



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

**VALIDAÇÃO DE MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DA
CITOTOXICIDADE DE MATERIAIS POLIMÉRICOS
UTILIZADOS EM EMBALAGENS ALIMENTÍCIAS E/OU
SEUS COMPONENTES.**

JAMILY ARAUJO SOUZA

Salvador-BA

2018

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

FACULDADE DE FARMÁCIA

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA – UFBA

**VALIDAÇÃO DE MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DA
CITOTOXICIDADE DE MATERIAIS POLIMÉRICOS
UTILIZADOS EM EMBALAGENS ALIMENTÍCIAS E/OU
SEUS COMPONENTES.**

JAMILY ARAUJO SOUZA

Dissertação apresentada a Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciências de Alimentos, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carolina Oliveira de Souza
Coorientador: Prof. Dr. Cleber Alberto Schmidt

Salvador- BA
2018

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA),
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Souza, Jamily Araujo
Validação de métodos para avaliação da
citotoxicidade de materiais poliméricos utilizados em
embalagem alimentícias e/ou seus componentes. / Jamily
Araujo Souza. -- Salvador - BA, 2018.
68 f.

Orientadora: Carolina Oliveira de Souza.
Coorientador: Cleber Alberto Schmidt.
Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em
Ciência de Alimentos) -- Universidade Federal da
Bahia, Universidade Federal da Bahia (UFBA)-Faculdade
de Farmácia, 2018.

1. Biocompatibilidade. 2. Citotoxicidade. 3.
Embalagens. I. Souza, Carolina Oliveira de. II.
Schmidt, Cleber Alberto. III. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

TERMO DE APROVAÇÃO

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (nível Mestrado Acadêmico) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciência de Alimentos.

Aprovada em 19 de julho de 2018.

BANCA EXAMINADORA

Carolina O. Souza

Dr^a. Carolina Oliveira de Souza
Universidade Federal da Bahia
Orientadora

Edith Cristina Laignier Cazedey

Dr^a. Edith Cristina Laignier Cazedey
Universidade Federal da Bahia

Ricardo David Couto

Dr. Ricardo David Couto
Universidade Federal da Bahia

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por toda luz, força, fé e principalmente pela oportunidade da realização deste trabalho. A tua presença, fidelidade e o teu sustento me acompanham, sem a tua misericordiosa graça e intervenção nada disso seria possível. A minha mãe Antônia, ao meu pai Valdemir, e todos os familiares, por terem apoiado mais esse desafio em minha vida, suportando a minha ausência, fortalecendo meu caminho por meio de orações e palavras de carinho e confiança. Aos meus orientadores Cleber Alberto, pela orientação, compreensão e paciência para ensinar todos os detalhes dessa caminhada, e a professora Carol Oliveira que também assumiu esse compromisso com muita dedicação e carinho.

Agradeço a todos os amigos que conheci durante essa caminhada por compartilharem comigo grandes momentos, e por me incentivarem com palavras de estímulo e confiança, jamais esquecerei que o mesmo sonho nos uniu. Em especial Aline, Keila, Flávia, Joeli, Barbara e demais colegas.

Aos integrantes e ex-integrantes do Laboratório de Controle Microbiológico, de Produtos Farmacêuticos e Cosméticos, Flávia, Thais e Professora Graça, pelo aprendizado diário, e pelos momentos de descontração.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação, pela dedicação e contribuição.

E a todos que tiveram sua contribuição na execução e conclusão deste projeto, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Os polímeros utilizados em embalagens alimentícias originam-se de fontes vegetais, animais, químicas e biotecnológicas. E sua composição pode ser igualmente variada devido à mistura de polímeros em diferentes proporções ou inclusão de aditivos para a melhoria das propriedades físico-química. Considerando que a segurança toxicológica desses materiais ainda necessita de estudos, metodologias *in vitro* utilizando células de epitélio intestinal humano Caco-2 foram implementadas para avaliar a citotoxicidade de materiais poliméricos de embalagens alimentícias e apresentaram bons resultados quando comparadas entre si. Entretanto, o desempenho analítico das duas metodologias necessita ser devidamente avaliado através da validação de parâmetros analíticos para comprovação inequívoca da sua capacidade. Neste sentido, este trabalho propôs validar e otimizar métodos bioanalíticos, de forma a comprovar sua adequabilidade para a avaliação da citotoxicidade de materiais poliméricos utilizados em embalagens alimentícias e/ou seus componentes. Os ensaios por contato direto (CD) e indireto (CI) foram realizados em placas de Petri de 60 mm contendo suspensão de $1,0 \times 10^6$ células/mL e as amostras, após 24 horas de incubação, tiveram sua biorreatividade determinada pela avaliação do efeito sobre as células. A etapa de validação envolve avaliação da precisão, seletividade, linearidade, especificidade, e robustez dos métodos. A investigação mostrou que dentro da faixa de tamanho mínimo e máximo da amostra a resposta foi linear, com coeficientes de correlação (r) de 0,98 e 0,99 para os métodos de contato direto e indireto, respectivamente. A análise da seletividade, demonstrou que os métodos detectam a presença residual de substância citotóxica. Nos parâmetros de precisão, o desvio padrão relativo variou entre 2,4% a 6,5% (CD) e 1,8% a 15% (CI), estando em conformidade com os valores de referência. Para o estudo da robustez, o único parâmetro que impactou negativamente na resposta foi o aumento do volume de ágar (CI) causando uma diminuição significativa no tamanho dos halos de reatividade ($P < 0,05$). Além de atenderem aos critérios da validação, os métodos podem ser considerados como ferramentas analíticas simples, para triagem da citotoxicidade dos materiais utilizados em embalagens alimentícias.

Palavras chaves : Segurança alimentar. Citotoxicidade. Biopolímeros. Células Caco-2.

ABSTRACT

Polymers used in food packaging are originated from plant, animal, chemical and biotechnological sources. And its composition can be equally varied due to the mixing of polymers in different proportions or inclusion of additives for the improvement of physicochemical properties. Considering that the toxicological safety of these materials still requires studies, two *in vitro* methodologies using Caco-2 human intestinal epithelial cells have recently been implemented to evaluate the cytotoxicity of polymeric food packaging materials, which presented good results when compared to each other. However, the analytical performance of both methods needs to be properly evaluated through the validation of analytical parameters for unequivocal proof of their capacity. In this sense, this work optimized and validated these bioanalytical methods in order to prove its suitability for the cytotoxicity evaluation of polymeric materials used in food packaging and / or its components. Direct (DC) and indirect (IC) contact assays were performed in 60 mm Petri dishes containing 1.0×10^6 cells/mL suspension and the samples after 24 h of incubation had their bioreactivity determined by the evaluation of the effect on the cells. The validation step involved the evaluation of the linear range response, linearity, selectivity, precision and robustness of the methods. The research showed within the range of minimum and maximum sample size tested, the response was linear, with correlation coefficients (r) of 0.98 and 0.99 for direct contact (DC) and indirect contact (IC) methods, respectively. The analysis of selectivity demonstrated that both methods were able to detect the residual presence of cytotoxic substance. For the precision parameters, the relative standard deviation ranged from 2.4% to 6.5% (DC) and 1.8% to 15% (IC), being in compliance with the reference values. For the robustness study, the only parameter that negatively impacted the response was the increase in the volume of agar in the IC method causing a significant decrease in the size of the reactivity halos ($P < 0.05$). In addition to meeting the validation criteria, the methods can be considered as simple analytical tools for screening the cytotoxicity of materials used in food packaging.

Keywords: Food security. Cytotoxicity. Biopolymers. Caco-2 cells.

LISTA DE ABREVIACÕES

- PE – Polietileno
- PP – Polipropileno
- PET – Poli(tereftalato de etileno)
- PC - Policarbonato
- PS – Poliestireno
- PVC – Poli(cloreto de vinila)
- PEAD - Polietileno de alta densidade
- PEBD - Polietileno de baixa densidade
- PEBDL - Polietileno de baixa densidade linear
- PEMD - Polietileno de média densidade
- EVA - Etileno-vinil acetato
- PHAs – Polihidroxicanoatos
- PLA – Polilactato
- PHB - Polihidroxibutirato
- PA - Polímero de amido
- FDA - *Food and Drug Administration*
- TPS - Termoplástico
- PBAT - Poli(butileno adipato-co-tereftalato)
- DMT – Dimetiltereftalato
- Caco-2 - Células de adenocarcinoma do colorretal humano
- NCTC L929 - Células do tecido conjuntivo subcutâneo de camundongo
- ASTM - *American Society for Testing and Materials*- Sociedade Americana de Ensaios e Materiais
- ISO - *International Organization for Standardization* - Organização Internacional para Padronização
- ATCC - *American Type Culture Collection* - Coleção Americana de Tipos Culturas
- MEM - Meio Eagle Modificado
- UR - Umidade relativa
- DMSO - Dimetilsulfido
- FBS - Soro fetal bovino
- CM - Quitosana malato
- IDA - Ingestão Diária Aceitável

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

- Tabela 1** - Classificação da reatividade celular para o ensaio de difusão em ágar e por contato direto 51
- Tabela 2** - Repetibilidade dos métodos por contato direto e por difusão em ágar. Amostra de látex natural em diferentes dimensões 59
- Tabela 3** - Precisão intermediária (inter-dias) dos métodos por contato direto e por difusão em ágar utilizando amostra de látex natural com diferentes dimensões. 60
- Tabela 4** - Precisão intermediária (inter-analistas) dos métodos por contato direto e por difusão em ágar utilizando amostra de látex natural com diferentes dimensões. 60
- Tabela 5** - Robustez do método por difusão em ágar alterando os parâmetros de concentração do ágar, volume de meio MEM/ágar na placa e tempo de incubação (n=6). 61
- Tabela 6** - Robustez do método por contato direto alterando o volume de meio MEM para 400 µL e leitura após 24 horas e 48 horas de contato da amostra (n=6). 62
- Tabela 7** - Biorreatividade das amostras, após 24 horas e 48 horas de incubação, com células Caco-2 por contato direto e difusão em ágar. 64

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Fotomicrografia (100x) de células Caco-2 (A) no primeiro estágio de 24 crescimento (fixação) e (B) após formação da monocamada celular de células Caco-2.

CAPÍTULO II

Figura 1. Exemplo de halos de reatividade observados com fragmentos de látex natural nos ensaios por (A) contato direto e (B) por contato indireto com células Caco-2. 55

Figura 2. Linearidade método por difusão em ágar e por contato direto (n=12). Barras: 56 erro padrão da média.

Figura 3. Exemplo de respostas observadas com PEAD não reativo, no ensaio por (A) 58 difusão em Agar e (B) por contato direto. PEAD impregnado com partenolídeo (10 mM) (C) por difusão e (D) por contato direto.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
OBJETIVOS	16
Objetivo Geral	16
Objetivos Específicos	16
CAPÍTULO I	17
REVISÃO DE LITERATURA	18
1 Embalagens alimentícias	18
2 Migração	20
3 Implementação dos métodos de análise citotóxica	21
3.1 Linhagem e cultivo celular	23
4 Validação: ensaios convencionais versus bioensaios alternativos	25
4.1 Seletividade	26
4.2 Linearidade	26
4.3 Precisão	27
4.4 Robustez	27
4.5 Exatidão	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
CAPÍTULO II	45
RESUMO	46
ABSTRACT	47
1 INTRODUÇÃO	48
2 MATERIAIS E MÉTODOS	49
2.1 Materiais	50
2.2 Manutenção e preparo das células para os ensaios	50
2.3 Ensaios de toxicidade por difusão em Ágar	50
2.4 Ensaios de toxicidade por contato direto	51
2.5 Validação	51
2.6 Avaliação de desempenho do método em testes com diferentes amostras	53
2.7 Análise estatística	53
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
3.1 Otimização e validação dos bioensaios.	54
3.2 Avaliação de desempenho do método em testes com diferentes amostras	63
CONCLUSÃO	66
REFERÊNCIAS	67

INTRODUÇÃO

Devido ao estilo de vida complexo dos consumidores na sociedade moderna, a indústria de alimentos se esforça para desenvolver sistemas de embalagens funcionais e convenientes às características da vida urbana (MACIEL; FRANCO; YOSHIDA, 2012). Com isso, novos conceitos de embalagens foram introduzidos para satisfazer as exigências dos consumidores e demandas socioeconômicas (SOUZA et al., 2013). O uso de polímeros biodegradáveis e o emprego de embalagens que interagem com o produto acondicionado são exemplos de novos sistemas empregados nesse setor.

A busca contínua de novas alternativas proporcionou à indústria de embalagens alimentícias um novo impulso, a combinação de diversos materiais gerando embalagens compostas que passaram a reunir características e propriedades de todos os seus constituintes (SZCZEPAŃSK; KUDŁAK; NAMIEŚNIK, 2018). Além disso, diferentes classes de aditivos passaram a ser utilizados a exemplo de, antioxidantes, estabilizantes, lubrificantes, antiestáticos e agentes anti-bloqueadores, os quais foram desenvolvidos para melhorar a fabricação e garantir vantagens adicionais ao produto (RAPTOPOULOU et al., 2014).

No entanto, a literatura ainda é escassa em relação a estudos sobre a avaliação da segurança de embalagens alimentícias produzidas com polímeros de diversas fontes, bem como no emprego de substâncias durante a sua produção, principalmente no que diz respeito a testes de migração de compostos para os alimentos acondicionados (SCARFATO; MAIO.; INCARNATO, 2015). Quando um alimento entra em contato direto com um material de embalagem, seja qual for a sua natureza, podem ocorrer interações entre eles. Apesar das inúmeras vantagens, a embalagem pode ser uma fonte de contaminação e constituir um ambiente de exposição crônica do consumidor a vários tipos de xenobióticos (FRANZ, 2005).

Com isso, passa a ser necessário estabelecer um controle eficiente sobre os inúmeros componentes associados à fabricação de materiais utilizados para o contato direto com alimentos, uma vez que os materiais empregados não podem ser considerados totalmente inócuos. Este controle deve refletir principalmente a preocupação dos órgãos de regulamentação com a saúde do consumidor (COLTRO & MACHADO, 2011).

A fim de evitar possíveis danos à saúde, órgãos reguladores dos Estados Unidos e da comunidade Europeia tem procurado estabelecer limites de valores para substâncias migrantes utilizadas a nível industrial (CRUZ et al., 2011). No Brasil, o órgão responsável é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que determina a quantidade máxima e o limite de

migração específico de aditivos utilizados na produção de embalagens plásticas destinadas ao contato direto com alimentos (BRASIL, 2008).

Entretanto, ainda existem importantes considerações a respeito da segurança toxicológica do uso de embalagens que entram em contato direto com os alimentos (RHIM; PARK; HA, 2013). Nesse sentido, o ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro passo para rastrear e avaliar a biocompatibilidade de materiais através de procedimentos simples, reprodutíveis e padronizados. Após comprovada a biocompatibilidade, os experimentos podem ser reproduzidos em animais (FERNÁNDEZ; CARVAJAL; PÉREZ, 2009).

Poder limitar o número de variáveis experimentais, obter dados significativos em um curto período de tempo, fornecendo resultados preliminares da interação entre a amostra e a matriz biológica, são vantagens do emprego de métodos *in vitro* em análises toxicológicas. (ROGERO et al., 2003). No entanto, para que um método forneça resultados confiáveis, é preciso que ele seja normalizado e cumpra requisitos pré-estabelecidos, objetivando assegurar a confiabilidade dos dados. Para esta finalidade são delineados procedimentos de validação no processo desenvolvido, a fim de garantir a qualidade das medições efetuadas através da sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade (PASCHOAL et al., 2008).

A validação de procedimentos contribui para a eficiência das descobertas científicas, minimiza erros de análise e satisfaz os requisitos de qualidade das agências regulatórias (ALENCAR et al., 2004; SILVA et al., 2015). A validação se faz necessária quando há implementação de novos métodos analíticos ou quando são alteradas etapas de métodos já validados (AOAC INTERNATIONAL, 2002).

A determinação dos parâmetros utilizados para a validação de um método pode variar de acordo com a técnica analítica empregada, ou com o protocolo de validação a ser seguido. No intuito de padronizar estes procedimentos, em 1990, a Conferência Internacional sobre Harmonização, organizada pelos países da União Europeia, Japão e Estados Unidos, elaborou um guia sobre validação de métodos, *Guidance for Industry Q2A: Text on Validation of Analytical Procedures*, que tem sido utilizado em diversas áreas de estudo (RIBEIRO; FERREIRA, 2008). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária atualizou recentemente o manual de validação para métodos analíticos e ensaios biológicos, a RDC 166/2017 (BRASIL, 2017).

É importante salientar que cada técnica analítica possui características próprias, que variam de substância a substância, logo, a escolha dos parâmetros a serem avaliados na

validação depende do tempo de análise, do custo da análise, da disponibilidade de matriz e do tipo de método avaliado (SHAH, 2007).

A escolha de uma metodologia analítica adequada é de fundamental importância para a análise dos riscos gerados por contaminantes na cadeia alimentar humana. A obtenção de resultados experimentais evidentes e seguros, e o desenvolvimento e validação de novos métodos para esta finalidade tem impacto direto na prevenção de agravos a saúde (SZCZEPAŃSK; KUDŁAK; NAMIEŚNIK, 2018). Devido à diversidade de funções das embalagens alimentícias e as diversas propriedades físico-químicas dos produtos armazenados, a escolha dos seus constituintes é uma questão muito complexa, exigindo o conhecimento científico de uma gama de materiais (ARVANITOYANNIS; KOTSANOPOULOS, 2014).

Portanto, é importante monitorar constantemente a influência do material de embalagem na qualidade dos produtos armazenados, bem como intensificar os esforços para desenvolver novas ferramentas analíticas e bioanalíticas, permitindo a identificação quantitativa e qualitativa de substâncias nocivas a saúde do consumidor. Nesse sentido, o presente trabalho propõe validar métodos bioanalíticos que avaliam de forma preliminar a toxicidade *in vitro* de embalagens alimentícias convencionais e materiais poliméricos utilizados em sua composição.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Este trabalho teve por objetivo otimizar e validar métodos bioanalíticos de forma a comprovar sua adequabilidade para a avaliação preliminar da toxicidade *in vitro* de embalagens alimentícias convencionais e materiais poliméricos utilizados em sua composição.

Objetivos Específicos

- Aperfeiçoar técnicas *in vitro* de avaliação da citotoxicidade e reatividade biológica em fibroblastos, originalmente propostas para avaliação de materiais plásticos de aplicação farmacêutica, visando sua aplicação no estudo preliminar da inocuidade de materiais poliméricos destinados ao uso em embalagens alimentícias, porém utilizando células de epitélio intestinal CACO-2.
- Validar os ensaios de citotoxicidade por contato direto e por difusão em Agar (contato indireto) por meio de parâmetros descritos na RDC 166º/2017 aplicáveis ao estudo.
- Embasar, por meio de resultados obtidos, a utilização das metodologias validadas na avaliação prévia da citotoxicidade de embalagens alimentícias e componentes utilizados em sua fabricação.
- Aprimorar o controle de qualidade dos materiais de embalagem e/ou seus componentes, cuja avaliação normalmente se restringe apenas às características físico-químicas, contribuindo assim com o uso seguro destes materiais.

CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA

REVISÃO DE LITERATURA

1. Embalagens alimentícias

As primeiras embalagens utilizadas em tempos passados eram constituídas de matérias primas distintas, a exemplo de, escamas, peças ocas de madeira, louças de barro e pele de animais (CUTTER, 2002). Esses materiais funcionavam razoavelmente bem, uma vez que existiam métodos de conservação como salga, defumação, secagem ou fermentação que auxiliavam na manutenção da integridade do alimento acondicionado (CASTRO; POUZADA, 2003).

Com o passar do tempo foram descobertos novos materiais que poderiam ser utilizados como matéria-prima para a confecção de embalagens. Assim, vidro, papel, metais e plásticos começaram a ganhar espaço nesse cenário. Concomitante, pesquisas sobre processos tecnológicos mais avançados com o intuito de melhorar o acondicionamento e a proteção do alimento contra possíveis agentes externos foram iniciadas (FABRIS; FREIRE; REYES, 2006; BRAGA; PERES, 2008; GONÇALVES; PASSOS; BIEDRZYCKI, 2008; BRODY et al., 2008; SILVA, 2015).

Com características que combinam baixo custo, baixo peso e boa resistência, os polímeros sintéticos derivados do petróleo assumiram uma grande importância econômica e social no cenário da produção de embalagens para o acondicionamento de alimentos (NOGUEIRA, 2012). Sua composição também é bastante variada, devido à mistura de diferentes polímeros e a inclusão de aditivos para a melhoria de propriedades físico-químicas durante o processamento (RHIM; PARK; HA, 2013).

As embalagens plásticas possuem como principal matéria-prima a nafta derivada do óleo bruto, e o gás natural, ambos provenientes do petróleo (CARDOSO et al., 2011; HERNANDEZ et al., 2000). Dentre os materiais mais utilizados na confecção de embalagens destacam-se, o polietileno (PE), polipropileno (PP) e o poli(tereftalato de etileno) (PS) (SHAH et al., 2015; FRANCHETT; MARCONATO, 2006).

O polipropileno é um termoplástico poliolefínico que possui uma excelente combinação de propriedades térmicas e mecânicas associadas ao baixo custo, sendo bastante utilizado em embalagens para alimentos e em outras utilidades domésticas (NOGUEIRA, 2012). O policloreto de vinila comumente reconhecido por PVC é pertencente ao grupo químico dos vinílicos e em sua composição pura é bastante rígido apresentando ampla

aplicação industrial, porém, possui como um grande problema a existência de toxicidade do monômero (cloreto de vinila), principalmente em processos de migração de substâncias da embalagem para o alimento acondicionado (JORGE, 2013).

Os polietilenos são obtidos pela polimerização do etileno e possuem composição molecular simples, sendo basicamente um hidrocarboneto linear ou ramificado, saturado de alto peso molecular. Os principais são, PEAD (polietileno de alta densidade), PEBD (polietileno de baixa densidade), PEBDL (polietileno de baixa densidade linear), PEMD (polietileno de média densidade) e PEUAMM (polietileno de ultra-alta massa molar (JORGE, 2013). Atualmente, polímeros sintéticos como o polietileno e polipropileno são os mais empregados como matrizes para o desenvolvimento de embalagens comercializadas em diversos setores (NOGUEIRA, 2012).

No entanto, a intensa produção desses materiais ao longo dos anos vem produzindo um grande número de resíduos sólidos não biodegradáveis gerando problemas ambientais consideráveis, aliado a isso, a dependência de recursos petrolíferos para sua produção requer o desenvolvimento de vias alternativas para a obtenção de polímeros ecologicamente sustentáveis (KUMAR et al., 2010). Tais problemas têm motivado o desenvolvimento e aplicação de resinas poliméricas produzidas a partir de fontes biodegradáveis e renováveis (ARVANITTOYANNIS; KOTSANOPOULOS, 2014).

Proveniente de fontes renováveis ou petrolíferas os biopolímeros ou bioplásticos, podem ser produzidos por síntese convencional, biotecnológica, pela ação de microorganismos, e por misturas (blendas) de diferentes fontes e métodos de produção (BRITO et al., 2011). Em sua maioria, são biodegradáveis ao serem expostos à condições ideais de descarte, tornando-se fragmentos moleculares de fácil digestão para fungos e bactérias. Desta forma, os benefícios da sua utilização representam um ganho ambiental que favorece aspectos econômicos e sociais (RAMIRES, 2010).

Apesar de todas as vantagens citadas, os biopolímeros possuem limitações técnicas que dificultam seu uso como produto final. Em sua forma pura são menos estáveis, apresentando propriedade de barreira inferior à dos polímeros convencionais e baixa resistência à temperatura e umidade, por esse motivo podem necessitar de mais aditivos durante o seu processamento (WONG; SHANKS; HODZIC, 2004; HUNEAULT; LI, 2007; RHIM; HONG; HÁ, 2009; BALAKRISHNAN et al., 2010).

2. Migração de substâncias

Apesar de toda conveniência oferecida pelo sistema de embalagens, a comunidade científica têm levantado muitas questões sobre a segurança alimentar e os riscos causados por componentes desse sistema (ALMEIDA et al., 2015). Dentre as interações que podem ocorrer entre alimento e materiais plásticos destacam-se as migrações de substâncias de baixo peso molecular e monômeros dispersos na matriz polimérica (RHIM; PARK; HA, 2013; SHAHBAZIKHAH et al., 2011).

Silva, et al. (2007) consideram que todos os polímeros permitem processos de transporte de massa tais como permeação, migração e sorção, por tanto, esses materiais não podem ser considerados inertes ou inócuos a saúde do consumidor. O termo migração é descrito como um processo de difusão, que pode ser influenciado pelas interações entre componentes do alimento e o material da embalagem (WAGNER; OEHLMANN, 2009).

Os fatores que podem influenciar a migração de contaminantes incluem, a difusão da substância na matriz polimérica, sua solvatação na interface polímero alimento, a dispersão da substância na matriz alimentícia, tempo e temperatura de contato durante o armazenamento (FREIRE, et. al, 2008). Além disso, características físico-químicas do alimento podem aumentar consideravelmente a mobilidade de substâncias dispersas, acentuando a migração de agentes químicos para o alimento acondicionado (SILVA et al., 2006; SHAHBAZIKHAH et al., 2011).

Devido à exposição crônica, a migração é considerada um assunto de saúde pública, sendo estabelecidos regulamentos e resoluções para o controle das substâncias utilizadas na produção de materiais plásticos, refletindo assim, a preocupação dos órgãos de regulamentação frente aos possíveis problema ocasionados por essa exposição (FREIRE et al. 2008; FORTUNATI, et al. 2013).

O regulamento publicado pela comunidade europeia (EC 10/2011) faz um rigoroso controle no uso de monômeros e aditivos utilizados na produção de materiais plásticos, e multicamadas destinadas ao contato com alimentos, bem como de produtos intermediários e subprodutos formados durante o processo de fabricação.

No Brasil, a RDC 17º/2008 aprova o regulamento técnico sobre a lista positiva de aditivos para materiais plásticos, destinados à elaboração de embalagens para o contato direto com alimentos, a qual relaciona as substâncias aprovadas para uso e o limite de migração específica (LME), baseado no valor de ingestão diária aceitável ou tolerável (IDA ou IDT) de cada substância adicionada ao processo. O que determina o limite máximo de cada substância

migrante no alimento são as características específicas de cada aditivo, como tamanho da molécula, polaridade e o nível de toxicidade (COLTRO; MACHADO, 2011).

A pesar do comprovado efeito migratório, poucos estudos têm sido realizado para avaliar os problemas associados a este efeito. Sabe-se que algumas substancias que apresentam essa característica são biologicamente ativas no organismo humano ou no ambiente onde são liberadas (REIJNDERS, 2006; LI; HUANG, 2008; RESTUCCIA et al., 2010).

3. Implementação dos métodos de análise citotóxica.

Considerando que a segurança toxicológica do sistema de embalagens ainda necessita de estudos que comprovem a sua inocuidade do sistema de embalagens, faz se necessário o desenvolvimento de ensaios biológicos para a avaliação prévia de possíveis substâncias com ação tóxica frente a amostras biológicas de forma rápida, econômica e segura. Ensaio de biorreatividade *in vitro* são úteis para essa avaliação, pois são frequentemente mais sensíveis aos agentes tóxicos da amostra, apresentam correlação com ensaios *in vivo* e têm como principal vantagem a obtenção de dados significativos de forma mais objetiva em um curto período de tempo (ROGERO et al., 2003; CUI et al., 2005).

De acordo com Judson e colaboradores (2013) na última década, os testes de toxicidade utilizados para avaliação dos mais diversos compostos destinados ao uso humano, estão passando por uma mudança radical. Os ensaios estão utilizando cada vez menos animais e passando a serem executados *in vitro* com células humanas e se concentram na avaliação de perturbações das vias biológicas fundamentais (HAMADEH et al., 2002; BALLATORI et al., 2003; BRADBURY et al., 2004; REYNOLDS, 2005; DIX et al., 2007; DOULL et al., 2007; COLLINS et al., 2008; HARTUNG, 2009; GOHLKE et al., 2009; ZHOU et al., 2009; BERG et al., 2010; SINGH et al., 2010; STOKES; WIND, 2010a; STOKES; WIND, 2010b). Essa mudança tem como fatores principais o elevado custo dos ensaios *in vivo* que necessitam um grande número de animais sem a garantia de resultados confiáveis, portanto inadequados frente ao crescente número de amostras a serem testadas; e a incapacidade dos testes *in vivo* em permitir a elucidação dos mecanismos envolvidos nas vias de toxicidade, vantagem esta que é oferecida pelos ensaios *in vitro*, capazes de sondar diretamente genes, células e tecidos humanos (KAVLOCK et al., 2009; JUDSON et al., 2013).

Métodos que avaliam a biocompatibilidade *in vitro* de materiais plásticos para uso médico-hospitalar foram padronizados utilizando culturas celulares de diferentes tecidos.

Basicamente consistem em possibilitar o contato do material de forma direta ou indireta com cultura de células analisando alterações por diferentes mecanismos, entre os quais, a incorporação de corantes vitais, inibição do crescimento, mudança da morfologia celular e morte (ISO, 2007; 2009; ASTM, 2006; 2007; BRASIL, 2010; USP, 2015).

Alguns institutos internacionais como a *American Society for Testing and Materials* (ASTM) e a *International Organization for Standardization* (ISO), disponibilizam procedimentos padronizados para o estudo da citotoxicidade de materiais poliméricos de uso médico-hospitalar, odontológico e farmacêutico em cultura de fibrolastos L929 (ASTM, 2006; 2007; ISO, 2007; 2009). A Farmacopeia Americana (USP, 2015) e a Brasileira (BRASIL, 2010) também já possuem metodologias *in vitro* oficiais para a avaliação preliminar da reatividade biológica destes materiais utilizando a mesma cultura de fibroblastos.

No entanto, a aplicabilidade de métodos oficiais para a avaliação de alguns materiais nem sempre se faz possível devido à diversificação de novos produtos no mercado (VALENTINI et al., 2007). Nesse sentido, Machado (2016) propôs metodologias *in vitro* para a avaliação da citotoxicidade de polímeros convencionais e biodegradáveis para uso em embalagens alimentícias, em compostos utilizados na fabricação destes polímeros, bem como na avaliação de embalagens convencionais que têm contato direto com o alimento. Os métodos foram adaptados a partir das técnicas oficiais preconizadas para a avaliação da citotoxicidade de materiais poliméricos de uso médico-hospitalar, porém, substituindo os fibroblastos por linhagem de células do epitélio intestinal humano (CACO-2) de forma a mimetizar o tecido epitelial que entra em contato com substâncias citotóxicas migrantes da embalagem para o alimento acondicionado. Os autores concluíram que as metodologias adaptadas são potencialmente aplicáveis na avaliação preliminar da citotoxicidade destes materiais, podendo contribuir em estudos voltados para a segurança alimentar.

Para a adaptação o autor alterou parâmetros como, dimensão das amostras, concentração da suspensão celular, volume e proporção MEM/ágar utilizados na placa de cultivo e o tipo de célula utilizada. Células Caco-2 (NIH – CCIAL 063) que mimetizam o epitélio intestinal humano substituíram células fibroblásticas de camundongo clone (L929), utilizadas nos métodos originais destinados a amostras poliméricas de uso médico-hospitalar (BRASIL, 2010; USP, 2015). Permitindo assim, a busca de evidências sobre a presença de componentes tóxicos em polímeros de embalagens alimentícias, os quais podem ser

transferidos para os alimentos e assim causar toxicidade em células do aparelho digestivo (MACHADO, 2016).

3.1 Linhagem e cultivo celular

O cultivo celular representa uma importante contribuição para os estudos de absorção, metabolismo ou toxicidade de diferentes substâncias. É o processo pelo qual células são mantidas em condições controladas, que geralmente se assemelham as condições do ambiente de origem (DURING; HARRISON, 2004).

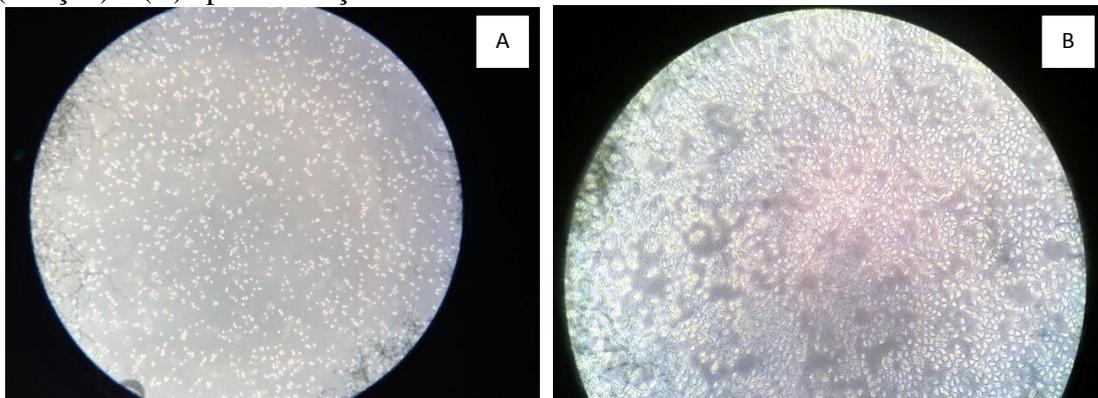
A partir do fragmento de um tecido normal, embrionário ou maligno, obtido por desagregação mecânica ou enzimática, é isolada uma cultura celular primária que apresenta características do tecido de origem e tempo de crescimento limitado (JOHNSTON et al., 2005). À medida que uma cultura de células é repicada para um novo recipiente de cultivo, as células com uma maior capacidade de proliferação permanecem viáveis em detrimento das células que não se adaptaram ao novo ambiente. Esse tipo de célula é chamado de linhagem celular contínua, pois apresenta características do tecido de origem com elevada capacidade de proliferação, mantendo-se no meio de cultura apropriado por um longo período de tempo (MORAES et al., 2007).

As células de tecidos rígidos são aderentes e dependentes uma superfície de contato para que possam iniciar a sua proliferação. Entretanto, células não aderentes derivadas de tecidos que não necessitam de ancoragem para proliferar e sobreviver, podem ser cultivadas em suspensão (MOLINARO, 2010). O modelo do adenocarcinoma de cólon humano (Caco-2) corresponde a células aderentes e contínuas, quando cultivadas em condições específicas, tornam-se diferenciadas e polarizadas de modo que seu fenótipo morfológicamente e funcionalmente, se assemelha aos enterócitos, mimetizando o epitélio gastrointestinal humano. (JOHNSTON et al., 2005; JUSTICE; BADR; FELDER, 2009; ASTASHKINA; MANN; GRANGER, 2012).

Desde a sua descoberta, a linhagem (Caco-2) é utilizada em bioensaios com objetivo de avaliar respostas da mucosa gastrointestinal frente à exposição de diferentes substâncias. (MATEOS, 2011). A análise da biocompatibilidade a nível celular é realizada por meio da formação de uma monocamada de células aderentes que entram em contato direto ou indireto com amostras biorreativas, a resposta citotóxica gerada pelo material avaliado é feita pela observação de características estruturais, crescimento e viabilidade de células expostas aos agentes agressores da amostra (ROGERO et al., 2003; BRASIL, 2010).

A preparação das células para formação da monocamada requer um período de cultivo celular de alguns dias, com condições ambientais favoráveis ao seu crescimento e desenvolvimento (DENG, et al. 2013). Fatores como temperatura, disponibilidade de nutrientes, tempo e intervalo de repiques, podem influenciar o crescimento e formação da monocamada (GONÇALVES, 2010). As células Caco-2 são cultivadas em atmosfera úmida e modificadas com 5% de CO₂ a 37°C, nutridas com (MEM) acrescido de soro fetal bovino (SFB), anfotericina e penicilina (MATEOS, et al. 2011).

Figura 1. Fotomicrografia (100x) de células Caco-2 (A) no primeiro estágio de crescimento (fixação) e (B) após formação da monocamada celular de células Caco-2.



Fonte: próprio autor.

Devido às características estruturais e funcionais *in vitro* semelhantes ao epitélio normal, as células Caco-2 também são utilizadas em metodologias aceitas oficialmente pela *Food and Drug Administration* (FDA) para estudos de absorção e permeabilidade de fármacos. (FERREC et al., 2001; YAMASHITA et al., 2002; JUSTICE; BADR; FELDER, 2009; ASTASHKINA; MANN; GRANGER, 2012). Ensaios *in vitro* possibilita utilização de células humanas de diferentes tecidos, podendo ter a mesma origem das células ou tecidos que entram em contato com os produtos ou substâncias avaliadas quando estudadas *in vivo*

Nos ensaios de citotoxicidade uma grande variedade de células são frequentemente utilizadas, destacam-se células epiteliais da córnea, células pulmonares, células renais caninas, células hepáticas de rato (RL4) e a linhagem celular L929, oriunda de fibroblastos de camundongos, esta última linhagem é indicada nos protocolos ISO, ASTM e Farmacopeicos para o estudo da biorreatividade de polímeros utilizados em ambientes médico-hospitalares (GAD; McCORD, 2008). O controle do ambiente, a homogeneidade da amostra e a economia são as principais vantagens da técnica *in vitro*, quando comparada ao uso de animais em

experimentos utiliza um procedimento simples, reprodutível e padronizado (FERNÁNDEZ; CARVAJAL; PÉREZ, 2009; BIAGINI, 2014).

Entretanto, o desempenho analítico de novas metodologias implementadas necessita ser devidamente avaliado, objetivando assegurar a confiabilidade de dados obtidos pelo novo sistema (KREUTZ, 2017). Desse modo, a validação de métodos é um processo fundamental para confirmar resultados obtidos em uma matriz biológica e fornece ao pesquisador uma maior confiabilidade experimental (GONZÁLEZ et al., 2014).

4. Validação: ensaios convencionais versus bioensaios alternativos

Para que um método de análise forneça resultados seguros, é preciso que ele seja normalizado e cumpra requisitos que garantam boas respostas. A validação é fundamental para garantir tais características, seu objetivo é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida. Se faz necessária, quando há implementação de novas metodologias ou quando se altera etapas de métodos já consolidados e considerados como de referência (AOAC INTERNATIONAL, 2002; ALENCAR et al., 2004; SILVA et al., 2006; KREUTZ, 2017).

A necessidade de validar ensaios analíticos e o desenvolvimento de padrões gerais para a sua conduta trouxe melhorias significativas nos métodos analíticos em geral, bem como nos estudos em farmacocinética, biodisponibilidade e bioequivalência (SHAH, 2007). Dentre os vários protocolos que definem parâmetros de validação a serem aplicados em métodos analíticos e bioanalíticos, os guias disponibilizados pelo ICH (*The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*) são os mais reconhecidos. O ICH desenvolve seus protocolos em parceria com os representantes da comunidade científica, das indústrias e agências regulatórias mundiais, entretanto, para metodologias analíticas baseadas em bioensaios, a depender da sua finalidade e características, esses documentos não são completamente aplicáveis quanto à forma como a validação deve ser conduzida (FDA, 2001; OJEC, 2002; CASSIANO et al., 2009; BRASIL, 2017).

O guia de validação do ICH (2005) é direcionado aos procedimentos analíticos, como os testes de identificação, de quantificação de impurezas, testes limite para o controle de impurezas e testes quantitativos do ativo ou outros componentes presentes na matéria-prima ou no produto acabado. Define a necessidade de avaliar a exatidão, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), especificidade, limite de detecção e quantificação, linearidade e faixa

de trabalho, porém não faz menção a ensaios de natureza biológica e estabelece que, devido à sua natureza complexa, os métodos analíticos para produtos biológicos e biotecnológicos podem ser abordados de forma diferenciada ao que orienta o referido documento.

A recente resolução 166/2017 da ANVISA segue os princípios do guia ICH e estabelece, em caráter nacional, os critérios que devem ser observados na validação de métodos analíticos destinados a medicamentos, produtos biológicos e demais insumos farmacêuticos. Define ainda que os parâmetros de validação e seus critérios de aceitação devem ser definidos conforme as características do analito e natureza do método. Admite claramente o uso de abordagens alternativas para a validação de ensaios biológicos e imunológicos e exclui do seu escopo os métodos microbiológicos, determinando as farmacopeias como referência para tais (BRASIL, 2017).

De uma forma geral, estes protocolos e guias definem os seguintes parâmetros a serem validados em métodos analíticos e bioanalíticos convencionais:

4.1 Seletividade

A seletividade corresponde à habilidade do método em identificar ou quantificar um analito de componentes que possam estar presentes na amostra (ROZET et al., 2007; IUPAC, 2002). Para métodos qualitativos, deve-se demonstrar a capacidade de obter resultados positivos para amostras que contenham o analito, e resultados negativos para substâncias estruturalmente semelhantes ao analito tais como, metabólitos, impurezas, compostos de degradação ou componentes da matriz (BRASIL, 2017; IUPAC, 2002; FDA, 2013).

Bansal e Destefano (2007) descrevem a seletividade aplicada a métodos bioanalíticos como sendo a identificação de possíveis alterações causadas pela substância em estudo sobre o modelo biológico empregado, diferenciando essa resposta para as alterações causadas por outros fatores presentes na amostra ou pela presença de um controle negativo incorporado ao método em questão. Em tais casos, o método só é considerado válido quando a seletividade for corretamente avaliada, juntamente com outros parâmetros definidos pelo guias e protocolos e ressaltam que, caso a seletividade de um determinado método não seja assegurada, a linearidade, exatidão, e precisão estarão seriamente comprometidos.

4.2 Linearidade

É a capacidade do método em demonstrar resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra dentro de um intervalo de concentração específico. Para a sua determinação recomenda-se, no mínimo, cinco concentrações diferentes das soluções

preparadas em triplicatas (ICH, 2005; BANSAL; DESTEFANO, 2007; BAJERSKI, et al. 2014; BRASIL, 2017).

De acordo com a RDC^o 166/2017, a linearidade dos resultados é avaliada através de um conjunto de dados obtidos por modelos matemáticos. No entanto, o que geralmente se expressa como análise desse parâmetro em estudos sobre validação de métodos bioanalíticos, é o modelo de regressão linear simples, aliado à análise do coeficiente de correlação e determinação das variáveis (LIMA et al., 2006; ARAUJO, 2009).

O estudo da linearidade feito pelo modelo de regressão linear simples, pressupõe a existência de um conjunto de pontos com uma tendência regular que pode ser representado por uma função matemática, normalmente, a função é escolhida através do processo de ajuste conhecido como método dos mínimos quadrados. (BRASIL, 2017). Dessa forma, é estabelecida uma tendência da variável dependente (y) em função da variável independente (x), que para uma regressão linear pode ser expressa como, $y = ax + b$ onde (a) corresponde ao coeficiente angular da reta e (b) ao coeficiente linear (HOFFMANN, 2015).

O grau de relação entre duas variáveis é representado pela correlação amostral, ela é expressa através do coeficiente de correlação de *Pearson* (r) que demonstra a correlação direta ou inversamente proporcional entre as variáveis estudadas (CARGNELUTTI FILHO; STORCK, 2009; FILHO; JUNIOR, 2009). O coeficiente de correlação (r) apresenta uma faixa de magnitude entre ($-1 \leq r \leq 1$), quanto mais próximo do valor positivo a correlação entre os dados avaliados é diretamente proporcional, quando o resultado expressa um valor negativo indica correlação inversamente proporcional entre as variáveis X e Y, sendo considerada ausência de correlação entre variáveis quando o coeficiente (r) assume o valor nulo dentro da faixa de referência (HOFFMANN, 2016). O coeficiente de determinação (R^2) corresponde ao percentual de variação (y) que é explicado pela variação de (x). Seu valor deve ser interpretado de maneira semelhante ao valor de (r) utilizando a mesma faixa de magnitude para sua classificação (MARTINS, 2014).

4.3 Precisão

A precisão é o grau de concordância entre os resultados de cada teste, quando aplicado repetidamente a várias amostragens, com amostra preparadas de maneira independente. Avalia a proximidade entre os resultados obtidos e deve ser expressa por meio da repetibilidade, precisão intermediária (intra- dia e inter- dias) ou da reprodutibilidade (ICH,2005; VALENTINI; SOMMER; MATIOLI, 2007; BRASIL, 2017).

A Repetibilidade é feita pela avaliação das amostras sob as mesmas condições de operação, mesmo analista e instrumentação. Para sua avaliação recomenda-se, no mínimo nove determinações no total, contemplando o intervalo linear do método analítico previamente determinado, sendo três concentrações diferentes (baixa, média e alta) da amostra. Ou seis réplicas a 100% da concentração do teste preparadas individualmente (ICH, 2005; FDA, 2015; BRASIL, 2017).

A determinação da precisão intermediária intra-dia avalia a concordância entre os resultados obtidos no mesmo período, com o mesmo laboratório e analista, diferentemente da precisão inter-dia a qual deve expressar a proximidade entre os resultados obtidos no mesmo laboratório, em pelo menos dois dias diferentes, realizada por operadores distintos contemplando as mesmas concentrações e número de determinações descritos na avaliação da repetibilidade. Já a reprodutibilidade demonstra a proximidade dos resultados obtidos em diferentes laboratórios, é aplicável em estudos colaborativos ou na padronização de métodos analíticos para inclusão desses em compêndios oficiais (FDA, 2013; BRASIL, 2017).

A interpretação dos resultados para a análise da precisão é realizada pelo cálculo do desvio padrão relativo (DPR%), obtido segundo a fórmula $DPR = \left(\frac{DP}{CMD} \right) \times 10$ em que (DP) é o desvio padrão da série de medições, e (CMD) a concentração média estipulada para o método (CARGNELUTTI FILHO; STORCK, 2007; RESENDE; DUARTE, 2007, FDA, 2013; BRASIL 2017). Os critérios de aceitação devem ser definidos e justificados de acordo com os seguintes aspectos, objetivo do método, variabilidade intrínseca, concentração de trabalho e concentração do analítico na amostra (BRASIL, 2017).

4.4 Robustez

A robustez de um método analítico mede sua suscetibilidade frente a pequenas variações que podem ocorrer durante as análises de rotina, este parâmetro é de fundamental importância para identificar os fatores que devem ser estritamente controlados durante a execução do método (FDA, 2013). Sua análise foi originalmente introduzida para evitar problemas em estudos interlaboratoriais, assim como acontece na reprodutibilidade, porém, identificando fatores potencialmente responsáveis pela ocorrência de resultados divergentes durante o estudo (EMEA, 2011).

Os fatores a serem investigados em um teste de robustez estão relacionados aos aspectos operacionais e ambientais, e podem ser quantitativos ou qualitativos (HEYDEN et al. 2001). A avaliação desse parâmetro envolve diferentes etapas que perpassam pelo

planejamento e a execução da montagem experimental, as quais estabelecem as alterações experimentais e a estimativa dos efeitos causados ao sistema de análise (VAART, et al. 1992).

Segundo a RDC 166 (BRASIL, 2017), para métodos quantitativos, o impacto das variações propostas deverá ser avaliado com os mesmos critérios utilizados para a avaliação da exatidão. Em métodos de caráter qualitativo deve-se observar se as variações propostas interferem na resposta analítica esperada. Caso haja suscetibilidade do método à variação nas condições analíticas, essas deverão ser controladas por meio de precauções descritas no método.

Devido a possibilidade de reprovação experimental, a robustez foi considerada um tópico da validação realizado durante a fase de desenvolvimento e otimização do método. Desta forma, os fatores que podem prejudicar o desempenho do experimento são descobertos e observados mais rigidamente durante a sua execução (HEYDEN, et al. 2001).

4.5 Exatidão

A exatidão de um método analítico deve ser obtida por meio do grau de concordância entre os resultados individuais do método estudado em relação a um valor aceito como verdadeiro. Pode ser estimada de duas formas, aplicando-se a metodologia proposta em uma substância de pureza conhecida, como por exemplo, padrões certificados, ou pela comparação com os resultados obtidos de uma segunda metodologia bem estabelecida, com exatidão e precisão conhecida (CASSIANO et al. 2009; BRASIL, 2017).

Por outro lado, a abordagem de validação para bioensaios *in vitro* convencionais e alternativos deve ser diferente daquela exigida para os demais métodos analíticos, a começar pelo fato de que é improvável que qualquer ensaio *in vitro* produza o resultado “perfeito”. Mesmo em ensaios mecanicamente semelhantes espera-se algum grau de discordância devido à complexidade dos processos biológicos e às interferências específicas de qualquer substância química sobre o teste (JUDSON et al., 2013).

Ensaio de biocompatibilidade *in vitro* podem medir a interação biológica, bioquímica ou fisiológica a nível celular gerando interpretações qualitativas e quantitativas, essas características influenciam na escolha dos parâmetros a serem avaliados durante o processo de validação, bem como no processo de avaliação utilizado em cada parâmetro (SHAH, 2007).

Hartung (2009) afirma que cientistas operantes no campo da pesquisa analítica muitas vezes não entendem a extensão do trabalho e o tempo necessário para realizar um estudo de validação para fins de avaliação de segurança toxicológica, pois segundo seu entendimento, a

validação de métodos convencionais está baseada na confirmação de que as medições estão corretas, porém, o foco da validação de métodos alternativos é avaliar se o parâmetro correto está sendo medido e verificar para quais amostras ele é aplicável.

Judson e colaboradores (2013) avaliaram as perspectivas dentro do cenário regulatório na validação de bioensaios *in vitro* de alto rendimento que possibilitam testar simultaneamente centenas de substâncias químicas na triagem de compostos tóxicos. Os autores definem que diferentemente dos métodos tradicionais que geram pontos finais observáveis ou apicais, a validação destes bioensaios deve ter uma abordagem alternativa com foco na capacidade que os compostos sob estudo têm de desencadear eventos bioquímicos chave ou a formação dos intermediários biológicos das vias de toxicidade associadas aos efeitos adversos à saúde.

Dado o alto ônus da prova geralmente exigida pelas revisões e decisões regulatórias aplicadas à proteção da saúde pública, há relutância por parte da comunidade regulatória em discutir abordagens de validação alternativa mais flexíveis. Isso é parcialmente motivado pela visão de que se o processo de validação não for completo, longo (multi-anual) e de alto custo poderá haver um comprometimento inaceitável na sua qualidade. No entanto, a adesão a esse padrão rigoroso exclui efetivamente o uso de um grande número de ensaios *in vitro* de alto rendimento, atualmente empregados na triagem de compostos tóxicos, os quais são a única forma prática para avaliar milhares de substâncias químicas ainda não testadas (JUDSON et al., 2013).

O Comitê de Coordenação Interinstitucional para Validação de Métodos Alternativos – ICCVAM, em seu guia sobre validação e aceitação regulatória de métodos de ensaios toxicológicos, incluindo os denominados “alternativos” que buscam a substituição, redução ou refinamento do uso de animais, define que a validação e a aceitação regulatória de métodos alternativos deve ser similar a de outros métodos de ensaio. No entanto, declara que é necessário haver flexibilidade na avaliação de tais métodos, dado seu propósito e o conjunto de dados que o suporta (ICCVAM, 1997, 2003).

Validação é o processo pelo qual a confiabilidade e a relevância do método de ensaio são avaliadas com a finalidade de recomendá-lo a um uso específico (BALLS et al., 1990a,b; OECD, 1990). Um teste é considerado validado quando suas características de desempenho, vantagens e limitações forem adequadamente determinadas para uma finalidade específica.

De acordo com o ICCVAM (1997), a medição da confiabilidade e relevância de um ensaio são estágios independentes na validação de um método de ensaio alternativo. A

confiabilidade é uma medida objetiva da sua reprodutibilidade. Se não for suficientemente confiável, não poderá ser usado para o propósito pretendido. A relevância de um ensaio alternativo de toxicidade pode estar associada ao mecanismo do efeito tóxico que este mede e o seu propósito de uso. A medida da relevância inclui o cálculo das características operacionais ou coeficientes de correlação derivados estatisticamente, e a determinação da associação entre os efeitos mensurados com os eventos tóxicos de interesse. Não há níveis ótimos ou mínimos de reprodutibilidade ou associação com o evento de interesse a serem alcançados para que um ensaio alternativo seja considerado validado. As condições sob as quais o ensaio será usado e os propósitos para os quais seus resultados serão aplicados determinarão os níveis de confiabilidade e relevância necessários.

Os critérios para a validação de um método de ensaio alternativo são definidos, até certo ponto, em função da finalidade para a qual o método se destina. Por exemplo, casos que o mecanismo do efeito é conhecido ou relativamente direto (corrosividade da pele, ligação ao receptor de estrogênio), enquanto outros são complexos e multifacetados (ensaio de carcinogenicidade, toxicidade preliminar), ou não são bem compreendidos. A validação de testes para esses diferentes tipos de efeitos requer abordagens diferenciadas caso-a-caso (ICCVAM, 2003).

REFERÊNCIAS

- AOAC INTERNATIONAL . Methods Committee Guidelines For Validation Of Qualitative And Quantitative Food Microbiological Official Methods Of Analysis. 2002.
- ALBUQUERQUEA, C. C. M.; RIBEIROA, S. M. C.; RABELOA, K. R. C.; SIQUEIRAA, G.B.; MARINHAB, S. A. B. A CASTROA, M. A. Aplicações de enzimas na síntese e na modificação de polímeros. **Química Nova**, v. 37, p. 699-708, 2014.
- ALMEIDA, A. C. S.; FRANCO, E. A. N.; PEIXOTO, F. M.; PESSANHA, K. L. F.; MELO, N. R. Aplicação de nanotecnologia em embalagem de alimentos. **Polímeros**,v. 25, p.89-97, 2015.
- ALENCAR, J. R. B.; RAMOS, V. V. S.; MACHADO, B. L.; OLIVEIRA, C. T. A.; MONTEIRO, B. D.; MEDEIROS, M. P .F.; NETO, R. J. P. Validação de limpeza de zidovudina: estratégia aplicada ao processo de fabricação de medicamentos anti-retrovirais. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 40, p. 1-8, 2004.
- ALMEIDA, D.M. Propriedades físicas, químicas e de barreira em filme formados por blenda de celulose bacteriana e fécula de batata. **Polímeros**, v.23, p.538-546, 2013.
- ARAUJO,P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. **Journal of Chromatography B**,v.877, p.2224-2234, 2009.
- ARVANITOYANNIS, I. S.; KOTSAPOULOS, K.V. Migration phenomenon in food packaging. Food-package interactions, mechanisms, types of migrants, testing and relative legislation - A review. **Food Bioprocess Technol.** v.7 p.21–36, 2014.
- ASSIS, L. M.; ZAVAREZE, E. R.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C.; SOARES, S.L. A. Características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, p.99-109, 2012
- ASTASHKINA , A.; MANN,B.; GRAINGER, D.W.A. Critical evaluation of in vitro cell culture models for high-throughput drug screening and toxicity. **Pharmacol Ther**,v.134 p.8106, 2012.
- ASTM Standard F813 - 07, 2007. Standard Practice for Direct Contact Cell Culture Evaluation of Materials for Medical Devices. ASTM International, West Conshohocken, PA, 2003.Disponível em:< www.astm.org DOI: 10.1520/F0813-07 >. Acessado em: 11 de Novembro 2017.

ASTM Standard F895-84, 2006. Standard Test Method for Agar Diffusion Cell Culture Screening for Cytotoxicity. ASTM International, West Conshohocken, PA, 2003. Disponível em: < www.astm.org. DOI: 10.1520/F0895-84R06>. Acessado em : 11 de Novembro 2017;

BAJERSKI, L.; ROSSI, R. C.; DIAS, C. L.; BERGOLD, A. M.; PEDRO EDUARDO FRÖEHLICH, A. E. Development and Validation of a Discriminating In Vitro Dissolution Method for a Poorly Soluble Drug, Olmesartan Medoxomil: Comparison Between Commercial Tablets. **Pharmaceutical Science Technology**, v. 11, p.637–644. 2010.

BALLATORI, N.; BOYER, J.L.; ROCKETT, J.C.; Exploiting genome data to understand the function, regulation, and evolutionary origins of toxicologically relevant genes. **EHP Toxicogenomics**. v.111, p.61–65, 2003.

BALAKRISHNAN, H.; HASSAN, A.; WAHIT, M. U.; YUSSUF, A. A.; RAZAK, S. B. A. Novel toughened polylactic acid nanocomposite: Mechanical, thermal and morphological properties. **Materials & Design**.v 31, p.7, 2010.

BALLS, M., BOTHAM, P., CORDIER, A., FUMERO, S., KAYSER, D., KOETER, H., KOUNDAKJIAN, P., LINDQUIST, N.G., MEYER, O., PIODA, L., REINHARDT, C., ROZEMOND, H., SMYRNIOTIS, T., SPIELMANN, H., VAN LOOY, H., VAN DER VENNE, M.T., & WALUM, E. Report and recommendations of an international workshop on promotion of the regulatory acceptance of validated non-animal toxicity test procedures. **ATLA**, v.18, p.339-344, 1990a.

BALLS, M., BRIDGES, J. & SOUTHEE, J. Animals and alternatives in toxicology: Present status and future prospects. New York: **VCH Publishers**, 1990b.

BANSAL, S.; DESTEFANO, A. Key Elements of Bioanalytical Method Validation for Small Molecules. **The AAPS Journal**, v. 9, p.11, 2007.

BERG, E.L.; YANG, J.;MELROSE, J. Chemical target and pathway toxicity mechanisms defined in primary human cell systems. **J Pharmacol Toxicol Methods**. v.61, p.3–15, 2010.

BIAGINI, S.; COSTA, A.P.; WENDEL, S.; SCHETTINO, G.; AZEVEDO, P. C. L. Validação in vitro e in vivo da viabilidade de eritrócitos suínos estocados para estabelecer um modelo experimental de transfusão homóloga de hemácias: estudo piloto. **Revista Brasileira Terapia Intensiva**. v.26, p.287-291, 2014.

BRAGA, R. L.; PERES, L. Desenvolvimento e caracterização de sachê absorvedor de oxigênio para uso em embalagens alimentícias. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química. 2008. Dissertação (mestrado).

BRASIL, ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. “Resolução n. 17, de 17 de março de 2008. Regulamento técnico sobre lista positiva de aditivos para materiais plásticos destinados à elaboração de embalagens e equipamentos em contato com alimentos”. Diário Oficial União, Brasília, 18 mar. (2008). Sec. I. p. 43-51.

BRASIL. Farmacopeia Brasileira, v.1 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA, 2010.

BRASIL, ANVISA - Agência Nacional De Vigilância Sanitária - “Resolução n. 166, de 24 de julho de 2017. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos”. Diário Oficial União, Brasília, 2017.

BRADBURY, S.P.; FEIJTEL, T.C.; VAN LEEUWEN, C. J. Meeting the scientific needs of ecological risk assessment in a regulatory context. **Environ Sci Technol**. v.38, p.463A– 470, 2004.

BREEMEN, R.B.V.; LI, Y . Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. **Expert Opin Drug Metab Toxicol**, v.1, p.175–185.

BRITO, G. F.; AGRAWAL, P.; ARAÚJO, E. M.; MÉLO, T. J. A. Biopolímeros, Polímeros Biodegradáveis e Polímeros Verdes. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v.6.2 p.127-139, 2011 Disponível em :<www.dema.ufcg.edu.br/revista> Acessado em: 01/07/2017

BRODY,A.L.; BUGUSU,B.;HAN, J. H.; SAND,C.K.; MCHUGH, T.H. Innovate Food Packaging Solutions. **Journal of Food Science**. v.73, p, 107-116, 2008.

CARDOSO,G. A.P.; TANCREDO, C.; MERGEN, I. Z.; DONEDA, R. N.; NOVAES, A. F.; FARIA, D.C. Reciclagem de Embalagens Poliméricas Contendo Filme de Alumínio Metálico Via Processamento Químico. **Polímeros**, v.21, p. 335-339, 2011;

CASTRO, A. G, POUZADA, A. S. Embalagens para indústria alimentar. **Lisboa: Instituto Piaget**, Portugal, 2003, 609p.

CARGNELUTTI FILHO, A.; STORCK, L. Estatísticas de avaliação da precisão experimental em ensaios de cultivares de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, p.17-24, 2007.

CASTILLO, R.; CHIRIBOGA, C.; FONTANILLA, M. Estandarización de un Modelo Basado en Monocapas de Células Caco-2 com Aplicación em Estudios de Absorción de Fármacos. **Revista Colombiana de Ciências Químico Farmacêuticas**, V. 35 p.177-191, 2006.

CASSIANO, M. N.; BARREIRO, C. J.; MARTINS, R. R. L.; OLIVEIRA, V. R.; CASS, B. Q. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, p.1021-1030, 2009.

COLTRO, L.; MACHADO, P. M. Migração Específica de Antioxidante de Embalagens Plásticas para Alimentos. **Polímeros**, v. 21, p. 390-397, 2011.

COMA, V. Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. **Meat Science**, v.78, p.90-103, 2008.

COLLINS FS, GRAY GM, BUCHER JR. Toxicology. Transforming environmental health protection. **Science**, v.319, p.906–907, 2008.

CUI, D.; TIAN, F.; OZKAN, C. S.; WANG, M.; GAO, H. Effect of single wall carbon nanotubes on human HEK293 cells. **Toxicology Letters**, v.155, p. 73-85, 2005.

CUTTER, C.N. Microbial control by packaging: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.42, p.151-161, 2002.

CRUZ, A. S.; OLIVEIRA, C. E.; OLIVEIRA, C. S. F.; GARCIA, S. P.; KANEKO, A. Q. L. M. Polímeros reciclados para contato com alimentos. **Polímeros**, v. 21, p. 340-345, 2011.

DENG, X .; ZHANG, G.; SHEN, C.; YIN, J.; MENG, Q. Hollow fiber culture accelerates differentiation of Caco-2 cells. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 97, p.6943–6955, 2013.

DEJAEGHER, B.; HEYDEN, Y.V. Ruggedness and robustness testing. **Journal of Chromatography A**, v.1158, p.138-157, 2007;

DIX, D. J.; HOUCK, K.A.; MARTIN, M. T. The ToxCast program for prioritizing toxicity testing of environmental chemicals. **Toxicological Science** v. 95, p.5–12, 2007.

DOULL, J.; BORZELLECA, J. F.; BECKER, R. Framework for use of toxicity screening tools in context-based decision-making. **Food Chem Toxicol**. v.45, p.759–796, 2007.

DUNCAN, T. V. Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 363, p. 1-24, 2011.

DURING, A.; HARRISON, E. H. Intestinal absorption and metabolism of carotenoids: insights from cell culture. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 430, p. 77-88, 2004.

DURING, A.; HARRISON, E. H. Intestinal absorption and metabolism of carotenoids: insights from cell culture. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 430, p. 77-88, 2004;

European Union, Commission Regulation N° 10/2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food. **Official Journal of the European Union**. Disponível em < <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2011/10/oj>> Acessado em : 01/07/2018.

EMA - European Medicines Agency - Guideline on bioanalytical method validation. 2011.

FABRIS, S.; FREIRE, A. T. M.; REYES, R. G. F. Embalagens plásticas: tipos de materiais, contaminação de alimentos e aspectos de legislação . **Revista Brasileira de Toxicologia** v.19, n.2 , p.59-70, 2006.

FERNÁNDEZ, G. E.; CARVAJAL, L. I.; PÉREZ, G. A. In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. **Nutrition Research**, v.29, p. 751-760, 2009.

FERREC, E.L.; CHESNE, C.; ARTUSSON, P.; BRAYDEN, D.; FABRE, G.; GIRES, P.; GUILLOU, F.; ROUSSET, M.; RUBAS, W.; SCARINO, M-L. In vitro Models of the Intestinal Barrier. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 46. **ATLA** 29, 2001.

FILHO, F. B. D.; JÚNIOR, S. A. J.; Desvendando os Mistérios do Coeficiente de Correlação de Pearson (r). **Revista Política Hoje**. v. 18, pag. 115- 141, 2009.

FORTUNATI, E.; PELTZER, M.; ARMENTANO, I.; JIMÉNEZ, A.; KENNY, J.M. Combined effects of cellulose nanocrystals and silver nanoparticles on the barrier and migration properties of PLA nano-biocomposites. **Journal of Food Engineering**, v.3, p.25, 2013.

FRANCHETTI, S.M.M., MARCONATO, J.C. Polímeros Biodegradáveis – Uma solução parcial, para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. **Química Nova**, v. 29, p. 811-816, 2006.

FRANZ, R. Migration modelling from food-contact plastics into foodstuffs as a new tool for consumer exposure estimation. **Food Additives Contaminants**.v.22, p.920–937, 2005.

FREIRE, M. T. A.; BOTTOLI, C. B. G.; FABRIS, S. REYES, F. G. Contaminantes voláteis provenientes de embalagens plásticas: desenvolvimento e validação de métodos analíticos. **Química Nova**, v. 31, p.1522-1532, 2008.

FDA - U.S. Food and Drug Administration. **Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation**. Federal Register, v. 44 p. 1503 -1507, 2013.

GAD, S.C.; McCORD, M.G. **Safety Evaluation in the Development of Medical Devices and Combination Products**. 3 ed., Taylor and Francis, New York, 2008.

GAN, L.; THAKKER D. Applications of the Caco-2 Model in the Design and Development of Orally Active Drugs: Elucidation of Biochemical and Physical Barriers Posed by the Intestinal Epithelium. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.23. p.2-6, 1996.

GOHLKE, J.M.; THOMAS, R.; ZHANG, Y. Genetic and environmental pathways to complex diseases. **BMC Systems Biology**. v.3, p.46, 2009.

GONÇALVES, A. A.; PASSOS, M.G.; BIEDRZYCKI, A. Percepção do consumidor com relação à embalagem de alimentos: tendências. **Estudos Tecnológicos** , v. 4,p. 271-283, 2008.

GONÇALVES, J. E. Padronização das Condições para cultura de células Caco-2 visando á obtenção de membranas viáveis ao estudo da permeabilidade *in vitro* da rifampicina. São Paulo: Universidade de São Paulo. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Tese (Doutorado), 2010;

GONZÁLEZ, O.; BLANCO, M. E.; IRIARTE, G.; BARTOLOMÉ, L.; MAGUREGUI, M. I.; ALONSO, R. M. Bioanalytical chromatographic method validation according to current regulations, with a special focus on the non-well defined parameters limit of quantification, robustness and matrix effect. **Journal of Chromatography A**, v. 1353, p. 10–27, 2014.

HAMADEH, H.K.; BUSHEL, P.R.; JAYADEV, S. Gene expression analysis reveals chemical-specific profiles. **Toxicology Sci.** v.67, p. 219–231, 2002.

HARTUNG T. Food for thought on evidence-based toxicology. **ALTEX**. v.26, p.75–82, 2009.

HEYDEN, Y. V.; MASSART, D.L.; HENDRIKS, M.W.B. ; BOER, J.H.; SMILDE, A, K. Robustness of Analytical Chemical Methods and Pharmaceutical Technological Products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.24, p. 79, 2001.

HERNANDEZ, R.J.; SELKE, S.E.M.; CULTER, J.D. *Plastics Packaging: Properties, processing, applications and regulations*. **Munich: Hanser**, C.14, p.313-350, 2000;

HOFFMANN, R. **Análise de regressão: uma introdução à econometria**. Piracicaba, Dados Internacionais de Catalogação na Publicação ESALQ/USP. 2015.

HUNEAULT, M. A.; LI, H. Morphology and properties of compatibilized polycatide thermoplastic starch blends. **Polymeres**, v. 48, 2007.

ICH – INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION. Q2R1- validation of Analytical procedure: Text and Methodology, 2005.

ICCVAM. Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods: A Report of the ad hoc Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM). NIEHS. 1997. NIH Publication N°. 97-3981. Disponível em:

<<http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/guidelines/validate.pdf>> Acessando em: 01/07/2018

ICCVAM. Guidelines for the Nomination and Submission of New, Revised, and Alternative Test Methods. NIEHS. 2003. NIH Publication N°. 03-4508. Disponível em:

<<http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/guidelines/subguide.htm>> Acessado em: 01/07/2018

INTERNATIONAL STANDARD: Biological Evaluation of Medical Devices – Part 5: Tests for Cytotoxicity in vitro methods. ISO 10993-5:2009.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY (IUPAC).

Harmonized guidelines for single- laboratory validation of methods of analysis, v. 74, p. 835–855, 2002

JORGE, N. **Embalagens para alimentos / Neuza Jorge**. – São Paulo : Cultura Acadêmica: Universidade Estadual Paulista, Pró-Reitoria de Graduação, p. 194, 2013.

JOHNSTON,K.; SHARP,P.; CLIFFORD,M.; MORGAN, L. Dietary polyphenols decrease glucose uptake by human intestinal Caco-2 cells. **Federation of European Biochemical Societies**. v.579 p.1653–1657, 2005.

JUDSON, R.; KAVLOCK, R.; MARTIN, M.; REIF, D.; HOUCK, K.; KNUDSEN, T.; RICHARD, A.; TICE, R.R.; WHELAN, M. ; XIA, M.; HUANG, R.; AUSTIN, C.; DASTON, G.; THOMAS HARTUNG, JOHN R. FOWLE, WILLIAM WOOGGE, WEIDA TONG, DAVID DIX. Perspectives on Validation of High-Throughput Assays Supporting 21st Century Toxicity Testing. **ALTEX** 30(1) P. 51–56, 2013.

JUSTICE, B.A.; BADR, N.A.; FELDER, R.A. 3D cell culture opens new dimensions in cell-based assays. **Drug Discov Today**, v.14, p.102– 107, 2009.

KAVLOCK, R.J.; AUSTIN, C.P.; TICE, R.R.; Toxicity testing in the 21st century: implications for human health risk assessment. **Risk Anal**.v. 29, p.485–487. 2009.

KUMAR, M.; MOHANTY, S.; NAYAK, S. K.; PARVAIZ, M. R. Effect of glycidyl methacrylate (GMA) on the thermal, mechanical and morphological property of biodegradable PLA/PBAT blend and its nanocomposites. **Bioresource Technology**, v.101, 2010.

KREUTZ, T. Óleo essencial de casca-preciosa (Aniba canelilla (H. B. K.) Mez): validação de metodologia bioanalítica e estudo de permeação cutânea in vitro. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Farmácia. 2017 Dissertação (Mestrado).

MACIEL, V. B. V.; TELMA T. FRANCO, T. F.; YOSHIDA, P. M. C. Sistemas Inteligentes de Embalagens Utilizando Filmes de Quitosana como Indicador Colorimétrico de Temperatura. **Polímeros**, v. 22, p. 318-324, 2012.

MACHADO, P. A. I. P. Bioensaios para avaliação da citotoxicidade de embalagens alimentícias e componentes utilizados em sua produção. Salvador: Universidade Federal da Bahia : Faculdade de farmácia. 2016. Dissertação (Mestrado).

MARTINS, E. G. Coeficiente de correlação amostral, **Revista de Ciência Elementar**, v.2, p.0069, 2014.

MATEOS, R.; CARO, G.P.; SAHA, S.; CERT, R.; HORCAJO, R. ; BRAVO, L.; KROON, A.P. Acetylation of hydroxytyrosol enhances its transport across differentiated Caco-2 monolayers. **Food Chemistry**, v.12, p.865–872, 2011.

MOHANTY, A. K.; MISRA, M.; DRZAL, L. T.; SELKE, S. E.; HARTE, B. R.; HINRICHEN, H. **Natural Fibers, Biopolymers, and Biocomposites: An Introduction**, Taylor & Francis, 2005.

MOLINARO, E. M. **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**: volume 2 / Organização Etelcia Moraes Molinaro, Luzia Fátima Gonçalves Caputo; Maria Regina Reis Amendoeira. capítulo 5. Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2010. Disponível em < [http://www.fiocruz.br/ioc/media/vol_2\[1\].pdf](http://www.fiocruz.br/ioc/media/vol_2[1].pdf)> em 19/06/2016.

MONDAL, D.; MOLLICK, M. M. R.; BHOWMICK, B.; MAITY, D.; BAIN, M. K.; RANA, D. Effect of poly (vinyl pyrrolidone) on the morphology and physical properties of poly

(vinyl alcohol)/sodium montmorillonite nanocomposite films. **Progress in Natural Science: Materials International**, v.23, p.579-587, 2013.

MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. Tecnologia do cultivo de células animais : de biofármacos terapia gênica. São Paulo: Rocca, 2007. 503 p.

MUNRO, I. C.; HAIGHTON, L. A.; LYNCH, B. S.; TAFAZOLI, S. Technological challenges of addressing new and more complex migrating products from novel food packaging materials. **Food Additives and Contaminants**, v. 26, p.1534-1546, 2009.

NEL, A.; XIA, T.; MADLER, L.; LI, N. Toxic potential of materials at the nanolevel. **Science**, v. 311, p. 622-62, 2006.

NOGUEIRA, R. B. I. Estudo da Produção de Embalagens Plásticas e Desenvolvimento de Testes de Qualidade. Porto: Universidade do Porto. Mestrado Integrado em Engenharia Química. 2012. Dissertação (Mestrado).

LIMA, L. R. XAVIER, S. H.; MEIRA, L. J.; NETO, R. J. P. Desenvolvimento e validação de metodologia de quantificação gravimétrica de resina glicosídica em fitoterápico contendo *Operculina macrocarpa* . **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 16, n. 4, p. 562-567, 2006.

LI, L.H.; HUANG, L. Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles. **Molecular Pharmacology**, v. 5, p. 496–504, 2008.

OFFICIAL JOURNAL OF THE EUROPEAN COMMUNITIES (OJEC). Implementing Council Directive 96/23/ EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, 2002.

PASCHOALINO, M. P.; MARCONE, G. P. S.; JARDIM, W. F. Os nanomateriais e a questão ambiental. **Química Nova**, v.33, p.421-430, 2010.

PASCHOAL, R. A. J.; RATH, S.; AIROLDI, S. P. F.; REYES, R. G. F. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, v.31, p.1190-1198, 2008.

RAPTOPOULOU, K.G; PASIAS, I. N.; THOMAIDIS, N. S.; PROESTOS,C. Study of the migration phenomena of specific metals in canned tomato paste before and after opening. Validation of a new quality indicator for opened cans, **Food Chem. Toxicol.** v.69 p. 25–31, 2014.

RAMIRES, E. C. Biocompósitos a partir de matrizes poliméricas baseadas em lignina, tanino e glioxal reforçadas com fibras naturais. Tese de Doutorado. Instituto de Química - Universidade de São Paulo, 2010.

REYNOLDS, V. L. Applications of emerging technologies in toxicology and safety assessment. **Int J Toxicol**. v.24, p.135–137, 200

RESENDE, M.D.V.; DUARTE, J.B. Precisão e controle de qualidade em experimentos de avaliação de cultivares. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.37, p.182-194, 2007.

RESTUCCIA, D.; SPIZZIRRI, U.G.; PARISI, O.I.; CIRILLO, G.; CURCIO, M.; IEMMA, F.; PUOCI, F.; VINCI, G.; PICCI, N. New EU regulation aspects and global market of active and intelligent packaging for food applications. **Food Control**, v. 21, p. 1425–1435, 2010.

REIJNDERS, L. Cleaner nanotechnology and hazard reduction of manufactured Nanoparticles. **Journal of Cleaner Production**, v. 14, p. 124–133, 2006.

RIBEIRO, L. A. F.; FERREIRA, C. M. M. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, p.164-171, 2008.

ROGERO, S.O.; LUGÃO, A.B.; IKEDA, T.I.; CRUZ, A.S. Teste in vitro de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. **Materials. Research**, v. 6, p. 317-320, 2003.

ROZET, E.; CECCATO, A.; HUBERT, C.; ZIEMONS, E.; OPREAN, R.; RUDAZ, S.; BOULANGER, B.; HUBERT, P. Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, p. 111–125, 2007.

RUBIO, L.A.; GAVARA, R.; LAGARON, J. M. Bioactive packaging: turning foods into healthier foods through biomaterials. **Trends in Food Science & Technology**, v.17 p.10 , 2006.

RHIM, J. W.; PARK, H. M.; HA, C. S. Bio-nanocomposites for food packaging applications. **Progress in Polymer Science**, v.38, p.1629-1652, 2013.

RHIM, J. W.; HONG, S. I.; HA, C. S. Tensile, water vapor barrier and antimicrobial properties of PLA/nanoclay composite films. **Food Science and Technology**, v. 42, 2009.

SARANTÓPOULOS, C.I.G.L.; MORAIS, B.B. Embalagens ativas e inteligentes para frutas e hortaliças. **Boletim de Tecnologia e Desenvolvimento de Embalagens**, v.21, p.1-7, 2009.

- SAMBURY, Y.; ANGELIS, I.; RANALDI, G.; SCARINO, M.L.; STAMMATI, A.; ZUCCO, F. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. **Cell Biology Toxicology**, v.21, p.1–26, 2005.
- SILVANA BIAGINI, S.; PAULO AGUIRRE COSTA, P. A. ; WENDEL, S. SCHETTINO, G.; AZEVEDO, L. C .P. Validação in vitro e in vivo da viabilidade de eritrócitos suínos estocados para estabelecer um modelo experimental de transfusão homóloga de hemácias: estudo piloto. **Rev Bras Terapia Intensiva**, v.26 p.287-291, 2014;
- SILVA, A. M.; SÁ, B. A.; FRANCO, S. L.; SILVA, C. C. T.; CARVALHO, F. M. L. Contaminação em embalagens de alimentos industrializados. **Revista Saúde em Foco**, Teresina, v. 2, p. 107-114, 2015.
- SILVA, A. S.; FREIRE, J. M.; GARCÍA, C.R.; FRANZ, S.R. PASEIRO, L.P. Time-temperature study of the kinetics of migration of DPBD from plastics into chocolate, chocolate spread and margarine. **Food Research International**, v. 40, p. 679-686, 2007.
- SILVA, A. S.; GARCÍA, R. S.; COOPER, I.; FRANZ, R.; LOSADA, PASEIRO, L.P. Compilation of analytical methods and guidelines for the determination of selected model migrants from plastic packaging. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, p. 535-546, 2006 .
- SINGH, A.V.; YANG, C.; KAVLOCK, R.J. **Developmental Toxicology Research Strategies: Computational Toxicology**. In: Daston, GP.; Knudsen, TB., editors. **Developmental Toxicology**. New York: Elsevier; 2010.
- SOZER, N.; KOKINI, J. L. Nanotechnology and its applications in the food sector. **Trends in Biotechnology**, v.27, p.82-89, 2009.
- SOARES, F. F. N .; SILVA, A. W.; PIRES, S. C. A.; CAMILLOTO, P. G.; SILVA, S. P. Novos desenvolvimentos e aplicações em embalagens de alimentos. **Revista Ceres**, v. 56, p.370-378, 2009
- SOUZA, C.O.; SANTOS, V. P.; DRUZIAN, J.I. Natural Ingredients as Additive for Active Antioxidant Food Packaging, in: Lima, P.P.G., Vianello, F. (Eds.), **Food Quality, Safety and Technology**. Springer, New York, p. 179-304, 2013.

SCARFATO, P. ; MAIO, D. L.; INCARNATO, L. Recent advances and migration issues in biodegradable polymers from renewable sources for food packaging. **Journal of Applied Polymers Science**.v.132, p.42597, 2015.

SCHLTE, P. A.; BUENTELLO, S. F. As questões éticas e científicas da nanotecnologia no local de trabalho. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.12, p.1319-1332, 2007.

SHAH, P. V. The History of Bioanalytical Method Validation and Regulation: Evolution of a Guidance Document on Bioanalytical Methods Validation. **The AAPS Journal**, v.9, p.5, 2007.

SHAH, U.; GANI, A.; ASHWAR, B.A.; SHAH, A.; AHMAD, M.; GANIL, A.; WANIL, I.A.; MASOODI, F.A. A review of the recent advances in starch as active and nanocomposite packaging films. **Cogent Food & Agriculture**, v.1, p.1-9, 2015.

SHARROCK, K.R.; HENZELL, R.F. Ethylene ripening of pears by unconventional means: use of experimental thimble-sized Ethylene Capsules inside cartons and clamshells. **Acta Horticulturae**, p.339-346, 2010.

SHAHBAZIKHAH, P.; ASADOLLAHI-BABOLI, M.; KHAKSAR, R.; ALAMDARI, R. F.; ZARE-SHAHABADI, V. Predicting partition coefficients of migrants in food simulant/polymer systems using adaptive Neuro-Fuzzy interference system. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, p. 1446-1451, 2011.

STAIANO, M; MATVEEVA, E. G.; ROSSI, M.; CRESCENZO, R.; GRZYCZYNSKI, Z.; GRZYCZYNSKI, I.; IOZZINO, L.; AKOPOVA, I.; D'AURIA, S. Nanostructured silver-based surfaces: new emergent methodologies for an easy detection of analytes. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v.1, p. 2909-2916, 2009.

STOKES, W.S.; WIND, M. Recent progress and future directions at NICEATM-ICCVAM: Validation and regulatory acceptance of alternative test methods that reduce, refine, and replace animal use. **ALTEX**. v.27, p.221–232, 2010a.

STOKES, W.S.; WIND, M. Validation of innovative technologies and strategies for regulatory safety assessment methods: challenges and opportunities. **ALTEX**. v.27, p.87–95, 2010b

SZCZEPAŃSK, N. KUDŁAK, B. NAMIEŚNIK, J. Recent advances in assessing xenobiotics migrating from packaging material – A review. **Analytica Chimica Acta**. 2018.

United States Food and Drug Administration (US-FDA). Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, 2001.

United States Food and Drug Administration. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation. Federal Register 2013.

United States Food and Drug Administration (US-FDA). Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, 2015.

USP – The United States Pharmacopeia, Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 38 ed., 2015.

VALENTINI, S. R.; SOMMER, W. A.; MATIOLI, G. Validação de métodos analíticos **Arquivos do Mudi**. v. 11, p.26-31, 2007.

VEIGA-SANTOS, P.; OLIVEIRA, L. M.; CEREDA, M. P.; ALVES, A. J.; SCAMPARINI, A. R. P. Mechanical properties, hydrophilicity and water activity of starch-gum films: Effect of additives and deacetylated xanthan gum. **Food Hydrocolloids**, v.19, p.341-349, 2005.

XIE, Y.; HE, Y.; IRWIN, L. P.; JIN, T.; SHI, X. Antibacterial activity and mechanism of action of zinc oxide nanoparticles against campylobacter jejuni. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77, p.2325-2331, 2011.

YAMASHITA, S.; KONISHI, K.; YAMAZAKI, Y.; TAKI, Y.; SAKANE, T.; SEZAKI, H.; FURUYAMA, Y. New and Better Protocol for a Short- Term Caco-2 Cell Culture System. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91, p.669-79, 2002.

WAGNER, M.; OEHLMANN, J. Endocrine disruptors in bottled mineral water: total estrogenic burden and migration from plastic bottles. **Environmental Science and Pollution Research**, v.16 p.278-286, 2009.

WONG, S.; SHANKS, R.; HODZIC, A. Interfacial improvements in poly(3-hydroxybutyrate)-flax fibre composites with hydrogen bonding additives. **Composites Science and Technology**, v. 64, p. 1321-1330, 2004.

ZHOU, T.; CHOU, J.; WATKINS, P.B. Toxicogenomics: transcription profiling for toxicology assessment. **EXS**, v. 99, p.325–366, 2009.

CAPÍTULO II

OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE BIOENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE MATERIAIS UTILIZADOS EM EMBALAGENS ALIMENTÍCIAS

OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE BIOENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE MATERIAIS UTILIZADOS EM EMBALAGENS ALIMENTÍCIAS

Jamily Araujo Souza¹, Carolina Oliveira¹, Cleber Alberto Schmidt¹

¹ Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos - PGAlí - Universidade Federal da Bahia-UFBA –
Salvador, Bahia, Brasil.

RESUMO

Os materiais utilizados em embalagens alimentícias possuem composição diversificada devido à inclusão de aditivos para a melhoria das propriedades físico-químicas. Considerando que a segurança toxicológica destes materiais ainda necessita de estudo, metodologias *in vitro* por difusão em ágar e por contato direto utilizando células de epitélio intestinal humano Caco-2 foram recentemente adaptadas e implementadas pelo nosso grupo de pesquisa com a proposta de avaliar previamente a citotoxicidade de materiais de origem polimérica e outros destinados ao uso em embalagens alimentícias. Apesar do desempenho satisfatório, as metodologias necessitavam ter suas condições analíticas validadas. Neste sentido, este estudo apresenta a otimização e validação de todos os parâmetros aplicáveis às características analíticas completamente diferenciadas destes bioensaios. Os achados demonstram que dentro da faixa de tamanho da amostra entre 9 mm² a 100 mm² a resposta foi linear, com coeficientes de correlação (r) de 0,98 e 0,99 para o método por contato direto (CD) e indireto (CI), respectivamente. A seletividade, adaptada para as características dos bioensaios, demonstrou que ambos detectam a presença residual de substância citotóxica. Nos parâmetros de precisão, o desvio padrão relativo variou entre 2,4% a 6,5% (CD) e 1,8% a 15% (CI), altamente satisfatórios para ensaios biológicos. Na robustez, o único parâmetro que impactou negativamente na resposta foi o aumento do volume de ágar (CI) causando uma diminuição significativa no tamanho dos halos de reatividade (P<0,05). Além de atenderem aos parâmetros investigados na validação, os bioensaios investigados podem ser considerados como ferramentas analíticas simples e de baixo custo, capazes de fornecer resultados confiáveis em estudos prévios de avaliação de citotoxicidade de materiais utilizados em embalagens alimentícias.

Palavras-chave: Segurança alimentar. Citotoxicidade. Embalagens alimentícias. Bioensaio. Polímeros.

ABSTRACT

The materials used in food packaging have a diversified composition due to the inclusion of additives to improve the physicochemical properties, therefore the toxicological safety of these materials must be evaluated. Methods *in vitro* by agar diffusion and direct contact using Caco-2 human intestinal epithelial cells were recently adapted and implemented by our research group in order to evaluate the cytotoxicity of polymeric material and others used for food packaging. Despite the satisfactory performance, the proposed methodologies needed to have their analytical conditions validated. Therefore, this work presents the optimization and validation of all parameters which are applicable to the entirely differentiated analytical characteristics of these bioassays. The investigation exhibited, within the size range of samples of 9 mm² and 100 mm², linear response with correlation coefficient (r) of 0.98 and 0.99 for the direct (DC) and indirect (IC) contact method, respectively. The selectivity, adapted to the characteristics of the bioassays, showed that both methods are able to detect the residual presence of cytotoxic substances. Concerning the precision, the relative standard deviation (%) ranged from 2.4% to 6.5% (DC) and 1.8 to 15% (IC), which were highly satisfactory for biological assays. For the robustness study, the only parameter that negatively impacted the response was the increase in the volume of agar in the IC method causing a significant decrease in the size of the reactivity halos (P<0.05). The results indicate that both methods fulfilled the parameters investigated in the validation studies. In addition, both are simple and low cost analytical tools capable of providing reliable results in the investigation of previous cytotoxicity of materials used in food packaging.

Keywords: Food safety. Cytotoxicity. Food packaging. Bioassay. Polymers.

1. INTRODUÇÃO

A embalagem desempenha um papel chave no fornecimento de alimentos seguros e nutritivos. Tem função de assegurar o nível de qualidade exigido e alcançado durante o processo de produção e armazenamento, protegendo o alimento de possíveis contaminações químicas, físicas e biológicas até o seu efetivo consumo (SILVA, 2015). Geralmente materiais utilizados para o contato direto com o alimento são selecionados de forma a possuir a menor interação com o produto acondicionado, atuando assim como uma barreira inerte (FRANCHETTI; MARCONATO, 2006; SHAH et al., 2015).

Os polímeros constituintes das embalagens plásticas originam-se de fontes vegetais, animais, químicas e biotecnológicas. Sua composição também é bastante variada, devido à mistura de polímeros em diferentes proporções ou inclusão de aditivos para a melhoria das suas propriedades físico-químicas, conferindo-lhe maior biofuncionalidade e melhorando a conservação do alimento (RHIM et al., 2013).

A resina plástica é o produto final da primeira etapa de produção e, para que ocorra a sua conversão em material plástico, são utilizados aditivos, tais como, antioxidantes, plastificantes, deslizantes, estabilizantes e antiestáticos, com o objetivo de melhorar as condições de processamento e as propriedades mecânicas do produto final (BRASIL, 2008; COLTRO; MACHADO, 2011; ALBUQUERQUE et al., 2014). Entretanto, devido ao baixo peso molecular dos aditivos utilizados, pode ocorrer um processo indesejável de migração, resultando em alterações organolépticas do produto e comprometimento da saúde do consumidor (SILVA, 2015).

Tendo em vista o efeito migratório de algumas substâncias, a comunidade científica também avalia o risco associado à presença de outros elementos e constata que muitos são biologicamente ativos apresentando um potencial carcinogênico e genotóxico (REIJNDERS, 2006; NUNES et al., 2009; RESTUCCIA et al., 2010). Ensaios toxicológicos são necessários para se conhecer, comprovar e reforçar, os efeitos adversos à saúde causados pela exposição prolongada a tais substâncias (PINA, 2011).

Metodologias alternativas baseadas em protocolos destinados a avaliação da citotoxicidade de materiais poliméricos de uso médico-hospitalar descritos pela American Society for Testing and Materials – ASTM, pela International Organization for Standardization – ISO e pelas Farmacopéias, foram adaptadas e implementadas para uso com linhagem de células intestinais (Caco-2), mostrando-se promissoras na avaliação preliminar da toxicidade de embalagens convencionais, biodegradáveis e outros materiais poliméricos

empregados na sua fabricação (MACHADO, 2016). Para o estudo, foram modificados parâmetros como, dimensão das amostras avaliadas, concentração da suspensão celular, volume e proporção do Meio Essencial Mínimo/ágar utilizados na placa de cultivo e, principalmente a linhagem celular, sendo empregada células Caco-2 (NH- CCIAL 063) para mimetizar epitélio intestinal humano em substituição de células fibroblásticas de camundongo clone (L929) utilizadas nos métodos originais (BRASIL, 2010; USP, 2015).

No entanto, para que qualquer método de análise forneça resultados seguros e confiáveis, é preciso que seja padronizado e cumpra requisitos que assegurem a confiabilidade dos dados encontrados. Para isso, devem ser submetidos à procedimentos de validação para garantir a qualidade das medições efetuadas (ALENCAR et al., 2004; PASCHOAL et al., 2008). A validação deve garantir por meio de estudos experimentais que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, para tanto devem ser avaliadas, quando aplicável, as condições de especificidade, linearidade, intervalo linear, precisão, limite de quantificação e exatidão adequadas à análise (LA ROCA et al., 2007). É importante salientar que cada técnica analítica possui características próprias, que variam de substância a substância, logo, a escolha dos parâmetros a serem investigados depende do tipo de método a ser avaliado (SHAH et al., 2015).

A necessidade de avaliar as embalagens alimentícias e substâncias utilizadas em sua composição, inclusive quanto aos aspectos de toxicidade, têm emergido muitas discussões sobre o crescente impacto causado a segurança alimentar por meio da migração de substâncias nocivas a saúde (MACIEL et al., 2012). Aliado a isso, a qualidade dos resultados obtidos em nível de pesquisa está sendo cada vez mais exigida para estabelecer parâmetros que assegurem proteção e promoção a saúde do consumidor (RIBANI et al., 2004). Nesse sentido, este estudo otimizou e validou dois métodos bioanalíticos de forma a comprovar sua adequabilidade para a avaliação preliminar da toxicidade *in vitro* de embalagens alimentícias convencionais, biodegradáveis e materiais poliméricos utilizados em sua composição.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

A execução dos ensaios seguiu as especificações estabelecidas durante a adequação das metodologias às amostras de embalagens alimentícias e produtos utilizados na sua produção, realizada com base nos protocolos da ASTM, ISO e monografias das Farmacopéias para ensaios de biorreatividade de materiais poliméricos de uso médico-hospitalar,

farmacêutico e odontológico (ASTM, 2006; 2007; ISO, 2007; 2009; BRASIL, 2010; USP, 2015).

2.1 MATERIAIS

Plásticos descartáveis estéreis e apirogênicos, garrafas de cultivo celular e placas de 96 cavidades (Kasvi^R) de fundo chato com superfície tratada para adesão celular, ágar bacteriológico (Himedia^R), tripsina/EDTA, Meio Essencial Mínimo (MEM) suplementado com soro fetal bovino (SFB) 10% (v/v) e penicilina/estreptomicina, tubos de Falcon (Kasvi^R), cabine de segurança biológica classe II-B (Veco^R), ultra-freezer (AmericanLab^R), estufas de cultura bacteriológica (Nova Ética^R), refrigerador e freezer, autoclave (Phoenix^R), banho termostaticado (Fanem^R), vortex (Phoenix^R), estufa incubadora de CO₂ (Panasonic^R), microscópio invertido campo claro e contraste de fase (TCM 400^R), micropipetadores (Kasvi^R), polietileno de alta densidade (PEAD) controle negativo e fragmento de látex natural, controle positivo.

2.2 MANUTENÇÃO E PREPARO DAS CÉLULAS PARA OS ENSAIOS

A linhagem celular de epitélio intestinal Caco-2 (NIH – CCIAL 063) obtida do Instituto Adolfo Lutz (São Paulo, BR), foi cultivada em Meio Essencial Mínimo (MEM) suplementado com soro fetal bovino (SFB) 10% (v/v) e penicilina/estreptomicina, a 37 °C, 95% de UR e 5,0% de CO₂, com substituição do meio de cultura a cada 2 a 3 dias. Entre 24 e 48 h antes dos experimentos, a monocamada celular apresentando 90% de confluência foi removida com auxílio de tripsina/EDTA e a suspensão centrifugada a 1.100 rpm, 5 min. O sedimento celular foi ressuspensão em MEM para obter suspensão contendo $1,0 \times 10^6$ células.mL⁻¹, sendo então transferida para placas plásticas de Petri estéreis que foram incubadas por 24 h a 37 °C, 95% UR e 5,0% de CO₂ para fixação e crescimento celular até atingir 90% confluência.

2.3 ENSAIOS DE TOXICIDADE POR DIFUSÃO EM ÁGAR

Após a fixação das células nas placas o sobrenadante foi removido, sendo então adicionado o 1,5 ml de meio MEM a 45 °C contendo ágar de forma a obter uma camada fina e homogênea sobre as células. Após a solidificação os fragmentos das amostras foram

cuidadosamente colocados sobre o ágar, seguido de incubação a 37 °C, 5,0% CO₂. Fragmentos de látex foram utilizados como controle positivo e polietileno de alta densidade (PEAD) como controle negativo em função de ser um material inerte com baixa tendência de interagir com o que está em seu contato (ASTM, 2006; 2007; ISO, 2007; 2009; BRASIL, 2010; USP, 2015). Os testes foram realizados em duplicata. O halo de citotoxicidade foi examinado em microscópio e mensurado por paquímetro para classificação do nível de biorreatividade (Tabela 1).

2.4 ENSAIOS DE TOXICIDADE POR CONTATO DIRETO

As placas foram preparadas como descrito no ensaio de difusão, exceto pela adição do ágar após a confluência celular, o qual foi substituído por meio MEM para manter as células viáveis, possibilitando assim o contato direto entre a monocamada de células e a amostra. A leitura dos halos foi realizada da mesma forma descrita para o ensaio por difusão em ágar.

Tabela 1 – Classificação da reatividade celular para o ensaio de difusão em ágar e por contato direto.

Classificação	Reatividade	Descrição do halo de Reatividade
0	Nenhuma	Halo não detectável ao redor ou sob a amostra
1	Leve	Células mal formadas ou degeneradas sob a amostra
2	Suave	Halo limitado à área sob a amostra
3	Moderada	Halo de 5,0 a 10,0 mm além da amostra
4	Forte	Halo > 10,0 mm além da amostra

Fonte: (ISO, 2009; Brasil, 2010; USP, 2015).

2.5 VALIDAÇÃO

Os parâmetros propostos para a validação dos ensaios de biorreatividade foram definidos com base nas normas internacionais (ICH, 2005) e na RDC 166/17 (BRASIL, 2017), porém adaptados para as características específicas do modelo bioanalítico em questão, uma vez que nem todos os parâmetros de validação são aplicáveis, devido à natureza não quantitativa dos bioensaios estudados. Diferenciando-se de métodos analíticos tradicionais, as metodologias avaliadas neste trabalho não identificam nem quantificam as substâncias citotóxicas presentes na amostra, pois tem por objetivo identificar e classificar a resposta citotóxica gerada por componentes da amostra. Todos os testes foram realizados utilizando

apenas o controle positivo (fragmentos de látex) que normalmente provoca forte reatividade, promovendo a formação do halo de morte celular visível e mensurável.

Intervalo linear e Linearidade: Para a determinação da linearidade recomenda-se a análise de no mínimo 5 concentrações diferentes do analito (ICH, 2005; BRASIL, 2017). No entanto, foram avaliados apenas 4 tamanhos de látex natural (100 mm², 64 mm², 25 mm² e 9 mm²). A escolha destes tamanhos teve por base a indicação do uso de fragmentos planos de amostra com tamanho entre 25 mm² a 100 mm² nos protocolos para avaliação da biorreatividade *in vitro* para polímeros de uso médico-hospitalar (ASTM, 2006; 2007; ISO, 2007; 2009; BRASIL, 2010).

O halo de reatividade representado pela morte celular foi mensurado com paquímetro, medindo-se a partir da borda externa do fragmento de látex em todas as faces para expressar o valor médio. A análise microscópica também foi empregada para confirmação da extensão do halo. A linearidade das respostas foi determinada pelo método dos mínimos quadrados a partir de 3 réplicas de cada fragmento por ensaio em 4 ensaios independentes (n=12). Em adição, calculou-se o coeficiente de correlação (r) e a análise estatística da diferença entre as respostas médias para cada tamanho de amostra (inclinação da reta).

Seletividade: Em metodologias analíticas convencionais este parâmetro demonstra a capacidade que o método possui de identificar ou quantificar um composto em presença de impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. Entretanto, nos ensaios em questão, a reatividade pode ocorrer devido a presença de inúmeros compostos com atividade citotóxica. Sendo assim foi necessário adaptar este parâmetro para avalia-lo, de forma qualitativa apenas, com objetivo de demonstrar a capacidade do método em responder a estímulos tóxicos. Desta forma foi considerada a reatividade das células ao contato com fragmentos de látex natural e ao polietileno de alta densidade (PEAD) impregnado com partenolídeo (10 mM) diluído em dimetilsulfóxido, em comparação ao PEAD isolado (controle negativo) o qual não apresenta biorreatividade às células (ASTM, 2006; ISO, 2009). Utilizou-se apenas amostras com 64 mm² de área. Após impregnar o fragmento de PEAD com partenolídeo a amostra foi seca sob fluxo de ar estéril para eliminar o excesso da substância tóxica, posteriormente o fragmento foi depositado sobre a monocamada de células.

Precisão: Foi determinada por meio da repetibilidade com a análise de 6 réplicas para cada um dos tamanhos do fragmento de látex estudados na linearidade. A precisão intermediária foi determinada pela avaliação de desempenho dos métodos em análises inter-

dias (4 dias consecutivos e 3 réplicas/dia para cada amostra, n=12) e inter-analistas (2 analistas e 3 réplicas/analista para cada amostra, n=6). Os parâmetros foram aplicados para todos os tamanhos de amostra avaliados na linearidade de forma a avaliar se a precisão tem relação com o tamanho da amostra. Os resultados foram expressos pelo desvio padrão relativo (DPR%).

Robustez: No ensaio por difusão avaliou-se a influência do volume de meio sobre a camada celular (espessura), originalmente de 1,5 mL foi modificado para 2,0 mL e a concentração do ágar, inicialmente em 0,5% (p/v) foi modificada para 1,0% (p/v). No ensaio por contato direto, a condição original modificada foi o volume de meio MEM adicionado sobre a monocamada de células, passando de 600 µL para 400 µL. Nas duas metodologias avaliou-se o aumento do tempo de incubação, de 24h para 48h em todas as condições avaliadas na robustez.

2.6 AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO DO MÉTODO EM TESTES COM DIFERENTES AMOSTRAS.

Após a otimização e validação finalizadas, foram testadas amostras de polímeros e embalagens convencionais de forma comparativa nas duas metodologias propostas. Avaliou-se amostras de polipropileno (PP), poli-butileno adipato co-tereftalato (PBAT), polietileno de baixa densidade (PEBD) e polipropileno biorientado metalizado (PPBM), embalagens de leite, de queijo, achocolatado, iogurte, embalagens metálicas (para cerveja) e revestimento interno da tampa de embalagens de alimentos tipo papinha para bebê.

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Utilizou-se a estatística descritiva e a inferência estatística por meio do programa estatístico ASSISTAT com a aplicação da análise de variância (ANOVA) e teste Tukey com nível de significância de 5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dois contextos devem ser considerados no processo de validação das metodologias propostas, o primeiro é o fato de que nem todos os parâmetros de validação previstos para

metodologias físico-químicas são aplicáveis a bioensaios, sendo necessário o uso de abordagens alternativas para a validação como é previsto pelos órgãos regulatórios, compêndios oficiais e demais documentos técnicos relacionados à validação de metodologias analíticas (ICH, 2005; USP, 2015; BRASIL, 2017).

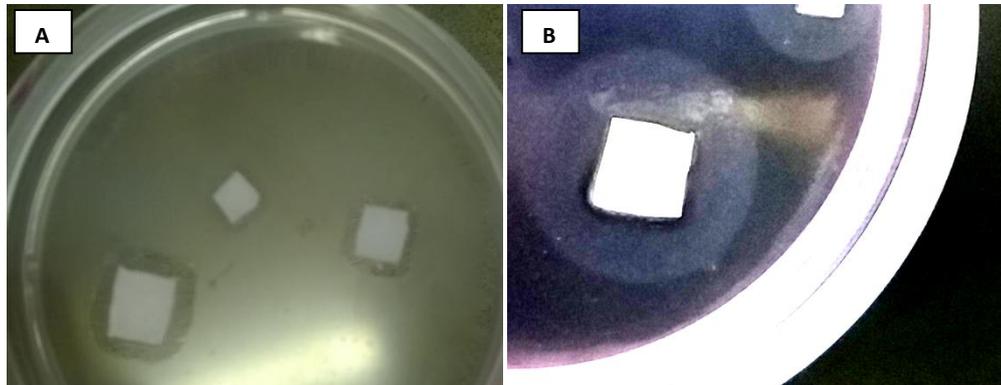
O segundo contexto, e mais desafiador, é o caráter não quantitativo dos bioensaios estudados. Diferentemente de métodos analíticos tradicionais, as metodologias avaliadas neste trabalho não quantificam as substâncias responsáveis pela resposta citotóxica, nem mesmo têm a capacidade de distinguir a origem da toxicidade, que é observada na forma de halo de reatividade causado por alterações de caráter morfológico e por morte celular. Porém graduam as respostas em função da extensão do halo (tamanho) gerado pelo estímulo tóxico. Desta forma, entende-se que é possível avaliar estes bioensaios de uma maneira mais sistemática para estabelecer as melhores condições de análise e prever fatores que possam afetar seu desempenho, estabelecendo assim condições mínimas para um desempenho satisfatório, já que o objetivo da validação para um bioensaio é confirmar as características operacionais do procedimento para o uso pretendido, como já é definido na seção 1033 da Farmacopeia Americana, que trata de validação de ensaios biológicos (USP, 2015). A RDC 166/17 (BRASIL, 2017) afirma a necessidade de abordagens alternativas para interpretação dos parâmetros na validação de ensaios biológicos, corroborando para a interpretação utilizada no presente estudo.

3.1 OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DOS BIOENSAIOS

Linearidade de resposta

Para a avaliação da linearidade os halos de reatividade foram mensurados com paquímetro a partir da borda da amostra em todas as faces para expressar o valor médio (Fig. 1). A análise microscópica da morfologia das células também foi empregada para confirmação da extensão do halo, pois alterações morfológicas das células também indicam resposta a estímulos tóxicos. Células não viáveis apresentavam morfologia alterada, tamanho reduzido e perda de contato entre elas, indicando dano ou morte celular. Este efeito foi bastante perceptível nos dois modelos de ensaio, sendo também expressiva a diferenciação de resposta média (halo de reatividade) entre os tamanhos avaliados, mostrando uma resposta proporcional ao tamanho da amostra utilizada.

Figura 1. Exemplo de halos de reatividade observados com fragmentos de látex natural nos ensaios por (A) contato direto e (B) por contato indireto com células Caco-2.



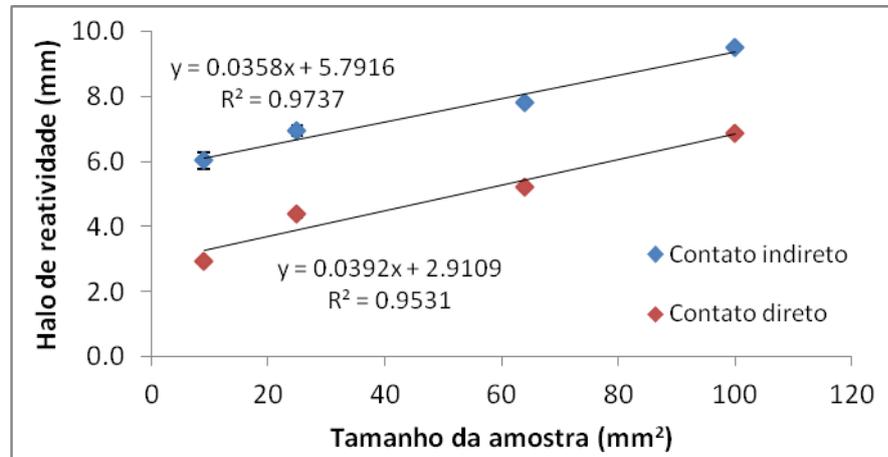
Fonte: Próprio autor

Apesar dos métodos em questão serem bioanalíticos e possuírem o objetivo de identificar qualquer efeito citotóxico dos componentes presentes na amostra e não de separar ou quantificar componentes específicos como ocorre em métodos quantitativos, observou-se que ambos responderam de forma linear na faixa de tamanhos dos fragmentos de látex avaliados. Ambas as metodologias apresentaram linearidade satisfatória dentro da faixa de tamanhos avaliada para o fragmento de látex natural. O coeficiente de determinação (r^2), que mede a intensidade ou grau de relacionamento linear entre o estímulo e a resposta obtida, apresentou valores superiores a 0,95 (Fig. 2).

Valores de coeficiente de correlação (r) superiores a 0,99 indicam correlação linear positiva para métodos analíticos quantitativos (ICH, 2005; FDA 2013; BRASIL, 2017). Os coeficientes de correlação (r) obtidos no presente estudo encontram-se entre 0,98 e 0,99, ou seja, muito próximos dos valores referenciado em manuais e documentos regulatórios. Se considerada a natureza biológica dos métodos, a simples proximidade dos valores encontrados ao índice informado pela literatura comprova a existência de uma correlação linear positiva entre as variáveis, sendo, portanto altamente satisfatórios.

Observou-se diferença significativa ($P < 0,05$) entre as médias dos halos gerados dentro da faixa de 9 mm^2 a 100 mm^2 de tamanho de amostra, avaliadas na linearidade, indicando que houve regressão comum significativa (inclinação) de resposta nos dois sistemas avaliados. Em ensaios biológicos a inclinação significativa da reta de resposta é importante e indica que o sistema de ensaio responde efetivamente aos estímulos dentro da faixa de trabalho selecionada.

Figura 2. Linearidade método por difusão em ágar e por contato direto (n=12). Barras: erro padrão da média.



O ensaio por contato indireto (difusão em ágar) demonstrou halos de reatividade mais expressivos e com circunferência mais uniforme (Fig. 2B), o que facilita a medição. Segundo Machado (2016) a presença do ágar, utilizado para possibilitar o contato indireto às células, facilita a visualização do efeito citotóxico, devido à difusão homogênea dos compostos da amostra sobre a monocamada celular. Entretanto, a resposta do sistema a diferentes estímulos citotóxicos presentes em uma amostra vai depender da difusibilidade no ágar dos componentes responsáveis por este efeito, como observado para o látex natural, que apresentou respostas médias significativamente superiores ($P < 0,05$) em presença de ágar. Porém, Machado (2016) observou o inverso para outras amostras que, no bioensaio sem ágar, haviam demonstrado resposta citotóxica mais intensa.

O ensaio de difusão em ágar tem origem com o trabalho de Guess e colaboradores (1965) e Dulbecco (1952) que empregaram sistema contendo monocamada de células sob uma fina camada de ágar. A difusão lenta de substâncias lixiviáveis tóxicas através do ágar resulta em um gradiente de concentração ao redor da amostra, proporcionando uma zona de morte celular. Guess e colaboradores (1965) testaram 100 diferentes tipos de plásticos em fibroblastos L-929 pelo ensaio de contato indireto obtendo, para 94 amostras, resultados idênticos àqueles obtidos por contato direto. As 6 respostas negativas foram atribuídas a baixa concentração dos compostos tóxicos difusíveis através do ágar.

Substâncias tóxicas agem sobre as células através de danos à sua membrana, comprometimento das atividades metabólicas ou por interferência na atividade genética (genotoxicidade). Os efeitos podem ocorrer de forma isolada ou por efeito sinérgico destes processos. Alterações na estrutura biológica das membranas interferem no transporte de água,

íons e metabólitos, podendo levar a lise celular. Compostos com atividade surfactante, monômeros residuais e plastificantes podem ter este efeito. Íons de metais pesados, resíduos de monômeros e radicais promovem a inibição das enzimas celulares causando danos às atividades metabólicas, levando à redução da produção energética e da síntese proteica celular, afetando assim o transporte ativo das membranas e a proliferação celular, podendo culminar com a morte das células. A ligação covalente de compostos eletrofílicos e hidrocarbonetos aromáticos ao DNA pode levar a genotoxicidade celular (GROTH et al., 1995).

Com os resultados obtidos na linearidade também foi possível definir que a amostra de 64 mm² de área superficial seria o tamanho ideal para os dois modelos analíticos propostos. Para a escolha considerou-se a observação de halos de reatividade bem visíveis e mensuráveis, adequados ao diâmetro da placa utilizada, de forma a possibilitar a aplicação de 4 a 5 amostras por placa de 60 mm de diâmetro. Apesar de permitir a aplicação de menos amostras, as placas de 60 mm se mostraram adequadas, pois sua área de superfície proporciona confluência celular em 24 h a partir de uma suspensão de 1×10^6 células/mL. A menor taxa de crescimento celular da Caco-2, em comparação a de outras células, como por exemplo fibroblastos, faz com que superfícies grandes necessitem de mais tempo e maior concentração inicial de células, impactando diretamente nos custos e tempo necessário para a execução de todo o experimento, pois é preciso considerar o processo como um todo, desde o cultivo na garrafa até a confluência nas placas.

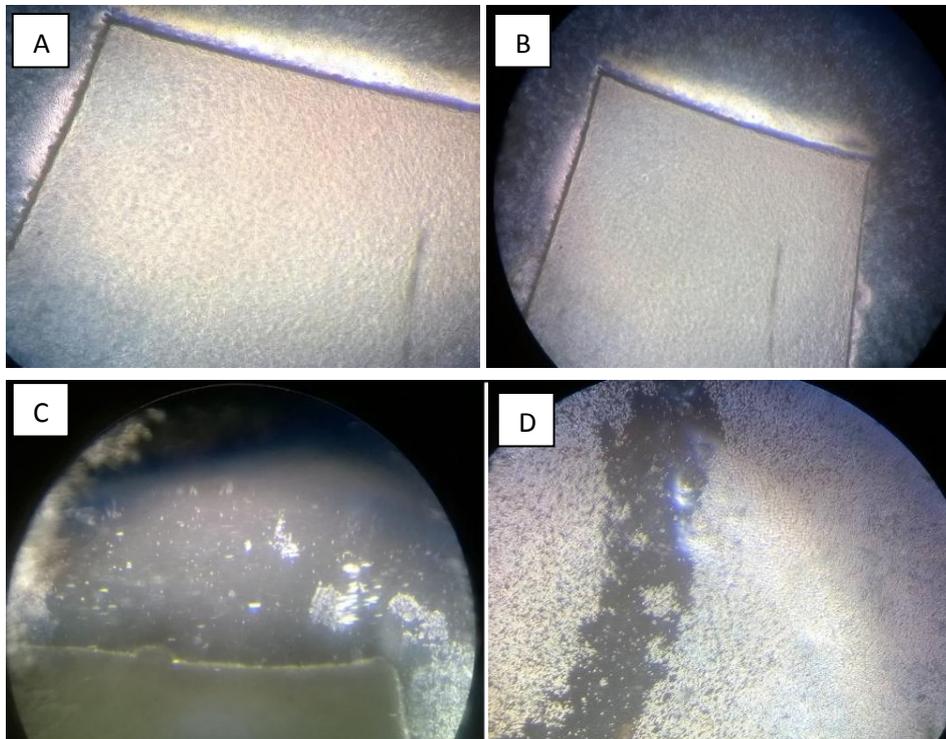
Seletividade

Por não se tratar de método quantitativo tradicional, onde a resposta ocorre pela presença de um analito específico, a abordagem utilizada para avaliação da seletividade foi adaptada de forma a demonstrar que as metodologias são capazes de identificar algum estímulo citotóxico presente na amostra em comparação com a mesma amostra inerte (AOAC, 2002; BRASIL, 2017).

Na avaliação da seletividade das metodologias sob estudo, observou-se que no ensaio de difusão em ágar as amostras de PEAD impregnadas (n=9) apresentaram halo médio de $3,92 \pm 0,04$ mm, o controle positivo (fragmento de látex) do teste apresentou halo de 8 mm. Já para o ensaio de contato direto observou-se halo médio de $3,58 \pm 0,15$ mm, o controle positivo apresentou halo de 5,5 mm. A resposta citotóxica ao PEAD impregnado reflete a capacidade do método em identificar danos a nível celular causado pela presença de

substância citotóxica na amostra. A observação da morfologia celular realizada por microscópio de luz enfatiza o resultado positivo para reatividade encontrada no PEAD contaminado com partenolídeo (Fig. 3C/3D). As células expostas ao PEAD inerte não apresentam halos de reatividade (Fig. 3A/3B), por outro lado, a presença da substância tóxica exibiu área de reatividade nítida com células de tamanho reduzido que perdem o contato entre elas, indicando dano ou morte celular.

Figura 3. Exemplo de respostas observadas com PEAD não reativo, no ensaio por (A) difusão em Agar e (B) por contato direto. PEAD impregnado com partenolídeo (10 mM) (C) por difusão e (D) por contato direto.



Fonte: Próprio autor

Segundo protocolos padronizados, o primeiro efeito observado após a exposição de células a agentes tóxicos é a alteração morfológica da monocamada celular ou do formato individual da célula. Desta forma, as alterações visuais são utilizadas como indicativo para graduar a toxicidade de compostos submetidos a bioensaios (ASTM, 2006; 2007; BRASIL, 2010; USP, 2015).

Precisão

A precisão dos métodos foi estabelecida por meio da repetibilidade e da precisão intermediária (inter-dias e inter-analistas) e os resultados estão expressos nas Tabelas 2, 3 e 4.

A estimativa do desvio padrão relativo (DPR) da série de repetições executadas segundo os parâmetros estabelecidos expressa a precisão do método. Em alguns casos, a literatura técnica recomenda parâmetros de precisão com DPR inferior a 15% para métodos físico-químicos (BLOCH, 2005; FDA, 2013), podendo chegar a 20% para bioensaios (EMEA, 2011; PMDA, 2014) já que estes são reconhecidamente menos precisos. Por outro lado, a literatura também define que os critérios de aceitação devem ser definidos e justificados de acordo com o objetivo do método, sua variabilidade intrínseca, além de outras características (BRASIL, 2017).

De forma majoritária, o DPR (%) obtido para todos os tamanhos avaliados (Tabelas 2-4) estão dentro dos valores referenciados pela literatura. Igualmente ao que foi observado na linearidade, destaca-se a amostra com área superficial de 64 mm², pois apresentou menor DPR% na avaliação da precisão, principalmente pelo sistema de difusão.

Em contra partida a amostra que apresentou as maiores variações de resposta foi a de 9 mm² de tamanho superficial. Ainda assim para esta amostra, em todos os parâmetros, o DPR não ultrapassou o valor de 15%, o que pode ser considerado excelente dado o caráter biológico das metodologias propostas, normalmente sujeitas a muitos fatores de variação. Em geral, pode ser observado que as amostras com menor área superficial, 9 mm² e 25 mm², apresentaram menor precisão, esse comportamento pode estar relacionado com a difusão não homogênea dos compostos tóxicos, possivelmente pelo tamanho muito reduzido dos fragmentos e consequente redução da superfície de contato entre amostra e a monocamada de células. Além de tecnicamente serem de difícil manuseio durante a execução dos experimentos.

Tabela 2 - Repetibilidade dos métodos por contato direto e por difusão em ágar utilizando amostra de látex natural com diferentes dimensões.

Método	Halo ± DP (mm) (DPR %)			
	100 mm ²	64 mm ²	25 mm ²	9 mm ²
Contato direto	6,8 ± 0,3 (4,4%)	5,2 ± 0,2 (3,9%)	4,5 ± 0,3 (5,5%)	2,9 ± 0,1(4,8%)
Difusão em ágar	9,5 ± 0,4 (3,7%)	7,8 ± 0,2 (2,4%)	6,9 ± 0,5 (7,5%)	6,3 ± 0,8 (12,1%)

DPR%: desvio padrão relativo, DP: desvio padrão, n = 06.

Tabela 3 - Precisão intermediária (inter-dias) dos métodos por contato direto e por difusão em ágar utilizando amostra de látex natural com diferentes dimensões.

Método	Halo \pm DP (mm) (DPR %)			
	100 mm ²	64 mm ²	25 mm ²	9 mm ²
Contato direto	6,9 \pm 0,3 (4,1%)	5,2 \pm 0,1 (2,4%)	4,4 \pm 0,3 (6,5%)	2,9 \pm 0,1 (2,7%)
Difusão em ágar	9,5 \pm 0,3 (3,1%)	7,8 \pm 0,1 (1,8%)	6,9 \pm 0,5 (6,8%)	6,0 \pm 0,7 (11,6%)

DPR%: desvio padrão relativo, DP: desvio padrão, n = 12 (4 dias com 3 réplicas de cada amostra/dia).

Tabela 4 - Precisão intermediária (inter-analistas) dos métodos por contato direto e por difusão em ágar utilizando amostra de látex natural com diferentes dimensões.

Método	Halo \pm DP (mm) DPR (%)			
	100 mm ²	64 mm ²	25 mm ²	9 mm ²
Contato direto	6,9 \pm 0,2 (2,9%)	5,3 \pm 0,2 (4,3%)	4,4 \pm 0,2 (4,6%)	2,9 \pm 0,1 (4,4%)
Difusão em ágar	9,6 \pm 0,2 (2,1%)	7,7 \pm 0,2 (2,4%)	6,7 \pm 0,5 (8,1%)	5,7 \pm 0,9 (15,0%)

DPR%: desvio padrão relativo, DP: desvio padrão, n = 12 (4 dias com 3 réplicas de cada amostra/dia).

Robustez

A robustez de um método analítico mede sua suscetibilidade frente a pequenas variações que podem ocorrer durante as análises de rotina. É fundamental para a identificação dos fatores que devem ser estritamente controlados durante a execução de um método (ICH, 2005; GONZÁLES et al., 2014).

Para a análise da robustez utilizou-se apenas o controle positivo (látex) com tamanho de 64 mm². No método por contato indireto, foram alterados 03 parâmetros cruciais, a concentração de ágar no meio MEM, o volume da mistura ágar/MEM sobre a monocamada de células e o tempo de incubação das amostras, como mostra a Tabela 5.

Na condição utilizando 1% (p/v) de ágar em meio MEM com volume de 1,5 mL/placa os resultados da leitura em 24 h não foram significativamente diferentes ($P > 0,05$ - Tukey) dos obtidos com os parâmetros inicialmente propostos (7,8 mm \pm 0,3 mm). Por outro lado, as leituras realizadas após 48 h (8,3 mm \pm 0,4 mm) apresentaram halos de resposta

significativamente maiores ($P < 0,05$ - Tukey) em relação àqueles mensurados após 24h nesta mesma condição e também em relação à metodologia originalmente proposta (Tabela 5). Nota-se, portanto que o aumento na consistência do ágar e no tempo de leitura não influenciou negativamente a formação do halo de reatividade. Nesta condição, os halos apresentaram melhor delimitação, maior nitidez, possibilitando maior acurácia durante as medições.

Mantendo a concentração de ágar a 0,5% (p/v), porém com maior volume por placa (2,0 mL), foi observada uma redução significativa no diâmetro dos halos de reatividade ($P < 0,05$ - Tukey) em relação aos valores obtidos na condição original (Tabela 5). Esta redução possivelmente está associada ao aumento da espessura da camada de ágar, o que pode causar diminuição da difusibilidade dos compostos da amostra através da camada. Mesmo após 48h de contato as respostas permaneceram significativamente menores em relação à metodologia inicial ($P < 0,05$ - Tukey).

Tabela 5 - Robustez do método por difusão em ágar alterando os parâmetros de concentração do ágar, volume de meio MEM/ágar na placa e tempo de incubação (n=6).

Tempo de contato	Diâmetro médio do halo (mm) \pm DP (DPR%)		
	Condição original - ágar: 0,5% (p/v) - vol: 1,5 mL/placa	Condição alterada 1 - ágar: 1% (p/v) - vol: 1,5 mL/placa	Condição alterada 2 - ágar: 0,5% (p/v) - vol: 2,0 mL/placa
24 h	7,8 \pm 0,3 (2,2%)	7,6 \pm 0,1 (1,8%)	5,5 \pm 0,6 (11,5%)
48 h	7,9 \pm 0,1 (1,8%)*	8,3 \pm 0,4 (4,5%)	6,2 \pm 0,7 (10,5%)

(*) a leitura no tempo de 48 h na condição original tem apenas caráter informativo

A robustez do método por contato direto foi avaliada mediante alteração do volume de MEM que permita o contato da amostra com a monocamada celular e ao mesmo tempo mantenha a viabilidade das células durante todo o experimento, sendo reduzido de 600 μ L para 400 μ L, foi também avaliado o tempo de incubação da placa de cultivo contendo a amostra. A Tabela 6 apresenta os resultados observados. Para o tempo de contato de 24 h, os resultados foram similares ($P > 0,05$ - Tukey) àqueles obtidos com 600 μ L (5,2 \pm 0,2 mm). Já a elevação do tempo de contato para 48 h aumentou significativamente o tamanho médio dos halos de reatividade ($P < 0,05$ - Tukey). Nota-se, portanto, que a manutenção de um volume extremamente baixo de MEM mantém as células viáveis sem alterar a resposta. Da mesma forma que no ensaio por contato indireto, o aumento do tempo de contato não afetou

negativamente a resposta do ensaio, pelo contrário, proporcionou um aumento no halo de reatividade. Volumes maiores não foram testados, pois permitem alteração da posição da amostra com o manuseio da placa.

Tabela 6 - Robustez do método por contato direto alterando o volume de meio MEM para 400 μ L e leitura após 24 horas e 48 horas de contato da amostra (n=6).

Tempo de contato	Diâmetro médio do halo (mm) \pm DP (DPR%)	
	Condição original volume de MEM: 600 μ L	Condição alterada 1 volume de MEM: 400 μ L
24 h	5,2 \pm 0,2 (3,5%)	5,3 \pm 0,22 (4,3%)
48 h	5,8 \pm 0,1 (2,5%)*	6,6 \pm 0,14 (2,1%)

(*) a leitura no tempo de 48 h na condição original tem apenas caráter informativo

De acordo com a IUPAC (2002), os limites para os parâmetros experimentais devem ser previstos no protocolo do método. As alterações realizadas separadamente ou em combinações devem estar dentro da realidade experimental, não sendo alterações muito significativas que possam gerar resultados fora do contexto da análise.

Segundo a normatização Brasileira - RDC 166 (BRASIL, 2017), que estabelece critérios para a validação de métodos analíticos, a interpretação do parâmetro da robustez depende da natureza do método em questão. Para métodos quantitativos, o impacto das variações propostas nos resultados obtidos deverá ser avaliado com os mesmos critérios utilizados para a exatidão. Para métodos qualitativos é necessário verificar se as variações propostas interferem de alguma forma na resposta analítica encontrada.

Os métodos aqui propostos permitem graduar faixas de resposta em escalas distintas de toxicidade, desta forma, por terem caráter predominantemente qualitativo, aplicou-se o segundo critério na avaliação dos resultados da robustez. Verificou-se que, dentro das condições avaliadas, o parâmetro tempo de contato, concentração de ágar e volume mínimo de meio não interferiram de forma negativa nas respostas dos sistemas. Já o aumento da espessura do ágar causou diminuição de resposta, portanto este é um parâmetro crítico que deve ser controlado durante a execução da metodologia.

Durante a etapa de implementação das metodologias já havia indícios que a espessura da camada de ágar, o grau de polimerização e as características de difusibilidade das substâncias presentes nas amostras poderiam potencializar ou inibir a resposta biológica (MACHADO, 2016).

A mensuração dos halos de reatividade após 48hs de contato também demonstrou ser favorável para a identificação da biorreatividade por esse sistema, pois os halos foram significativamente maiores, o que pode ser interessante em determinadas situações analíticas. No entanto, o tempo mínimo de incubação descrito para métodos com princípios similares aos propostos por este trabalho, mas destinados a avaliação de polímeros de uso médico-hospitalar, é de 24h (ROGERO, 2003; USP 2015; ASTM, 2006; BRASIL 2010).

Tempos de incubação acima de 24h devem ser criteriosamente avaliados, pois podem interferir no metabolismo e viabilidade celulares por outras vias não relacionadas a fatores citotóxicos, por exemplo, contaminação por micoplasmas ou outros microrganismos oriundos de amostras lábeis que não podem ser esterilizadas previamente à análise.

No ensaio por contato direto, a redução no volume do meio utilizado para uma quantidade mínima necessária para manter a viabilidade da monocamada celular durante o período de incubação é importante para reduzir a tensão superficial entre amostra e o meio líquido presente na placa, dificultando a sua movimentação e estabelecendo um ponto fixo de contato para a migração dos compostos tóxicos da amostra para a monocamada celular. O tempo de incubação maior também exibiu resultados favoráveis para a mensuração dos halos de reatividade, entretanto, há de se considerar nestes casos a necessidade de haver meio suficiente para manter a viabilidade celular durante todo o período.

As modificações avaliadas na robustez finalizaram o processo de validação e otimização dos métodos propostos, possibilitando a escolha dos melhores parâmetros de reprodução para a análise da citotoxicidade de materiais de embalagens alimentícias de forma objetiva, com redução de insumos e condições que geram halos mais nítidos e delimitados.

3.2 AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO DO MÉTODO EM TESTES COM DIFERENTES AMOSTRAS.

Considerando que os parâmetros concentração de ágar a 1% (p/v) e volume de meio reduzido para 400 µL apresentaram vantagem técnica sem modificar a resposta em relação aos resultados com os parâmetros originais, estes foram incorporados às metodologias para o ensaio de citotoxicidade de materiais poliméricos e embalagens de uso alimentício (Tabela 7).

Embalagens alimentícias, filmes convencionais biodegradáveis e materiais poliméricos alternativos, foram testadas nas duas metodologias propostas, com leitura em 24 h e 48 h. Em cada método as amostras foram analisadas em duplicata. O nível de citotoxicidade foi examinado em microscópio invertido para identificar células mal formadas ou degeneradas sob a amostra

e o halo de reatividade foi mensurado por paquímetro sendo classificado segundo tamanho e intensidade de resposta de acordo com a Tabela 1.

Tabela 7 - Biorreatividade das amostras, após 24 horas e 48 horas de incubação, com células Caco-2 por contato direto e difusão em ágar.

Amostras	Contato direto		Difusão em ágar	
	24h	48h	24h	48h
PBAT	Nenhuma	Nenhuma	Nenhuma	Nenhuma
PEBD	Suave a moderada	Suave a moderada	Leve	Suave a moderada
PPBM	Suave a moderada	Suave a moderada	Suave	Suave
PP	Suave a moderada	Suave a moderada	Leve	Leve
Emb. metálica para bebidas (alumínio)*	Nenhuma	Nenhuma	Nenhuma	Nenhuma
Revestimento interno de cx. de leite*	Nenhuma	Leve	Leve	Leve
Revestimento interno de cx. de achocolatado*	Nenhuma	Nenhuma	Nenhuma	Nenhuma
Tampa plástica metalizada emb. iogurte*	Nenhuma	Nenhuma	Nenhuma	Nenhuma
Tampa de papinha - revestimento*	Leve	Leve	Leve	Leve
Embalagem de queijo*	Nenhuma	Nenhuma	Nenhuma	Nenhuma

Legenda: PBAT: poli(butileno adipato co-tereftalato); PEBD: polietileno de baixa densidade; PP: polipropileno; PPBM: polipropileno biorientado metalizado, (*) face interna.

A análise da biorreatividade dos materiais avaliados (Tabela 7) indica que a maioria das amostras não foram reativas ou apresentaram leve reatividade pela identificação de algumas células mal formadas ou degeneradas sob avaliação microscópica. Amostras similares haviam sido testadas por Machado (2016) e apresentaram resultados idênticos, ex.: PBAT, revestimento interno de embalagem de leite, embalagem metálica e de queijo.

Dentro do grupo das amostras que apresentaram leve reatividade, é importante destacar o revestimento interno da tampa metálica utilizada nas embalagens de comida para bebês, normalmente produzidas a base de resinas epóxi que também pode estar presente no revestimento interno de algumas latas para alimentos e bebidas. Estas resinas podem conter bisfenol A e epícloridrina (BESERRA, 2012). Diversos estudos discutem os efeitos adversos

à saúde pela migração destas substância para o alimento acondicionado (LAKIND et al., 2011; KAZEMI et al., 2016; SILVA, 2016). A nível de citotoxicidade Ribeiro (2015) analisou exposição de células da linhagem MCF-7 e HL-60 ao bisfenol A, em um período de 24 horas de incubação, e identificou o aumento do estresse oxidativo, perda da atividade respiratória mitocondrial e perda da integridade da membrana plasmática.

Os polímeros PEBD, PPBM e PP muito utilizados na composição de embalagens de uso alimentício apresentaram maior reatividade, principalmente quando avaliadas por contato direto. Entretanto, a leitura após 48 h não demonstrou aumento de resposta, exceto para o PEBD no ensaio de difusão. Machado (2016) observou resultados similares para estes polímeros durante o desenvolvimento e implementação da metodologia.

A análise da composição da embalagem cartonada utilizada para acondicionar o leite longa vida informa a presença de papel, alumínio e plástico na sua constituição, sendo o PEBD um dos polímeros mais utilizados nas quatro das seis camadas da embalagem, correspondendo a 20% do seu peso total (ALVARENGA, 2012). Fazendo um paralelo com o resultado encontrado na avaliação isolada do PEBD pode-se inferir que a possível presença deste polímero na constituição da embalagem tenha sido responsável pela leve resposta citotóxica da embalagem de leite. Por outro lado, a amostra da embalagem de achocolatado não apresentou nenhum sinal de reatividade, o que pode estar relacionado com a presença de polímeros mais inertes, como o PEAD (Tabela 7).

Os fatores que afetam a migração de contaminantes em embalagem incluem a difusão da substância na matriz polimérica, sua dispersão na matriz alimentícia, tempo e temperatura de contato. A baixa massa molecular dos polímeros utilizados em embalagens e filmes para o contato direto com alimento, facilita o processo de migração, pois a transferência de substâncias da embalagem varia de acordo com a composição do material processado (KONKOL et al., 2003).

Fischer e colaboradores (2003) em um estudo sobre influência da estrutura de polímero na viabilidade celular e hemólise, também utilizaram como indicadores de sobrevivência celular as alterações na morfologia e o desprendimento de células da placa de Petri através de uma minuciosa investigação microscópica. Entre as causas que geram mudanças no padrão morfológico, relatou-se a migração de monômeros, oligômeros e polímeros de baixa massa molecular, agentes de polimerização tais como catalisadores, emulsificantes, produtos de decomposição, iniciadores, aditivos e entre outras substâncias (COLTRO; MACHADO, 2011; LANDSIEDEL et al., 2012; NIOSH, 2012).

CONCLUSÃO

A validação demonstrou que as duas metodologias apresentam capacidade de responder de forma linear a estímulos citotóxicos, diferenciando a resposta de acordo com o tamanho da amostra. Tendo apresentado também boa precisão e robustez. O teste de seletividade, adaptado às características do ensaio, mostrou que as duas metodologias foram capazes de detectar a presença de resíduos de substância citotóxica em amostras originalmente inertes que foram contaminadas para o teste.

A validação foi essencial para comprovar que os métodos adaptados são adequados aos objetivos a que se destinam, sendo portanto capazes de gerar resultados confiáveis que podem ser interpretados de forma satisfatória.

As metodologias implementadas para o estudo da biorreatividade *in vitro* de materiais poliméricos adaptadas à linhagem das células Caco-2 de epitélio colorretal humano foram promissoras e portanto têm potencial para serem aplicadas na avaliação preliminar da citotoxicidade de embalagens, filmes biodegradáveis e convencionais, assim como de materiais poliméricos alternativos e componentes utilizados no processo de fabricação de embalagens destinadas ao uso alimentício. Além disso, a otimização dos métodos realizada durante o processo de validação corroborou para o aperfeiçoamento das técnicas a partir da definição dos parâmetros analíticos mais apropriados, como a dimensão da amostra (64 mm²), o diâmetro da placa de cultivo (60 mm), o uso de ágar na proporção de 1%, porém em menor volume (1,5 mL) na placa para melhorar a difusibilidade no ensaio indireto, assim como o volume de meio de apenas 400 µL no ensaio de contato direto e a observação de que 24 horas de incubação é suficiente, porém tempos maiores podem ser aplicados se necessário.

É importante estabelecer controle eficiente sobre os inúmeros componentes associados à fabricação de materiais utilizados para o contato direto com alimentos, uma vez que os materiais empregados não podem ser considerados totalmente inertes ou inócuos a saúde do consumidor. Este controle deve refletir principalmente a preocupação dos órgãos de regulamentação com relação à exposição crônica da população as substâncias presentes no alimento acondicionado decorrente do processo de migração entre embalagem e alimento.

Havendo disponibilidade de infraestrutura mínima para o cultivo celular, os métodos propostos têm custo relativo baixo e possuem execução simples, ao tempo que podem fornecer informações importantes, complementando assim estudos mais avançados para a avaliação da segurança no uso destes materiais para cadeia alimentar.

REFERÊNCIAS

AOAC INTERNATIONAL . Methods Committee Guidelines For Validation Of Qualitative And Quantitative Food Microbiological Official Methods Of Analysis. 2002.

Albuquerque MCC, Ribeiro CMS, Rabelo CRK, Siqueira BG, Marinha ABAS, Castro AM. Aplicações de enzimas na síntese e na modificação de polímeros. *Quim Nova* 2014;37:699-708.

Alencar JRB, Ramos SVV, Machado LB, Oliveira ATC, Monteiro DB, Medeiros FPM, Neto PJR. Validação de limpeza de zidovudina: estratégia aplicada ao processo de fabricação de medicamentos anti-retrovirais. *Rev Bras Cien Farm* 2004;40:1-8.

Alvarenga LM, Xavier TP, Barrozo MAS, Barcelos MS, Lira TS. Analysis of reaction kinetics of carton packaging pyrolysis. *Procedia Eng* 2012;42:113-122.

ASTM Standard F813 - 07, 2007. Standard Practice for Direct Contact Cell Culture Evaluation of Materials for Medical Devices. ASTM International, West Conshohocken, PA, 2003. Disponível em: www.astm.org DOI: 10.1520/F0813-07. Acessado em: 11 de Novembro 2017.

ASTM Standard F895-84, 2006. Standard Test Method for Agar Diffusion Cell Culture Screening for Cytotoxicity. ASTM International, West Conshohocken, PA, 2003. Disponível em: www.astm.org DOI: 10.1520/F0895-84R06. Acessado em: 11 de Novembro 2017.

Bansal S, DeStefano A. Key Elements of Bioanalytical Method Validation for Small Molecules. *The AAPS Journal* 2007;9:109-114.

Beserra MR, Schiavini JA, Rodrigues WC, Pereira CSS. O Bisfenol A: Sua Utilização e a Atual Polêmica em Relação aos Possíveis Danos à Saúde Humana. *R Eletr Teccen* 2012;5:37-46.

Bloch, M. *Method Validation in Pharmaceutical Analysis: A Guide to Best Practice*. Ed.: Ermer, J.; Miller, J.H.McB, Wiley - VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2005. 418p

Brasil, ANVISA - Agência Nacional De Vigilância Sanitária - “Resolução n. 166, de 24 de julho de 2017. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos”. 2017.

Brasil, ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. “Resolução n. 17, de 17 de março de 2008. Regulamento técnico sobre lista positiva de aditivos para materiais plásticos destinados à elaboração de embalagens e equipamentos em contato com alimentos”. 2008.

Brasil. *Farmacopeia Brasileira, v.1 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária*. Brasília: ANVISA, 2010.

Cassiano NM, Barreiro JC, Martins LRR, Oliveira RV, Cass QB. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. *Quim Nova* 2009;32:1021-1030.

Coltro L, Machado MP, Migração Específica de Antioxidante de Embalagens Plásticas para Alimentos. *Polímeros* 2011;21:390-397.

Dulbecco, R. Production of Plaques in Monolayer Tissue Cultures by Single Particles of an Animal Virus. *Proc Nat Acad Sci USA* 1952;38:747–752.

EMA - European Medicines Agency - Guideline on bioanalytical method validation. 2011.

FDA - U.S. Food and Drug Administration. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation. *Federal Register* 2013 ;44:1503-1507.

Fischer D, Li Y, Ahlemeyer B, Kriegelstein J, Kissel T. In vitro cytotoxicity testing of polycations: Influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials* 2003;24:1121–1131.

Franchetti SMM, Marconato JC. Polímeros Biodegradáveis – Uma solução parcial, para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. *Quim Nova* 2006;29:811-816.

González O, Blanco ME, Iriarte G, Bartolomé L, Maguregui MI, Alonso, RM. Bioanalytical chromatographic method validation according to current regulations, with a special focus on the non-well defined parameters limit of quantification, robustness and matrix effect. *J Chromatogr A* 2014;1353:10-27.

Groth T, Falk P, Miethke RR. Cytotoxicity of Biomaterials – Basic Mechanisms and In Vitro Test Methods: A Review. *ATLA* 1995;23:790-799.

Guess WL, Rosenbluth SA, Schmidt B, Autian J. Agar diffusion method for toxicity screening of plastics on cultured cell monolayers. *J Pharmacol Sci* 1965;54:1545-1547.

ICH – International Conference on Harmonization. Q2R1- validation of Analytical procedure: Text and Methodology, 2005.

ISO - International Standard 10993-12: Biological Evaluation of Medical Devices – Part 12: Sample Preparation and Reference Materials, 2007.

ISO - International Standard 10993-5: Biological Evaluation of Medical Devices – Part 5: Tests for Cytotoxicity: in vitro methods, 2009.

IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry. Harmonized guidelines for single- Laboratory validation of methods of analysis. *Pure Appl Chem* 2002;74:835–855.

Kazemi S, Feizi F, Aghapour F, Joorsaraee GA, Moghadamnia A. Histopathology and histomorphometric investigation of bisphenol A and nonylphenol on the male rat reproductive system. *North Am J Med Sci* 2016;8:215-221.

Konkol LM, Cross RF, Harding IH, Kosior E. Contaminants and levels of occurrence in washed and shredded poly(ethylene terephthalate) from curbside collection. II: Validation of extraction procedures, particle size sampling and crystallinity. *Food Addit Contam* 2003;20:972-98.

La Roca MF, Sobrinho JLS, Nunes LCC, Neto PJR. Desenvolvimento e validação de método analítico: Passo importante na produção de medicamentos. *Rev Bras Farm* 2007;88:177-180

Lakind JS, Naiman DQ. Daily intake of bisphenol A and potential sources of exposure: 2005–2006 National Health and Nutrition Examination Survey. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2011;21:272-279.

Landsiede LR, Fabian E, Ma-Hock L, Ravenzwaay VB, Wohlleben W, Wiench K, Oesch F. Toxicokinetics of nanomaterials. *Arch Toxicol* 2012;86:1021–1060.

Machado PIAP. Bioensaios para avaliação da citotoxicidade de embalagens alimentícias e componentes utilizados em sua produção, 2016. Mestrado em Ciências dos Alimentos - Faculdade de farmácia - Universidade Federal da Bahia - Salvador.

Maciel BV, Franco TT, Yoshida PMC. Sistemas inteligentes de embalagens utilizando filmes de quitosana como indicador colorimétrico de temperatura. *Polímeros* 2012;22:318-324.

NIOSH – National Institute for Occupational Safety and Health. Filling the Knowledge Gaps for Safe Nanotechnology in the Workplace. In A Progress Report from the NIOSH Nanotechnology Research Center, 2004–2011; Centers for Disease Control and Prevention: Atlanta, Department of Health and Human Services, National Institute for Occupational Safety and Health, GA, USA, 2012.

Nunes A, Oliveira J, Caldas DE. Exposição humana a substâncias químicas potencialmente tóxicas na dieta e os riscos para saúde. *Quim Nova* 2009; 32: 1898-1909.

Paschoal JAR, Rath S, Airoidi FPS, Reyes FGR. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. *Quim Nova* 2008; 31:1190-1198.

Pina ENCZ. Contaminantes em alimentos para crianças: Simulação *in vitro* do processo digestivo de nitratos 2011. Mestrado Departamento de biologia animal- Faculdade de ciências - Universidade de Lisboa. Portugal.

PMDA - Pharmaceuticals and Medical Devices Agency. Guideline on Bioanalytical Method (Ligand Binding Assay) Validation in Pharmaceutical Development. 2014.

Reijnders, L. Cleaner nanotechnology and hazard reduction of manufactured Nanoparticles. *J Clean Prod* 2006;14:124–133.

Restuccia D, Spizzirri UG, Parisi OI, Cirillo G, Curcio M, Iemma F, Puoci F, Vinci G, Picci N. New EU regulation aspects and global market of active and intelligent packaging for food applications. *Food Control* 2010; 21:1425–1435.

Rhim JW, Park HM, Ha CS. Bio-nanocomposites for food packaging applications. *Prog Polym Sci* 2013;38:1629-1652.

Ribani M, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim ICSF. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim Nova* 2004;27:771-780.

Ribeiro TLA. Efeito citotóxico, genotóxico e epigenéticos do Bisfenol A em células HL-60, MCF-7 e em ratos. 2015. Mestrado da Faculdade de Ciências Farmacêutica – Universidade de São Paulo.

Rogero SO, Lugão AB, Ikeda TI, Cruz AS. Teste in vitro de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. *Mat Res* 2003;6:317-320.

Shah U, Gani A, Ashwar BA, Shah A, Ahmad M, Ganil A, Wanil IA, Masoodi FA. A review of the recent advances in starch as active and nanocomposite packaging films. *Cogent Food Agric* 2015;1:1-9.

Silva MAA Avaliação da neurotoxicidade do Bisfenol A em cultura primária de hipocampo. 2016, Mestrado em Toxicologia e Análises Toxicológicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - São Paulo.

Silva AM, Sá AB, Franco LS, Silva TCC, Carvalho LMF. Contaminação em embalagens de alimentos industrializados. *Rev Saúde Foco* 2015;2: 107-114.

USP – The United States Pharmacopeia, Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 38 ed., 2015.

Veiga-Santos P, Oliveira LM, Cereda MP, Alves AJ, Scamparini, ARP. Mechanical properties, hydrophilicity and water activity of starch-gum films: Effect of additives and deacetylated xanthan gum. *Food Hydrocoll* 2005;19:341-349.