frac{\exp(12,6356 - 0,2662X_i)}{1 + \exp(12,6356 - 0,2662X_i)}$$

A qualidade do ajuste do modelo foi testada através do teste de Pearson<sup>68</sup>, concluindo-se que o modelo proposto (Figura A3) é adequado ( $p > 0,361$ ).

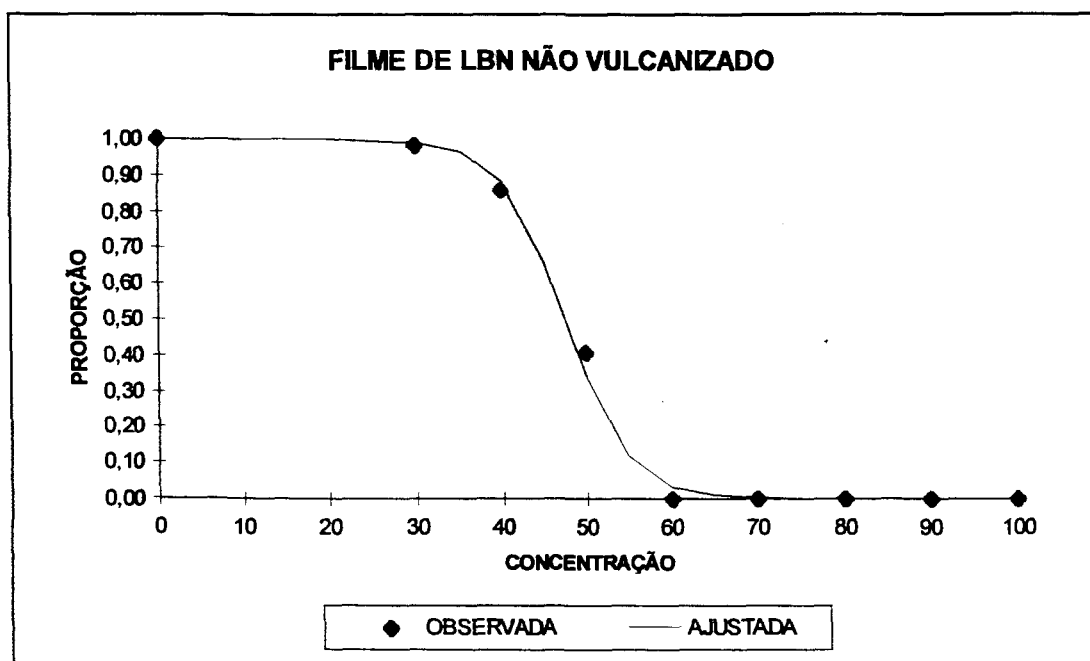


Figura A3 - Curva ajustada para proporção de colônias formadas em função da concentração do extrato de filme de LBN não vulcanizado

Substituindo-se os parâmetros  $\beta_{01}$  e  $\beta_{11}$  por suas respectivas estimativas, obteve-se:

$$\exists IC_{50\%} = - \frac{12,6356}{-0,2662} = 47,47\%$$

A estimativa do erro padrão do estimador do IC50% foi calculada através do método Delta, resultando em:

$$\Xi_{EP}(\Xi_{IC50\%}) = 0,60$$

O intervalo de confiança para o IC50%, com coeficiente de confiança de 95%, é dado por:

$$IC(\Xi_{IC50\%}; 95\%) = [46,31; 48,64]$$

### A2.2.2 - Filme de LBN Vulcanizado com 250kGy e Sem Radiossensibilizador

Utilizando o mesmo procedimento adotado em a), foram obtidas as estimativas apresentadas na Tabela A5.

Tabela A5 - Estimativas dos parâmetros do modelo de regressão logística e respectivos erros padrão estimados.

Parâmetro	Estimativa do parâmetro	Erro padrão estimado
$\beta_{02}$	12,5309	1,1562
$\beta_{12}$	-0,2286	0,0209

Resultados dos testes da razão de verossimilhança mostraram que todos os parâmetros estimados são significativamente diferentes de zero ( $p < 0,001$ ). O modelo ajustado foi, então:

$$\Xi\pi_2(X_i) = \frac{\exp(12,5309 - 0,2286X_i)}{1 + \exp(12,5309 - 0,2286X_i)}$$

A qualidade do ajuste do modelo foi testada através do teste de Pearson, que rejeitou a adequação do modelo. Contudo, o gráfico apresentado na Figura A4 indica que o modelo se adequa aos dados, podendo-se atribuir o motivo do resultado negativo do teste à uma dispersão das observações em torno do modelo proposto maior que a esperada.

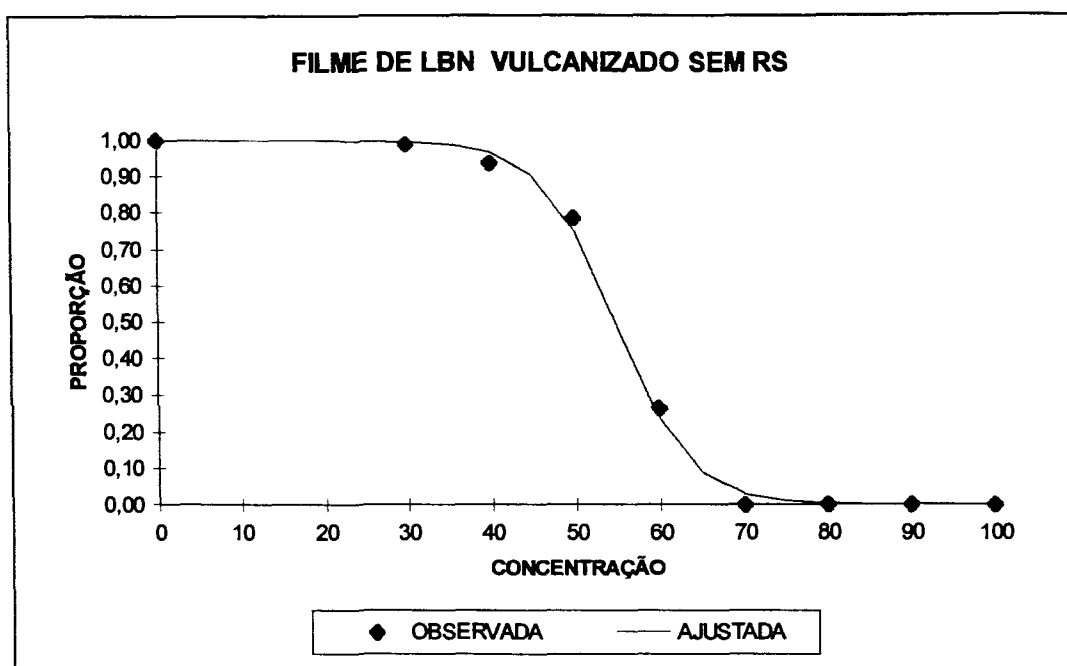


Figura A4 - Curva ajustada para proporção de colônias formadas em função da concentração do extrato de filme de LBN vulcanizado com irradiação de 250kGy sem radiosensibilizador (RS)

Em função desse resultado, as variâncias dos estimadores dos parâmetros do modelo foram corrigidas pelo fator de heterogeneidade  $H^{77}$ , que nesse caso é igual a 2,5302. Substituindo-se os parâmetros  $\beta_{02}$  e  $\beta_{12}$  por suas respectivas estimativas, obteve-se:

$$\Xi_{IC50\%} = - \frac{12,5309}{-0,2286} = 54,81\%$$

A estimativa do erro padrão do estimador IC50% foi calculado através do método Delta, resultando em:

$$\Xi_{EP}(\Xi_{IC50\%}) = 0,72$$

Utilizando os valores obtidos, foi construído o seguinte intervalo de confiança para a IC50%, com coeficiente de confiança de 95%:

$$IC(ED50; 95\%) = [53,39; 56,23].$$

### A2.2.3 - Filme de LBN Vulcanizado com 12kGy e com Radiossensibilizador

As estimativas de máxima verossimilhança dos parâmetros do modelo de regressão logística são apresentados na Tabela A6:

Tabela A6 - Estimativas dos parâmetros do modelo de regressão logística e respectivos erros padrão estimados.

Parâmetro	Estimativa do parâmetro	Erro padrão estimado
$\beta_{03}$	12,6417	2,2378
$\beta_{13}$	-0,2540	0,0445

Resultados dos testes da razão de verossimilhança mostraram que todos os parâmetros estimados são significativamente diferentes de zero ( $p < 0,001$ ). Assim, o modelo ajustado foi:

$$\exists \pi_3 (X_i) = - \frac{\exp(12,6417 - 0,2540X_i)}{1 + \exp(12,6417 - 0,2540X_i)}$$

O ajuste do modelo foi rejeitado pelo teste de Pearson ( $p < 0,001$ ). Contudo, o gráfico apresentado na Figura A5, indica que o modelo se adequa aos dados. Assim sendo, utilizou-se novamente o fator de heterogeneidade H, que nesse caso é igual a 8,2555. Substituindo-se os parâmetros  $\beta_{03}$  e  $\beta_{13}$  por suas respectivas estimativas, obteve-se:

$$\exists_{IC50\%} = - \frac{12,6417}{-0,2540} = 49,77\%$$

Mais uma vez, estimou-se o erro padrão do estimador IC50% através do método Delta, obtendo-se:

$$\exists_{EP}(\exists_{IC50\%}) = 1,21$$

Assim, um intervalo de confiança para o IC50%, com coeficiente de confiança de 95%, é dado por:

$$IC(\Xi_{IC50\%}; 95\%) = [47,40; 52,14]$$

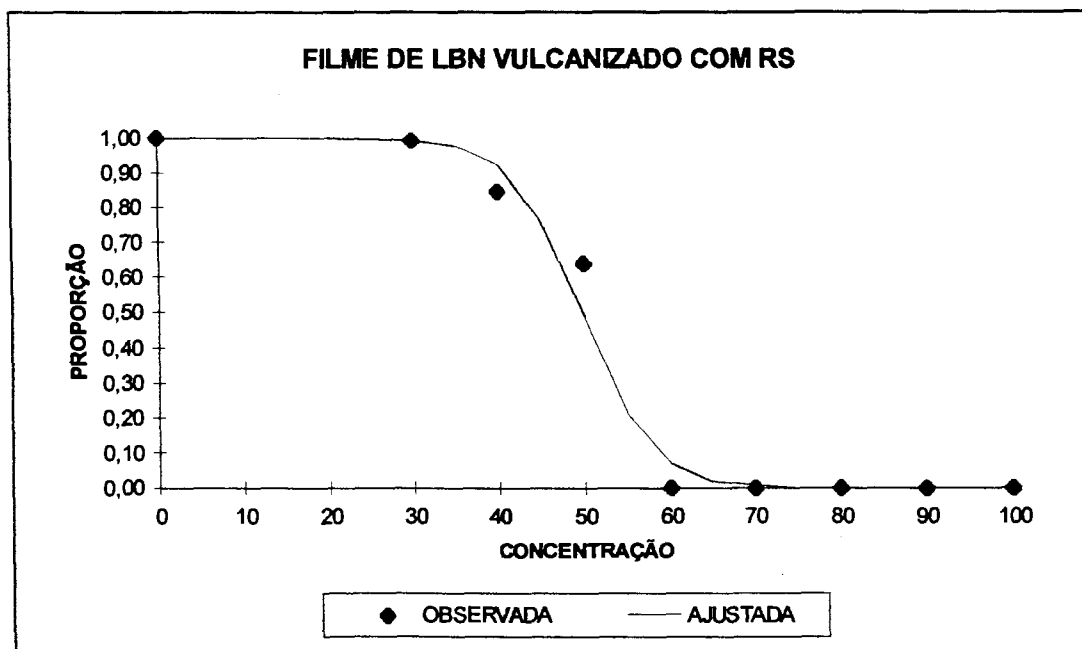


Figura A5 - Curva ajustada para proporção de colônias formadas em função da concentração do extrato de filme de LBN vulcanizado com 12kGy com radiossensibilizador (RS)

#### A2.2.4 - Filme de LBN Vulcanizado com Enxofre

Os parâmetros do modelo de Gompertz foram estimados através do método de mínimos quadrados, utilizando o SPSS/PC+ for Windows versão 6.0. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela A7.

Tabela A7 - Estimativas dos parâmetros do modelo de regressão de Gompertz e respectivos erros padrão estimados.

Parâmetro	Estimativa do parâmetro	Erro padrão estimado
$\beta_{04}$	-22,3415	0,0000
$\beta_{14}$	7,8235	0,0000

Assim, tem-se o seguinte modelo ajustado:

$$\Xi\pi_1 (X_i) = \exp(-\exp(-22,3415 + 7,8235X_i))$$

Devido ao pequeno número de observações, o modelo ajustou-se perfeitamente aos dados (Figura A6), gerando, portanto, estimativas dos erros padrão nulas. No entanto, esse modelo deve ser utilizado com cautela, pois foi ajustado com base em um número reduzido de pontos.

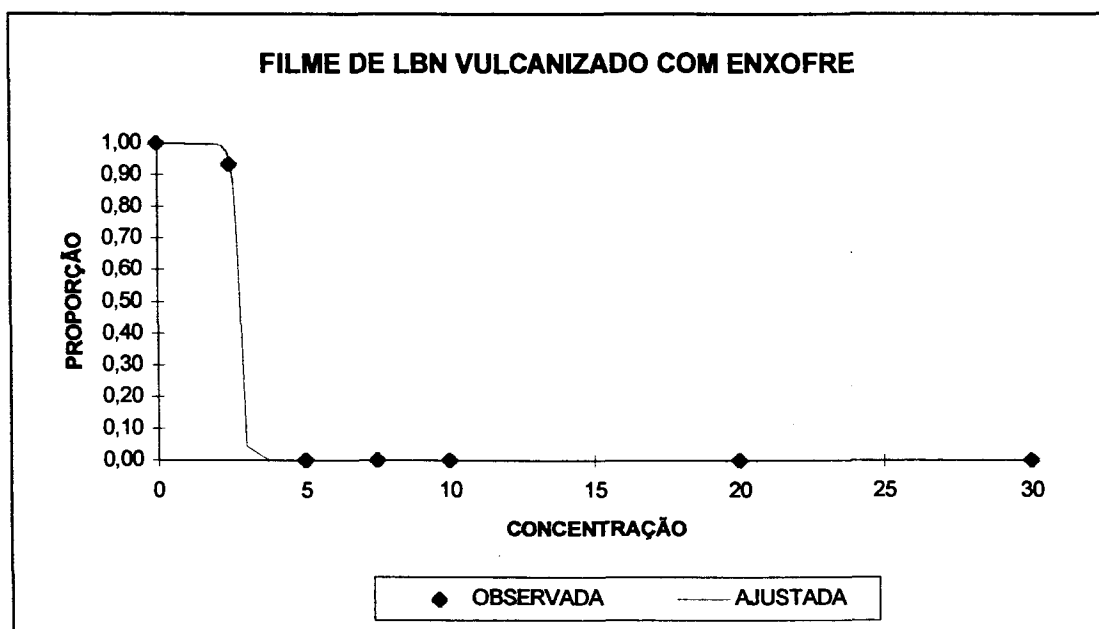


Figura A6 - Curva ajustada para proporção de colônias formadas em função da concentração do extrato de filme de LBN vulcanizado com enxofre.

Substituindo-se os parâmetros  $\beta_{04}$  e  $\beta_{14}$  por suas respectivas estimativas, obteve-se:

$$\Xi_{IC50\%} = - \frac{\ln(-\ln 0,50) + 22,3415}{7,8235} = 2,81\%$$

O erro padrão da estimativa acima não pôde ser calculado pois os erros padrão são nulos. Pelo mesmo motivo, não foi possível construir um intervalo de confiança para o IC50% no caso de filme de LBN vulcanizado com enxofre.

### A3 - TOXICIDADE SISTÊMICA

A análise de variância visou à comparação das variações médias de massa dos camundongos, obtidas através dos quatro tipos de filme e dos quatro controles.



Assim, foram adotados quatro modelos de análise de variância com um fator fixo<sup>73</sup>, um para cada meio extrator. As suposições do modelo de análise de variância com um fator fixo foram testadas, estando todas satisfeitas.

Os gráficos de probabilidade normal das Figuras A7 a A10, mostram relações aproximadamente lineares entre os resíduos observados e seus valores esperados sob a hipótese de normalidade. Esse fato indica que a suposição de normalidade dos dados está satisfeita.

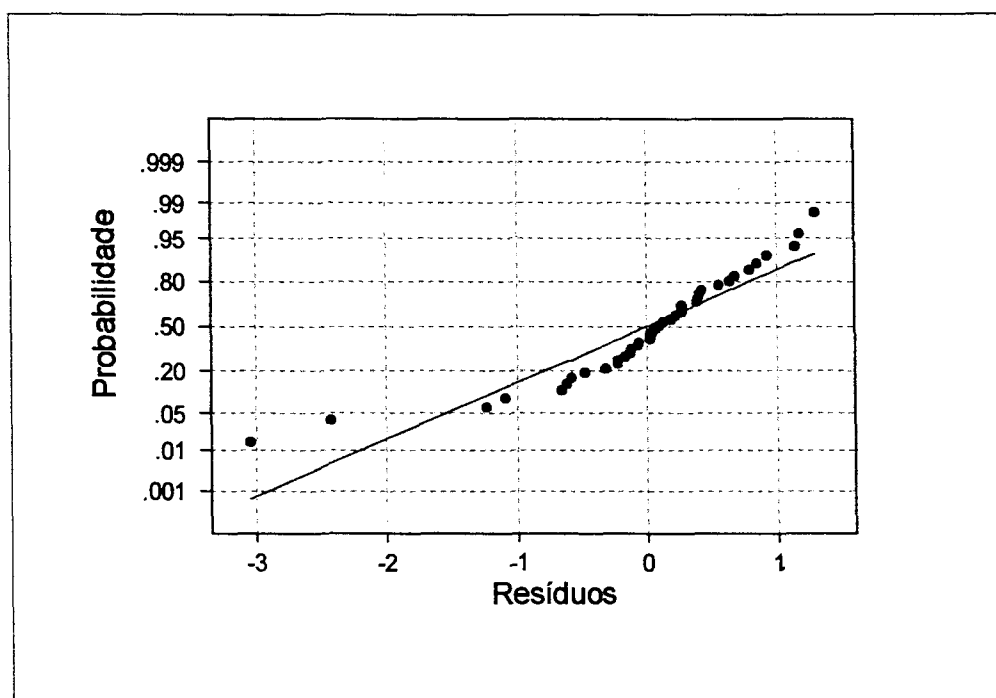


Figura A7 - Gráfico de probabilidade normal dos resíduos do modelo de análise de variância - Meio extrator: Salina

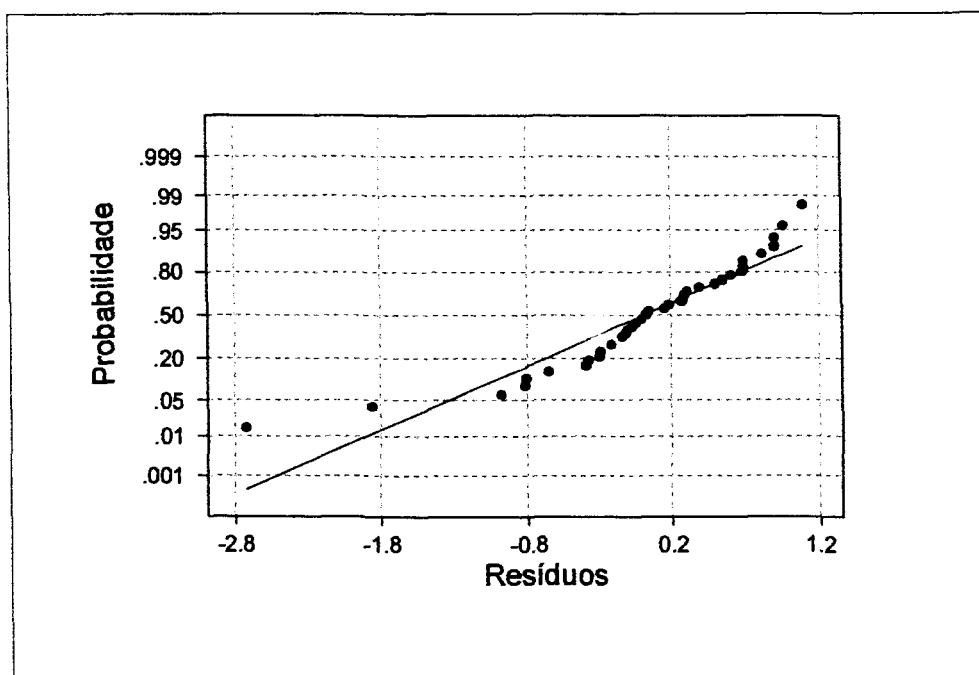


Figura A8 - Gráfico de probabilidade normal dos resíduos do modelo de análise de variância - Meio extrator: Salina/Etanol

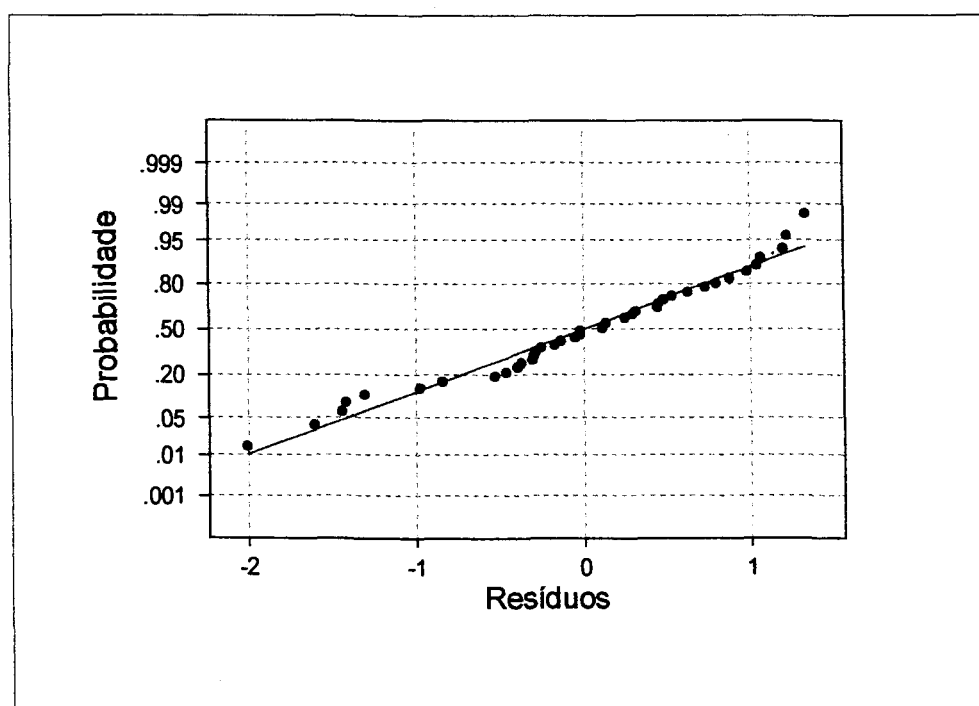


Figura A9 - Gráfico de probabilidade normal dos resíduos do modelo de análise de variância - Meio extrator: Polietilenoglicol

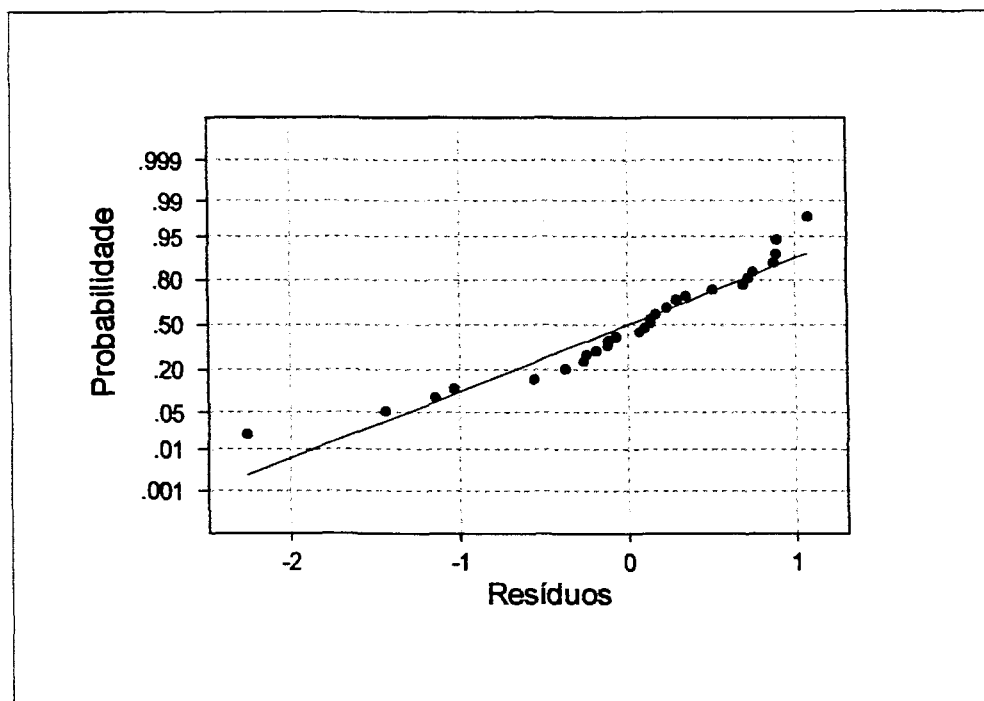


Figura A10 - Gráfico de probabilidade normal dos resíduos do modelo de análise de variância - Óleo

O teste de Shapiro-Wilk<sup>73</sup>, confirmou a hipótese de normalidade para os meios extratores *Polietilenoglicol* ( $p > 0,10$ ) e *Óleo* ( $p > 0,03$ ). Contudo, no caso dos meios extratores *Salina* e *Etanol/Salina*, o teste rejeitou essa hipótese ( $p < 0,01$ ). Pelas Figuras A8 e A9, nota-se que os desvios existentes não são graves. Sendo a análise de variância uma técnica robusta nesses casos, prosseguiu-se com a análise.

A igualdade de variâncias nos oito tratamentos, foi testada através do teste de Levene<sup>73</sup>, tendo sido aceita para todos os meios extratores ( $p > 0,04$ ). Assim, ajustaram-se quatro modelos de análise de variância e, conforme indicou a análise descritiva, as variações médias de massa dos camundongos são iguais para todos os tratamentos ( $p > 0,15$ ).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - BRASIL. Ministério da Indústria e do Comércio. Superintendência da Borracha. *Curso básico em tecnologia de elastômeros*, v. 1-6, 1993.
- 2 - TURJANMAA, K. European medical experiences. In: INTERNATIONAL CONFERENCE JOINTLY ORGANIZED BY EUROPEAN RUBBER JOURNAL AND RUBBER CONSULTANTS, december 6, 1993, Amsterdam. *Latex protein allergy - the present position*, Amsterdam: Vrije Universiteit, 1993. p. 17-19.
- 3 - LEVY, D. A. Diagnosis of allergy to latex proteins. In: INTERNATIONAL CONFERENCE JOINTLY ORGANIZED BY EUROPEAN RUBBER JOURNAL AND RUBBER CONSULTANTS, december 6, 1993, Amsterdam. *Latex protein allergy - the present position*, Amsterdam: Vrije Universiteit, 1993. p. 33-39.
- 4 - VISTINS, M. ; HUANG, W. Alternative materials for gloves. In: INTERNATIONAL CONFERENCE JOINTLY ORGANIZED BY EUROPEAN RUBBER JOURNAL AND RUBBER CONSULTANTS, december 6, 1993, Amsterdam. *Latex protein allergy - the present position*, Amsterdam: Vrije Universiteit, 1993. p. 47-58.
- 5 - MORRIS, M. D. Health Considerations of Synthetic Alternatives to Natural Rubber Latex. *Journal of Natural Rubber Research*, v. 9, n. 2, p. 121-126, 1994.

- 6 - MAKUUCHI, K. *Progress in Radiation Vulcanization of Natural Rubber Latex*. Takasaki: JAERI 2233, 1994.
- 7 - TSUCHIYA, T.; IKARASHI, Y.; TOYODA, K.; UCHIMA, T.; MIYAHARA, T.; TAKAHASHI, M.; NAKAMURA, A. Toxicological Evaluation for Biomaterials: Examinations of radiation vulcanized Natural Rubber Latex. *Radiation Physics Chemistry*, v. 39, n. 6, p. 541-545, 1992.
- 8 - KUME, T.; MATSUDA, T. Changes in Structural and Antigenic Properties of Proteins by Radiation. *Radiation Physical Chemistry*, v. 46, n. 2, p. 225-231, 1995.
- 9 - GEERTSMA, R. E.; ORZECOWSKI, T. J. H.; JONKER, M.; DORPEMA, J. W.; ASTEN J. A. A. M. *Radiation Vulcanised Natural Rubber Latex: safer than conventionally processed latex?*. Bilthoven, The Netherlands, Sep. 1996. (Report 605148007)
- 10 - ARAÚJO, S. C. *Vulcanização do Látex de Borracha Natural Induzida com Feixe de Elétrons*. São Paulo: 1993. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.
- 11 - SOUZA, A. *Comportamento do An-B/KOH/HPt-B na Vulcanização do Látex de Borracha Natural Induzida com Raios Gama*. São Paulo: 1994. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.
- 12 - CANAVEL, V. *Efeito do Antioxidante e do Radiossensibilizador na Estabilidade do Látex de Borracha Natural Vulcanizada com Raios Gama*. São Paulo: 1993. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.

- 13 - COLLANTES, H. D. C. *Fabricação de Luvas Cirúrgicas com Látex de Borracha Natural Vulcanizado com Raios Gama*. São Paulo: 1995.  
Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.
- 14 - DEAN, W. *A Luta pela Borracha no Brasil*. São Paulo, S.P.: Nobel, 1989.
- 15- FRANTA, I. *Elastomers and Rubber Compounding Materials*. Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo.: Elsevier, 1989
- 16 - IRSG. Statistic on Commodities Ministry of Primary Industries. *Main Producing Countries of Natural Rubber*, jul, 1995.
- 17 - BERNARDES, M. S. *Sangria da Seringueira*. Piracicaba, S.P. ESALQ/USP, FEALQ, 1990, p. 161-177.
- 18 - BLACKLEY, D C. *High Polymer Latices*. New York, N.Y.: Palmerton Publishing Co Inc., 1966, v. 1-2.
- 19 - MAUSSER, R. F. *The Vanderbilt Latex Handbook*. 3. ed., Norwalk.: R. T. Vanderbilt Company, Inc., 1987.
- 20 - WOLFF, M. E. *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore.: John Wiley & Sons, Inc., 1995, v.1, p. 143-144.
- 21 - WINDHOLZ, M. *The Merck Index. An Encyclopedia of Chemicals and Drugs*. 9. ed., Rahway, N.J.: Merck & Co., Inc., 1976.

- 22 - IKARASHI, Y.; TOYODA, K.; OHSAWA, N.; UCHIMA, T.; TSUCHIYA, T.; KANIWA, M.; SATO, M.; TAKAHASHI, M.; NAKAMURA, A.  
Comparative studies by cell culture and in vivo implantation teste on the toxicity of natural rubber latex materials. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 26, p. 339-356, 1992.
- 23 - HILL, M. J. *Nitrosamines: Toxicology and Microbiology*. Cambridge, New York, Basel, Weinheim.: VCH, Chichester.: Horwood, 1988, p. 88-116.
- 24 - NIEPEL, H. RVNRL in Europe. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON RADIATION VULCANIZATION OF NATURAL RUBBER LATEX, July 26-28, 1989, Tokyo, Takasaki. *Proceedings ...* Takasaki: JAERI, 1990, p. 111-117.
- 25 - BEZ, W. Application of RVNRL in Europe. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON RADIATION VULCANIZATION OF NATURAL RUBBER LATEX, July 26-28, 1989, Tokyo, Takasaki. *Proceedings ...* Takasaki: JAERI, 1990, p. 378-382.
- 26 - ROBERTS, A. D. *Natural Rubber Sciense and Tecnology*. New York, N.Y.: Oxford University Press, 1990, p. 511-601.
- 27 - O'DONNELL, J. L.; SANGSTER, D. F. *Principles od Radiation Chemistry*. 1.ed., London: Edward Arnold, 1970.
- 28 - SOFIARTI, W.; SUNDARDI, F.; UTAMA, M. Radiation Vulcanization of Natural Rubber Latex Using 300 keV Electron Beam Machine. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON RADIATION VULCANIZATION OF NATURAL RUBBER LATEX, July 26-28, 1989, Tokyo, Takasaki. *Proceedings ...* Takasaki: JAERI, 1990, p. 350-357.

- 29 - SPINKS, J. W. T.; WOODS, R. J. *An Introduction to Radiation Chemistry*. 3 ed., New York, N.Y.: John Wiley & Sons, 1990.
- 30 - ERMAN, B.; MARK, J. E. *Rubberlike Elasticity: A molecular Primer*. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore.: John Wiley & Sons, 1988, p. 21-27.
- 31 - HENLEY, E. J.; JOHNSON, E. R. *The Chemistry and Physics of High Energy Reactions*. Washington, D.C.: Univ. Press., 1969.
- 32 - UTAMA, M. *Irradiated Latex and its Application*. Dhaka, Jan. 1990. (IAEA-RU-2080)
- 33 - DEVEMDRA, R.; MAKUUCHI, K. Combination Effect of Carbon Tetrachloride with 2-ethylhexyl Acrylate as a Sensitizer for Radiation Vulcanization of Natural Rubber Latex. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON RADIATION VULCANIZATION OF NATURAL RUBBER LATEX, July 26-28, 1989, Tokyo, Takasaki. *Proceedings...* Takasaki: JAERI, 1990, p. 290-304.
- 34 - AROONVISOOT, P.; MAKUUCHI, K. Selection of Hydroperoxides as Co-Sensitizer for n-Butyl Acrylate. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON RADIATION VULCANIZATION OF NATURAL RUBBER LATEX, July 26-28, 1989, Tokyo, Takasaki. *Proceeding...* Takasaki: JAERI, 1990, p. 305-318.



- 35 - SOEBIANTO, Y. S.; SUNDARDI, F. Effect of Hydrogen Peroxide on the Radiation Vulcanization of Natural Rubber Latex Sensitized with Carbon Tetrachloride and N-Butyl Acrylate. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON RADIATION VULCANIZATION OF NATURAL RUBBER LATEX, July 26-28, 1989, Tokyo, Takasaki. *Proceedings ...* Takasaki: JAERI, 1990, p. 319-325.
- 36 - ZHONGHAI, C.; MAKUUCHI, K. n-Butyl Acrylate as a Sensitizer for Radiation Vulcanization of Natural Rubber Latex. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON RADIATION VULCANIZATION OF NATURAL RUBBER LATEX, July 26-28, 1989, Tokyo, Takasaki. *Proceedings ...* Takasaki: JAERI, 1990, p. 326-335.
- 37 - GARNETT, J. L.; DWORJANYN, P. A.; BETT, S. J.; DANG, H. P. Sensitization in Radiation Grafting, Curing and Vulcanization Processes. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON RADIATION VULCANIZATION OF NATURAL RUBBER LATEX, July 26-28, 1989, Tokyo, Takasaki. *Proceedings ...* Takasaki: JAERI, 1990, p. 268-289.
- 38 - SIRI-UPATHUM, C.; MAKUUCHI, K.; ISHIGAKI, I. Radiation Vulcanization Mechanism of Liquid Isoprene with 2-Ethylhexyl Acrylate. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON RADIATION VULCANIZATION OF NATURAL RUBBER LATEX, July 26-28, 1989, Tokyo, Takasaki. *Proceedings ...* Takasaki: JAERI, 1990, p. 336-349.
- 39 - HILL, D. J. T.; O'DONNELL, J. H.; PERERA, M. C. S.; POMERY, P. J.; SMETSERS, P. Mechanism of Radiation Vulcanization of Natural Rubber Latex Sensitized by Monoacrylates. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 57, p. 1155-1171, 1995.

- 40 - LANGE, D. Latex containing medical devices - Regulatory update. *Conference Jointly Organized by European Rubber Journal and Rubber Consultants : Latex protein allergy - the present position*, p. 39-42, Vrije Universiteit, Amsterdam, 1996.
- 41 - PARK, J. B. *Biomaterials: An Introduction*. New York, N. Y.: Plenum Press, 1979.
- 42 - AUTIAN, J. Toxicological Evaluation of Biomaterials: Primary Acute Toxicity Screening Program. *Official Journal of the International Society for Artificial Organs*, v. 1, n. 1, p. 53-60, 1977.
- 43 - THE INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION.  
*Biological evaluation of medical devices - Part 1 - Guidance on selection of testes*. 1992. (ISO 10993-1:1992 (E)).
- 44 - GEFFEN, M. Latex Medical Device safety Tests. *Conference Jointly Organized by European Rubber Journal and Rubber Consultants : Latex protein allergy - the present position*, p. 17-23, Vrije Universiteit, Amsterdam, 1996.
- 45 - SLATER, J. E. Latex allergy - the US medical experience. *Conference Jointly Organized by European Rubber Journal and Rubber Consultants : Latex protein allergy - the present position*, p. 7-16, Vrije Universiteit, Amsterdam, 1993.
- 46 - TURJANMAA, K.; REUNALA, T. Condoms as a source of latex allergen and cause of contact urticaria. *Contact Dermatitis*, v. 20, p. 360-364, 1989.

- 47 - GRAHAM, D. T.; MARK, G. E.; POMEROY, A. R. IN VIVO VALIDATION OF A CELL CULTURE TEST FOR BIOCOMPATIBILITY TESTING OF URINARY CATHETERS. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 18, p. 1125-1135, 1984.
- 48 - TRUSCOTT, W. It is time to take the agents of irritation, allergic contact dermatitis (Type IV) and immediate type hypersensitivity (Type I) out of the surgical wound. *Conference Jointly Organized by European Rubber Journal and Rubber Consultants : Latex protein allergy - the present position*, p. 53-55, Vrije Universiteit, Amsterdam, 1996.
- 49 - SHAMSUL BAHRI, A. R.; SAMSIDAR HAMZAH; HAFSAH MOHD. GHAZALY; YEANG, H. Y. Latex Allergy Studies: Location of Soluble Proteins in Latex Examination Gloves. *Journal of Natural Rubber Research*, v. 8, n. 4, p. 299-307, 1993.
- 50 - THE AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. *Standard Practice for Selecting Generic Biological Test Methods for Materials and Devices*. 1995. (ASTM F748/95)
- 51 - THE INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. *Biological evaluation of medical devices - Part 5 - Tests for cytotoxicity: in vitro methods*. 1992.(ISO 10993-5:1992 (E)).
- 52 - THE INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. *Biological evaluation of medical devices - Part 11 - Tests for systemic toxicity*. 1993. (ISO 10993-11:1993 (E)).
- 53 - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *Látex concentrado de borracha natural*. 1989. (ABNT EB226/89).

- 54 - KARUNARATNE, S. W. Standardization of Radiation Vulcanized Natural Rubber Latex. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON RADIATION VULCANIZATION OF NATURAL RUBBER LATEX, July 26-28, 1989, Tokyo, Takasaki. *Proceedings ...* Takasaki: JAERI, 1990, p. 225-233.
- 55 - WAHAB, S.; MAKUUCHI, K.; DEVENDRA, R. Effect of Heating and Leaching on Mechanical Properties of Radiation Vulcanized Natural Rubber Latex Film. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON RADIATION VULCANIZATION OF NATURAL RUBBER LATEX, July 26-28, 1989, Tokyo, Takasaki. *Proceedings ...* Takasaki: JAERI, 1990, p. 216-224.
- 56 - THE AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. *Standard Test Methods for Vulcanized Rubber and Thermoplastic Rubber and Thermoplastic Elastomers - Tension*. 1992. (ASTM D412/92).
- 57 - THE UNITED STATES PHARMACOPEIA - THE NATIONAL FORMULARY. 23th Ed., United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD, p. 1699-1703, 1995. (USP 23-NF18).
- 58 - THE AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. *Standard Practice for Extraction of Medical Plastics*. 1991. (ASTM F619/91)
- 59 - ZANINI, A.C.; OGA, S. *Farmacologia Aplicada*. p.13-23, São Paulo, SP.: Atheneu Editora São Paulo, 1994.
- 60 - BARTSCH, W.; SPONER, G.; DIETMANN, K.; FUCHS, G. Acute Toxicity of Various Solvents in the Mouse and Rat. *Arzneimittel-Forschung*, v. 26, p.1581-1583, 1976.

- 61 - THE INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION.  
*Rubber latex, natural - Centrifuged or creamed, ammonia - preserved types - Specification.* 1988.(ISO 2004/88).
- 62 - MAKUUCHI, K. Progress in Radiation Vulcanization of Natural Rubber Latex through International Cooperation. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON RADIATION VULCANIZATION OF NATURAL RUBBER LATEX, July 26-28, 1989, Tokyo, Takasaki. *Proceedings ...* Takasaki: JAERI, 1990, p. 91-99.
- 63 - MOHID, N.; MAKUCCHI, K.; YOSHII, F.; ISHIGAKI, I. Effect of Non-Rubber Components on Sensitized RVNRL. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON RADIATION VULCANIZATION OF NATURAL RUBBER LATEX, July 26-28, 1989, Tokyo, Takasaki. *Proceedings ...* Takasaki: JAERI, 1990, p. 157-163.
- 64 - MAKUUCHI, K.; NAKAUAMA, H. Radiation Processing of Polymer Latex. *Progress in Organic Coatings*, v. 11, p. 241-265,1983.
- 65 - DRAPER, N. R.; SMITH, H. *Applied Regression Analysis*. 2 ed., New York, N.Y.: John Wiley & Sons, 1981.
- 66 - THE AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. *Standard Specification for Rubber Surgical Gloves*. 1991. (ASTM D3577/91)
- 67 - THE AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. *Standard Specification for Rubber Examination Gloves*. 1995. (ASTM D3578/95)
- 68 - COLLET, D. *Modelling Binary Data*. London: Chapman & Hall, 1991.

- 69 - RATKOWSKY, D. A. *Handbook of Nonlinear Regression Models*. New York, N.Y.: Marcel Dekker, Inc., 1990.
- 70 - TSUCHIYA, T.; ARAI, T.; OHHASHI, J.; IMAI, K.; KOJIMA, H.; MIYAMOTO, S.; HATA, H.; IKARASHI, Y.; TOYODA, K.; TAKAHASHI, M.; NAKAMURA, A. Rabbit eye irritation caused by wearing toxic contact lenses and their cytotoxicities: *In vivo / in vitro* correlation study using standard reference materials. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 27, p. 885-893, 1993.
- 71 - NAKAMURA, A.; IKARASHI, Y.; TSUCHIYA, T.; KANIWA, M. A.; SATO, M.; TOYODA, K.; TAKAHASHI, M. Correlations among chemical constituents, cytotoxicities and tissue responses: in the case of natural rubber latex materials. *Biomaterials*, v. 11, p. 92-94, 1990.
- 72 - NAKAMURA, A.; IKARASHI, Y.; TSUCHIYA, T.; KANIWA, M. Radiation Vulcanized Natural Rubber Latex is not Cytotoxic. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON RADIATION VULCANIZATION OF NATURAL RUBBER LATEX, July 26-28, 1989, Tokyo, Takasaki. *Proceedings ...* 1990, p. 79-87.
- 73 - NETER, J.; WASSERMAN, W.; NACHTSHEIM, C. J.; KUTNER, M.H. *Applied Linear Statistical Models*. 4 ed., Homewood: Richard D. Irwing, 1996.
- 74 - THE AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. *Standard Test Method for Agar Diffusion Cell Culture Screening for Cytotoxicity*. 1990. (ASTM F895/90)
- 75 - PINTO, T. J. A. *Controle de Qualidade de Produtos Médico-Hospitalares*. São Paulo: 1984. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo.

- 76 - WILSNACK, R. E. Quantitative Cell Culture Biocompatibility Testing of Medical Devices and Correlation to Animal Tests. *Biomaterial Medical Devices, Art. Org*, v. 4, p. 235-261, 1977.
- 77 - FINNEY, D. J. *Statistical Method in Biological Assay*. London: Charles Griffin & Company Ltd., 1978.
- 78 - AGRESTI, A. *Categorical Data Analysis*. New York, N.Y.: John Wiley & Sons, 1990.