



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA – UFBA

FACULDADE DE FARMÁCIA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**BIOENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE
EMBALAGENS ALIMENTÍCIAS E COMPONENTES
UTILIZADOS EM SUA PRODUÇÃO**

PRÍSCILA ITAITIANA AZEVEDO PINHEIRO MACHADO

SALVADOR - BAHIA

2016

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

FACULDADE DE FARMÁCIA

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA – UFBA

**BIOENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE
EMBALAGENS ALIMENTÍCIAS E COMPONENTES
UTILIZADOS EM SUA PRODUÇÃO**

PRÍSCILA ITAITIANA AZEVEDO PINHEIRO MACHADO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos da Universidade Federal da Bahia, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientador: Prof^o. Dr. Cleber Alberto Schmidt

SALVADOR - BAHIA

2016

Sistema de Bibliotecas - UFBA

Machado, Priscila Itaitiana Azevedo Pinheiro.

Bioensaios para avaliação da citotoxicidade de embalagens alimentícias e componentes utilizados em sua produção / Priscila Itaitiana Azevedo Pinheiro Machado. - 2016.
83 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Cleber Alberto Schmidt.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia, Salvador, 2016.

1. Embalagens. 2. Segurança alimentar. 3. Testes de toxicidade. 4. Biopolímeros.
5. Células epiteliais. I. Schmidt, Cleber Alberto. II. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Farmácia. III. Título.

CDD - 688.8
CDU - 621.798.12



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

TERMO DE APROVAÇÃO

PRÍSCILA ITAITIANA AZEVEDO PINHEIRO DA SILVA

BIOENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE EMBALAGENS ALIMENTÍCIAS E COMPONENTES UTILIZADOS EM SUA PRODUÇÃO

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 abril de 2016.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Cleber Alberto Schmidt
Universidade Federal da Bahia
Orientador

Dr. Daniel Pereira Bezerra
Fundação Oswaldo Cruz

Dr^a. Itaciara Larroza Nunes
Universidade Federal da Bahia

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu Deus maravilhoso por ter respondido às minhas orações, por ter me fortalecido quando eu mais necessitei e por estar sempre ao meu lado. A ELE seja dada toda honra e toda glória.

À minha avó Amanda por me ajudar sempre, pelo esforço e pela luta intercedida em meu nome, sem ela provavelmente eu não teria chegado até aqui.

À minha mãe, pela ajuda, torcida, por confiar em mim e por acreditar na minha capacidade.

Aos meus irmãos, Carla e Pablo por estarem sempre presentes na minha caminhada, agradeço ao apoio e incentivo.

Ao meu marido **Ivo** por me ceder todo amor, carinho, pelo companheirismo, pelas palavras de incentivo e força nos momentos incertos e por acreditar sempre na minha vitória.

O meu **imenso** agradecimento ao meu orientador, Prof^o Dr. **Cleber Alberto Schmidt**, pela dedicação, paciência, apoio, empenho, pela oportunidade, compreensão e por contribuir significativamente na minha formação.

À Luzinete, por todo o apoio, dedicação, carinho, força, pelas ajudas, pelo cuidado, por ter me recebido de braços abertos e me ensinado muito da vida durante o tempo de convívio e trabalho.

Aos meus familiares pelo apoio, ajuda e pela confiança depositada.

As meninas do Laboratório de Controle Microbiológico, de Produtos Farmacêuticos e Cosméticos, Thaís, Carla, Tamara, Thailana, Ayla, Flávia pela luta contínua, pela amizade e pelos momentos alegres. Ao amigo de laboratório, André pela disposição, ajuda, confiança e amizade.

À amiga Graciete, pela ajuda, companheirismo, amizade, o seu apoio foi imprescindível nessa jornada.

Aos professores do Programa de Pós Graduação, pela dedicação, contribuição e apoio.

Aos amigos de turma Túlio, Cleonice, Fredy, Emerson, Érica, Walkia, Cíntia, pelo companheirismo, força, torcida e pelos momentos que dividimos durante a caminhada. Todos os amigos da turma 2014.1 que não foram relacionados, mas que com certeza fizeram parte dessa conquista.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia pela concessão da bolsa de estudos.

A todos os funcionários da Universidade Federal da Bahia, pela contribuição, e a todos os que não tenham sido citados, mas que tiveram sua contribuição na execução e conclusão deste projeto, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Tradicionalmente, os materiais de embalagens têm sido selecionados no sentido de ter a mínima interação com o alimento que acondicionam, devendo constituir, portanto uma barreira inerte, com função de proteger o produto embalado. A personalização de embalagens planejadas para corrigir deficiências das embalagens passivas, utilizando matrizes biodegradáveis, aditivos naturais e nanopartículas, tem sido amplamente desenvolvida. No entanto, ainda é necessário obter mais dados a respeito da segurança toxicológica destes materiais, cuja taxa de migração das nanopartículas e outros elementos da embalagem para o alimento ainda é muito pouco conhecida. Este trabalho tem por objetivo implementar as metodologias para avaliação da biorreatividade *in vitro* de materiais poliméricos de uso médico-hospitalar descritas em protocolos internacionais e nas Farmacopeias, e adaptá-las à linhagem Caco-2, com a finalidade de avaliar a citotoxicidade de embalagens de uso alimentício e componentes utilizados em sua produção. Utilizou-se linhagem específica de células epiteliais intestinais, denominada Caco-2. A biorreatividade das amostras também foi testada na linhagem de fibroblastos L929 e SIRC para efeito de comparação dos resultados obtidos nos ensaios de contato direto e indireto. As amostras foram incubadas durante 24h e sua reatividade foi determinada a partir da visualização direta do efeito sobre a monocamada celular fixada em placas de 60 mm. Um total de 20 amostras foram analisadas e observou-se que 40% das amostras apresentaram alguma reatividade quando em contato direto com as células Caco-2, sendo 15% das respostas classificadas como reatividade suave a moderada. Quando submetidas ao teste de difusão em ágar, 20% das amostras revelaram algum grau de resposta, sendo 5% de reatividade suave a moderada. As amostras solúveis ou micronizadas foram avaliadas pelo ensaio de redução do metil-tiazol-tetrazólio (MTT) utilizando as células Caco-2. Os resultados obtidos nos ensaios de contato, com as células intestinais Caco-2, foram muito semelhantes às respostas observadas com as tradicionais células fibroblásticas L929, o que demonstra a adequação e a sensibilidade da linhagem Caco-2 ao ensaio. O ensaio de MTT revelou que a maioria das amostras não interferiu na viabilidade celular nas condições avaliadas, apenas 2 amostras de glicerina residual de biodiesel, utilizadas como substrato alternativo no processo fermentativo para produção de biopolímeros, apresentaram citotoxicidade quando testadas em concentrações superiores a 12,5% (v/v). A adaptação das técnicas comumente utilizadas na avaliação da citotoxicidade de materiais poliméricos de uso médico-hospitalar mostrou-se bastante promissora quando aplicada em embalagens alimentícias e polímeros convencionais ou biodegradáveis, assim como, nos componentes empregados na sua fabricação. De forma análoga a qualquer ensaio *in vitro* para estudo da toxicidade, a correlação da resposta obtida com os prováveis efeitos no organismo depende da avaliação conjunta com outras técnicas uma vez que estes bioensaios são, notadamente, mais sensíveis e devem ser considerados como preliminares na avaliação da citotoxicidade.

Palavras chave: Embalagens. Segurança alimentar. Citotoxicidade. Biopolímeros. Células Caco-2.

ABSTRACT

Currently, packaging materials have been selected in order to have minimal interaction with the food and, therefore, they should be an inert barrier with function of protecting the packaged product. Customizing of planned packaging in order to correct deficiencies of the passive packaging materials using biodegradable matrices, natural additives and nanoparticles has been widely studied. However, we still need more data on the toxicological safety of these materials, whose migration rate of the nanoparticles and other elements from the packaging is still very little known. The main of this work was to implement, adapt and test Pharmacopeial in vitro methodologies used to evaluate the biological reactivity of plastics and elastomers from medical devices or for pharmaceutical purposes, in order to assess the cytotoxicity of packaging and biodegradable or conventional films, as well as, alternative polymeric materials and other components used in the manufacturing process of films intended for food use. It was used the Caco-2 cell line, a specific strain of intestinal epithelial cells. The biological reactivity, in the contact tests, was also evaluated in L929 fibroblast strain. Samples were incubated for 24 hours and their reactivity was determined by direct visualization of the effect on the cell monolayer fixed in 60 mm plates. It was observed that 40% of the samples showed some reactivity when tested in direct contact with the Caco-2 cells, 15% of them were classified as mild to moderate reactivity. When subjected to the agar diffusion test, 20% of the samples showed some degree of response, where 5% of them with mild to moderate reactivity. The results obtained in the contact assay with the intestinal Caco-2 cells were very similar to the observed responses with the traditional L929 fibroblast cells, demonstrating the suitability and sensitivity of the Caco-2 cell line to the assay. Soluble or micronized samples were evaluated by the tetrazolium blue reduction test (MTT) using Caco-2 cells. The MTT assay showed that only 2 glycerin samples, used as alternative substrate in the fermentation process for biopolymers production, presented cytotoxicity when tested at concentrations higher than 12.5% (v/v). The adjustment of the techniques commonly used to assess the cytotoxicity of polymeric materials for medical devices, proved to be very promising when applied to food packaging and conventional or biodegradable polymers, as well as the components used on packaging manufacture. Analogous to any in vitro assay of toxicity studies, the correlation of the generated response with the effects on the human body depends also of the evaluation together other suitable techniques, since these bioassays are markedly more sensitive and should be regarded as preliminary data in evaluation of cytotoxicity.

Key words: Food packaging. Food safety. Cytotoxicity. Biopolymers. Caco-2 cells.

LISTA DE ABREVIações

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

PEUAMM - Polietileno de ultra-alta massa molar

EVA - Etileno-vinil acetato

PHAs - Polihidroxicanoatos

PLA - Polilactato

PHB - Polihidroxibutirato

PA - Polímero de amido

GX - Goma xantana

FDA - Food and Drug Administration

TPS - Termoplástico

PCL - Policaprolactona

PBAT - Poli(butileno adipato-co-tereftalato)

DMT - Dimetiltereftalato

CNCs - Nanocristais de celulose

CNWs - Nanowhiskers celulose

NRU - Neutral Red Uptake - Ensaio de captação do corante Vermelho Neutro

MTT - Ensaio de captação do corante Tetrazólio (atividade metabólica mitocondrial)

LDH - Lactato desidrogenase

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

NICEATM - *Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods* - Central de Interagências para a Avaliação de Métodos Toxicológicos Alternativos.

ICCVAM - *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods* - Comitê Coordenador Interagências para a Validação de Métodos Alternativos.

GC - Glicerina Bruta

MEM - Meio Eagle Modificado

UR - Umidade relativa

DMSO - Dimetilsulfóxido

FBS - Soro fetal bovino

CHO - Células de ovário de hamster chinês

BHK - Células renais de hamster

RL4 - Células hepáticas de rato

CAS - Caseína sódio

CM - Quitosana malato

NA - Nanopartículas de amido

IDA - Ingestão Diária Aceitável

LISTA DE SÍMBOLOS

μL - microlitro

μg - micrograma

μm - micrômetro

S - Enxofre

NaOH - Hidróxido de sódio

Cd - Cádmio

Cr - Crômio

As - Arsênio

Ca - Cálcio

Mg - Magnésio

P - fósforo

N - Nitrogênio

P - Fósforo

Mg - Magnésio

O - Oxigênio

K - Potássio

S - Enxofre

C - Carbono

H - Hidrogênio

pH - Potencial hidrogeniônico

O₂ - Gás oxigênio

CO₂ - Gás carbônico

KM_nO₄ - Permanganato de potássio

H₂SO₄ - Ácido sulfúrico

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

TABELA 1 – Classificação da reatividade celular para o ensaio de difusão em ágar e por contato direto.....58

TABELA 2 - Biorreatividade das amostras e controles, após 24 h de incubação, com células Caco-2 por contato direto e difusão em ágar.....65

TABELA 3 - Biorreatividade das amostras e controles, após 24 h de incubação, com fibroblastos L929 por contato direto e difusão em ágar.....68

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO II

QUADRO 1 - Amostras de filmes e embalagens de uso alimentício, bem como componentes utilizados na sua produção.....54

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

FIGURA 1- Micrografias de nanowhiscker de côco verde (A), nanowhiscker de milho (B), nanowhiscker de eucalipto (C) e nanowhiscker de licuri (D) obtidas por microscopia.....29

FIGURA 2- Células Caco-2 (A) 100µm e monocamada celular de células Caco-2 (B) com aumento de 100 vezes em microscópio ótico.....34

FIGURA 3- Células NCTC L929 (A) 100µm e monocamada celular de L929 com aumento de 100 vezes em microscópio ótico (B).....36

FIGURA 4- Monocamada celular de células SIRC observadas em microscópio ótico com aumento de 100 vezes.....36

CAPÍTULO II

FIGURA 1- Confluência celular obtida nas placas de 60 mm incubadas por 24 h com 4 mL da suspensão de 1×10^6 células.mL⁻¹ para (A) Caco-2, (B) SIRC e (C) NCTC L929.....59

FIGURA 2- Reatividade biológica (morte celular) das células Caco-2, SIRC e L929 no teste de contato direto (sem ágar) e de difusão (com ágar), utilizando fragmento de látex de 0,25 cm² como controle positivo.....61

FIGURA 3 - Zona de reatividade observada para o controle positivo (fragmento de látex: C+) sobre monocamada confluenta de células Caco-2, após 24h de contato, sem ágar (A) e com ágar (B).....62

FIGURA 4 - Ensaio de difusão em ágar com adição de corante vermelho neutro às células Caco-2 em contato com (A) o controle positivo e (B) controle negativo; e (C) células L929 em contato com o controle positivo.....62

FIGURA 5- Exemplos de classificação da biorreatividade em graus (A) leve, (B) suave, (C) moderado e (D) forte, observados nas células Caco-2 após 24 h de contato direto com a amostra. Área pontilhada indica a posição da amostra.....63

FIGURA 6- Exemplos de respostas observadas no ensaio por contato direto Caco-2. (A) PHA-P, (B) PPBM, (C) PP, apresentaram citotoxicidade. (D) Acetato + baunilha, (E) embalagem de produtos cárneos, (F) PBAT + NA, não apresentaram citotoxicidade.....66

FIGURA 7- Exemplos de respostas observadas no ensaio por contato indireto em células Caco-2. (A) embalagem de doce de amendoim; (B) PEBD; (C) PPBM, apresentaram citotoxicidade. (D) embalagem para produtos cárneos; (E) embalagem de patê; (F) PP, não apresentaram citotoxicidade.....67

FIGURA 8- Amostra embalagem metálica: (A) lata de leite condensado; (B): lata de leite em pó. Sem irregularidades ou danos na monocamada celular.....69

FIGURA 9- Viabilidade celular (%) das células Caco-2 após 24 h de contato com as amostras de nanowhiskers (NW) de milho, côco, eucalipto, licuri e nanopartículas de amido (NA) de mandioca, determinada por meio do ensaio de MTT. Barra de erro: desvio padrão da média.....72

FIGURA 10- Fotomicrografia dos nanowhiskers de (A) milho $333\mu\text{g.mL}^{-1}$; (B) de licuri $333\mu\text{g.mL}^{-1}$ e (C) de eucalipto $333\mu\text{g.mL}^{-1}$ em contato com as células Caco-2 durante o ensaio de MTT. Aumento de 100x.....74

FIGURA 11- Viabilidade celular (%) das células Caco-2 após 24 h de contato com a goma xantana “G” e “C”, determinada por meio do ensaio de MTT. Barra de erro: desvio padrão da média.....74

FIGURA 12- Viabilidade celular (%) das células Caco-2 após 24 h de contato com a glicerina P e C, determinada por meio do ensaio de MTT. Barra de erro: desvio padrão da média.....76

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
OBJETIVOS	18
Objetivo Geral	18
Objetivos Específicos	18
CAPÍTULO I	19
REVISÃO DE LITERATURA	20
1. Embalagens de alimentos	20
2. Polímeros convencionais para embalagens alimentícias	22
3. Biopolímeros	24
3.1 Polihidroxialcanoato (PHA)	25
3.2 Goma Xantana	26
3.2.1 Glicerina como substrato.....	26
4. Misturas de amido e poli(butileno adipato-co-tereftalato) (PBAT)	27
5. Uso de nanopartículas em filmes poliméricos	28
5.1 Nanocelulose.....	28
6. Migração de partículas	29
7. Ensaios de citotoxicidade <i>in vitro</i>	31
8. Cultivo Celular	33
9. Linhagens celulares	33
9.1 Células de adenocarcinoma do epitélio colorretal humano (Caco-2).....	33
9.2 Células do tecido conjuntivo subcutâneo de camundongo (L929).....	35
9.3 Células de córnea de coelho (SIRC)	36
REFERÊNCIAS	37
CAPÍTULO II	49

RESUMO	50
ABSTRACT	51
1. INTRODUÇÃO	52
2. MATERIAIS E MÉTODOS	54
2.1 Amostras	54
2.2 Materiais e equipamentos	55
2.3 Linhagens celulares	55
2.4 Preparo das amostras para ensaio de MTT	55
2.5 Preparo das amostras e controles para os testes de difusão em ágar e contato direto	55
2.6 Manutenção e preparo das células para os ensaios	56
2.7 Ensaios de biorreatividade por difusão em ágar e contato direto	56
2.7.1 Implementação e adequação dos ensaios.....	56
2.7.2 Realização dos ensaios.....	57
2.7.2.1 <i>Difusão em ágar</i>	57
2.7.2.2 <i>Contato direto</i>	57
2.7.3 Ensaio de redução do sal de tetrazólio – MTT.....	58
2.8 Análise Estatística	58
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
3.1 Implementação e adequação dos bioensaios	59
3.2 Citotoxicidade por contato direto e por difusão em ágar	64
3.3 Citotoxicidade por MTT	71
4. CONCLUSÃO	77
REFERÊNCIAS	79

INTRODUÇÃO

A principal função da embalagem é proteger e preservar o alimento, de forma a manter a sua qualidade e segurança por um período maior de tempo, reduzindo assim o seu desperdício (CHAUDHRY et al., 2008). O material de embalagem usado deve atender aos critérios de preservação do alimento e de seus nutrientes, resguardar da ação de fatores ambientais, tais como luz, umidade, oxigênio e microrganismos, de forma a impedir ou dificultar o contato entre o ambiente externo e o produto em seu interior, além de assegurar a integridade do produto durante o transporte e armazenamento (SARANTÓPOULOS et al., 2002).

Não pode haver dúvida de que as modernas tecnologias e materiais de embalagem de alimentos cumprem essas funções já que as mesmas desempenham um papel chave no fornecimento de alimentos seguros e nutritivos (CHAUDHRY et al., 2008). As embalagens constituídas de materiais plásticos convencionais como polietileno (PE), polipropileno (PP) e de policloreto de vinila (PVC), apesar de possuírem excelentes propriedades mecânicas e de barreira são consideradas não-biodegradáveis, pois são inertes à ação microbiana e necessitam de um longo tempo para se decomporem na natureza (SHAH et al., 2015).

Na busca contínua da evolução nesta área, diversos estudos têm avaliado o desenvolvimento de sistemas de embalagens com o objetivo de interagir com o alimento (VEIGA-SANTOS et al., 2005a; 2005b; GRISI et al., 2008; SILVA, 2009; MACHADO et al., 2010; SOUZA et al., 2011). São utilizadas matrizes biodegradáveis e aditivos naturais planejados, cujo objetivo é corrigir deficiências das embalagens passivas, tornando-as embalagens biodegradáveis ativas (MACHADO et al., 2012). A origem dos polímeros utilizados nestas embalagens é muito variada, podendo ser obtidos de fontes agrícolas (vegetal e animal), química e biotecnológica, inclusive de origem microbiana. E sua composição também é muito variada uma vez que estes polímeros podem ser misturados em diferentes proporções ou receber aditivos para aperfeiçoar as suas propriedades físico-químicas e conferir biofuncionalidade, melhorando a conservação do alimento embalado (RHIM et al., 2013).

Dentre os biopolímeros atualmente disponíveis, os mais interessantes do ponto de vista comercial são os ácidos polilácticos (PLA), poli-hidroxialcanoatos (PHAs) e o amido, pois podem ser processados por equipamentos convencionais de conversão, têm um equilíbrio satisfatório das propriedades funcionais e são produzidos em larga escala

a preços competitivos. No entanto os biopolímeros na sua forma pura são menos estáveis e têm propriedade de barreira geralmente inferior à dos polímeros convencionais. Por este motivo, os plásticos biodegradáveis precisam receber mais aditivos. Podem ocorrer interações indesejáveis e migração de substâncias em maior ou menor grau para o alimento. No entanto, a literatura ainda é escassa em relação a estudos sobre a avaliação da segurança de embalagens alimentícias produzidas com polímeros biodegradáveis, principalmente no que diz respeito a testes de migração de compostos para os alimentos (SCARFATO et al., 2015). A indústria de alimentos está constantemente buscando novas tecnologias para melhorar a qualidade, vida útil, segurança e rastreabilidade de seus produtos. O advento da nanotecnologia abriu novas possibilidades para o desenvolvimento de materiais com propriedades melhoradas para utilização como embalagens primária de alimentos. Portanto, não é surpreendente que um dos setores ansiosos para abraçar a nanotecnologia e concretizar os seus benefícios potenciais seja a indústria de alimentos. Um grande número das maiores empresas mundiais desta área já exploram ou realizam estudos visando o aproveitamento potencial de nanomateriais para uso em alimentos ou nas suas embalagens (CHAUDHRY et al., 2008).

Por outro lado, muito pouco se sabe a respeito da segurança toxicológica que este tipo de embalagem funcional pode representar para o organismo humano, cuja taxa de migração das nanopartículas para o alimento ainda é muito pouco conhecida. Nanocompósitos possuem grande potencial para aplicação no setor de embalagens de alimentos, pois são materiais inovadores que apresentam propriedades funcionais interessantes na promoção da proteção e segurança dos alimentos. Entretanto, ainda existem importantes considerações a respeito da segurança toxicológica do uso de nanocompósitos em embalagens que entram em contato com os alimentos (RHIM et al., 2013). Estudos *in vitro* com cultura de células para estimar a resposta humana têm papel fundamental na avaliação da citotoxicidade das mais variadas substâncias. A aplicação destes bioensaios para avaliar a toxicidade de materiais poliméricos de aplicação farmacêutica já está bem fundamentada, uma vez que estas técnicas tiveram origem na década de 60, com a preocupação de avaliar a inocuidade de plásticos de embalagens de uso farmacêutico ou de materiais de uso médico-hospitalar (WILSNACK, 1976; GAD, 2000).

Institutos Internacionais como a Sociedade Americana de Ensaio e Materiais (*American Society for Testing and Materials – ASTM*) e a Organização Internacional para Padronização (*International Organization for Standardization - ISO*) já disponibilizam normas padronizadas para ensaios de citotoxicidade de materiais poliméricos para uso médico-hospitalar, odontológico e farmacêutico (ISO, 2007; 2009; ASTM, 2006; 2007). As Farmacopeias Americana (USP, 2015) e Brasileira (BRASIL, 2010) também preconizam metodologias *in vitro* para avaliação preliminar da reatividade biológica destes materiais em células fibroblásticas, como por exemplo, linhagem L929 de camundongo. Estas células mimetizam os tecidos conjuntivos que normalmente entram em contato com estes materiais, permitindo uma estimativa da sua biorreatividade quando em contato com o organismo humano.

Os ensaios de biorreatividade são úteis na avaliação da citotoxicidade dos mais variados materiais e substâncias. Em geral, os ensaios com cultura de células apresentam boa correlação com os ensaios *in vivo*. A vantagem dos métodos *in vitro* consiste em poder limitar o número de variáveis experimentais, obter dados significativos de forma mais fácil em um curto período de tempo, fornecendo resultados preliminares da interação entre a amostra e a matriz biológica, possibilitando a avaliação da necessidade de testes posteriores em animais (ROGERO et al., 2003).

O uso dos métodos que definem a citotoxicidade basal, ou seja, que identificam a habilidade de um componente em causar morte celular como consequência de danos nas funções básicas das células apresenta boa correlação com a toxicidade aguda em animais e no homem (EISENBRAND et al., 2002).

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Este trabalho tem por objetivo implementar as metodologias para avaliação da biorreatividade *in vitro* de materiais poliméricos de uso médico-hospitalar descritas em protocolos internacionais e nas Farmacopeias, e adaptá-las à linhagem Caco-2, com a finalidade de avaliar a citotoxicidade de embalagens de uso alimentício e componentes utilizados em sua produção.

Objetivos Específicos

- Adequar técnicas de avaliação da citotoxicidade e reatividade biológica *in vitro* empregadas na avaliação de polímeros plásticos e outros compostos químicos de aplicação farmacêutica, para o estudo da inocuidade de materiais poliméricos destinados ao uso em embalagens alimentícias.
- Avaliar a inocuidade de embalagens de alimentos, filmes convencionais e funcionais, assim como de componentes utilizados em sua produção, através de ensaios com linhagem celular do epitélio colorretal humano – Caco-2.
- 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.
- Obter dados a respeito da inocuidade destes materiais, dando suporte aos estudos de desenvolvimento de embalagens ativas e funcionais mais seguras para o uso na indústria alimentícia.

CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA

REVISÃO DE LITERATURA

1. Embalagens de alimentos

Embalagens tradicionais para fins alimentícios são barreiras passivas destinadas a retardar os efeitos adversos do ambiente sobre o produto alimentar (BRODY et al., 2010). Geralmente, os materiais para a elaboração de embalagens têm sido selecionados com o objetivo de possuir a menor interação com o produto que acondicionam. Diante disso, as embalagens atuam como barreiras inertes, com a função principal de proteger o produto embalado, sem que ocorra interação com o mesmo (VEIGA-SANTOS et al., 2005). Materiais poliméricos derivados do petróleo são amplamente utilizados devido à sua versatilidade, boas propriedades mecânicas e baixo custo, mas o acúmulo de grandes quantidades desses polímeros sintéticos convencionais podem causar impactos ambientais (BRODY et al., 2010; JIMÉNEZ et al., 2012). Problemas causados pelo descarte inadequado e excessivo desses plásticos têm motivado o desenvolvimento, produção e aplicação de polímeros biodegradáveis em embalagens (MÜLLER et al., 2009).

O desenvolvimento de materiais de embalagem biodegradáveis produzidas a partir de recursos naturais renováveis tem recebido cada vez mais atenção. Muitos conceitos novos nas embalagens de alimentos foram introduzidos para satisfazer as exigências dos consumidores (SOUZA et al., 2013). Entretanto, novas linhas de pesquisa têm surgido nas últimas décadas com o objetivo de desenvolver embalagens que interajam com o produto embalado, incorporando vantagens adicionais para estas. Muitas dessas embalagens ativas têm sido desenvolvidas a partir de matérias-primas naturais, tanto a matriz polimérica como os aditivos funcionais incorporados (MACHADO, 2011). Existe uma ênfase nas embalagens ativas, cujo conceito está baseado na interação deliberada entre a embalagem e o produto e/ou seu ambiente direto, de forma a melhorar a qualidade e a segurança alimentar. Os principais avanços nesta área dizem respeito a tecnologias que promovam o retardo ou diminuição nos processos oxidativos, na taxa de respiração, no crescimento microbiano e na migração de misturas. Outros exemplos são as tecnologias que promovem a emissão ou absorção de dióxido de carbono, adsorção de odores, remoção de etileno e liberação de aromas (DAINELLI et al., 2008; RESTUCCIA et al., 2010).

Embalagens antioxidantes constituem um importante tipo de embalagem ativa, representando uma técnica de conservação de alimentos muito promissora para

prolongar a vida de prateleira de produtos alimentares (LÓPEZ-DE-DICASTILLO et al., 2012). A incorporação de antioxidantes em películas de embalagem biodegradáveis está em foco, pois a oxidação é uma das principais causas da deterioração dos alimentos (SOUZA et al., 2011; PEREIRA-DE-ABREU et al., 2011). Ácidos fenólicos, terpenos, tocoferóis, carotenóides e vitaminas são importantes antioxidantes naturais que têm sido propostos para incorporação em embalagens visando melhorar a estabilidade e prolongar o armazenamento de produtos suscetíveis a este processo degradativo (SIRIPATRAWAN; HARTE, 2010; LOPEZ-DE-CASTILHO et al., 2012; CAVAR; MAKSIMOVÉ, 2012).

Alguns estudos descrevem a incorporação de aditivos naturais em embalagens, como, por exemplo, extrato de erva mate (MACHADO, 2011), polpa de manga e acerola (SOUZA et al., 2011), dendê (GRISI et al., 2008), café e cacau (SILVA, 2009) entre outros, cujo objetivo é de corrigir deficiências das embalagens passivas. Os aditivos naturais incorporados auxiliam na manutenção das características sensoriais e microbiológicas destes alimentos, a depender da sua finalidade (VEIGA-SANTOS et al., 2005; VEIGA; DRUZIAN, 2007; MALI et al., 2010; MACHADO et al., 2010).

As embalagens alimentares com propriedades antimicrobianas, têm recebido atenção em função dos problemas comerciais e de saúde associados com surtos de doenças transmitidas por alimentos contaminados por patógenos (NEWELL, 2010). A aplicação deste método pode melhorar a segurança alimentar através da inibição de bactérias patogênicas ou controlar a deterioração do alimento utilizando quantidades mínimas de compostos ativos incorporados nas embalagens (MA, 2013).

A introdução de substâncias antimicrobianas naturais ou sintéticas na composição de embalagens é amplamente descrita na literatura, por exemplo, quitosana de baixo e médio peso molecular, ácidos orgânicos como ácido benzoico e ácido sórbico na forma tradicional e seus equivalentes nanosolubilizados, misturas comerciais de ácidos orgânicos para revestimento de alimentos (CRUZ-ROMERO et al., 2013); adição de timol e carvacrol em filmes de polipropileno (PP) (RAMOS et al., 2012);

As substâncias antimicrobianas naturais geralmente reconhecidas como seguras (*GRAS*) ou não (*não-GRAS*) tem sido utilizadas em papéis, termoplásticos ou similares para evitar a contaminação por *Listeria monocytogenes*, *E. coli* e fungos. Uma série de compostos antimicrobianos químicos também são adicionados aos polímeros utilizados em embalagens alimentícias, com destaque para os seguintes, triclosan; dióxido de cloro

e de carbono; ácidos propiônico, benzoico, sórbico, acético, láctico e málico; fungicidas; bacteriocinas; parabenos; ácidos cinâmico, cafeico e *p*-cumárico, e metais, como o nitrato de prata. Já existem muitas embalagens comercialmente disponíveis contendo estes compostos incorporados (APENDINNI; HOTCHKISS, 2002).

Além dos compostos citados por Apendinni e Hotchkiss (2002), também destacam o uso de hexametilenotretamina (HMT), compostos de amônio, antibióticos peptídicos, enzimas, ácidos graxos, íons de prata e cobre, fenóis, oligo e polissacarídeos, óleos essenciais entre outros.

É importante destacar que o desenvolvimento de embalagens ativas, inteligentes, funcionais e biodegradáveis é notadamente uma necessidade nos dias atuais, entretanto em todos os estudos acima citados e, em vários outros que a literatura disponibiliza, foi encontrado pouco, ou quase nenhuma referência quanto aos aspectos toxicológicos envolvidos na incorporação de tal gama de substâncias ou modificação das propriedades dos filmes alimentícios. Quando alguma referência está presente, se restringe apenas pela indicação do código de autorização de uso emitido pela autoridade sanitária do país, ou pela presença do acrônimo GRAS, indicando que a substância tem o grau de “geralmente reconhecida como segura” pelas agências regulatórias.

2. Polímeros convencionais para embalagens alimentícias

Polímeros são macromoléculas caracterizadas por seu tamanho, estrutura química e interações intra e intermoleculares. Possuem unidades químicas ligadas por covalência, repetidas regularmente ao longo da cadeia, cuja repetição do monômero indica o grau de polimerização (MANO; MENDES, 1999). A literatura caracteriza os polímeros de acordo com a cadeia molecular assim descrita: lineares, ramificadas ou com ligações cruzadas (BOWER, 2002).

Em função das suas características mecânicas, os polímeros podem ser divididos em termoplásticos, termorrígidos (termofixos) e elastômeros (borrachas). Os termoplásticos constituem a maior parte dos polímeros comerciais que, a depender do tipo do plástico podem dissolver-se em vários solventes. Os polímeros mais utilizados são: polietileno (PE), polipropileno (PP), poli(tereftalato de etileno) (PET), policarbonato (PC), poliestireno (PS), poli(cloreto de vinila) (PVC) (GORNI, 2003).

O polipropileno (PP) é um polímero termoplástico poliolefínico, essencialmente linear e altamente cristalino. Desde sua introdução no mercado em 1954, se tornou uma das mais importantes resinas termoplásticas da atualidade, devido a excelente combinação de propriedades térmicas e mecânicas associadas ao baixo custo. É muito utilizado em embalagens para alimentos e outras utilidades domésticas (ABREU et al., 2006).

O policloreto de vinila, comumente reconhecido por PVC, tem ampla aplicação industrial, pertence ao grupo químico dos vinílicos. O polímero em sua composição pura é muito rígido, porém o grande problema com o uso do PVC é a migração dos aditivos do plástico para o alimento. Por outro lado, ainda existe a grande toxicidade do monômero (cloreto de vinila). Tal toxicidade pode ocorrer durante a fabricação da resina e dos recipientes de PVC ou pela migração do monômero residual no plástico para o alimento. A legislação americana permite, no máximo 1 mg.kg^{-1} do monômero na estrutura polimérica das embalagens de PVC (JORGE, 2013).

O polietileno (PE) é obtido pela polimerização do etileno, que é uma olefina gasosa com dupla ligação e pode ser preparada por desidratação e por craqueamento. O PE é um dos polímeros com composição molecular mais simples, sendo basicamente um hidrocarboneto linear ou ramificado, saturado e com 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), PEUAMM (polietileno de ultra-alta massa molar) (GORNI, 2003; JORGE, 2013). Os polímeros sintéticos polietileno e polipropileno são os mais empregados como matrizes para o desenvolvimento de embalagens produzidas e comercializadas atualmente.

O uso de plásticos tem aumentado significativamente e sua aplicação tem permeado a maioria dos aspectos da vida humana e da produção industrial (YU et al., 1999). A matéria-prima dominante para a produção de plástico é o petróleo, que é não-renovável e também a principal fonte de energia para o mundo (YEZZA et al., 2007). A limitada disponibilidade futura de petróleo, aumento do preço dos combustíveis fósseis e as preocupações ambientais e de gestão de resíduos, devido a não-biodegradabilidade dos plásticos convencionais, têm impulsionado as buscas por alternativas mais sustentáveis, como os polihidroxicanoatos (PHAs), ácido polilático (PLA), poliésteres alifáticos, polissacarídeos, as misturas de amido e copolímeros de

polipropileno para substituir os plásticos derivados de petróleo (LEE, 1996; YU et al., 1999).

3. Biopolímeros

Além dos polímeros de origem química e sintética existem os naturais, cuja síntese envolve processos metabólicos complexos que ocorrem dentro das células microbianas ou vegetais (MANO; MENDES, 1999). Os biopolímeros têm grande potencial de aplicação nos mais diversos segmentos industriais, destacando-se a indústria alimentícia. A poluição ambiental gerada pelo uso em larga escala de polímeros sintéticos e sua dependência de recursos petrolíferos requer o desenvolvimento de vias alternativas na obtenção de polímeros ecologicamente corretos, como por exemplo, os biopolímeros de origem microbiana (LUENGO et al., 2003; KOLLER et al., 2007).

De acordo com Clarinval e Halleux (2005) os biopolímeros podem ser classificados de duas formas, de acordo com sua origem (fontes renováveis ou petroquímicas) ou conforme seu método produção, com destaque para as seguintes categorias:

- Os polímeros produzidos por síntese química convencional por exemplo, ácido polilático (PLA), poli(ϵ -caprolactona), poli(succinato de butileno) e álcool polivinílico.

- Polímeros produzidos por extração direta a partir da biomassa, por exemplo polissacarídeos, tais como amido, quitosana, celulose, pectina, proteínas, zeína de milho, gelatina, caseína, proteína de soja, glúten de trigo.

- Polímeros obtidos a partir de microrganismos por exemplo, poli-hidroxialcanoatos (PHAs), incluindo poli(β -hidroxibutirato) (PHB), poli(hidroxibutirato-co-valerato) (PHBV), celulose bacteriana, goma xantana e goma pululana.

- Polímeros produzidos por mistura (blendas), por exemplo, de PLA-PHA, amido-PLA, amido-PHB, amido-poli(ϵ -caprolactona), derivados de celulose-amido, amido-álcool polivinílico, PHA-queratina, quitosana-PLA e PHB-quitosana.

Os biopolímeros de maior interesse comercial são o PLA, o amido e os PHAs. O PLA é um poliéster produzido por síntese química a partir de ácido láctico obtido por fermentação bacteriana da glicose extraída do milho. Tem uso potencial na confecção de embalagens, itens de descarte rápido e fibras para vestimentas e forrações. Os polímeros de amido são polissacarídeos modificados quimicamente ou não, produzidos a partir de amido extraído de milho, batata, trigo ou mandioca, e tem aplicação na produção de embalagens e itens de descarte rápido (MATHEW; DUFRESNE, 2002; LU et al., 2000; MATHEW et al., 2008; GARCÍA et al., 2011).

3.1 Polihidroxialcanoato (PHA)

Os polihidroxialcanoatos (PHA) possuem propriedades materiais semelhantes aos plásticos petroquímicos (KHARDENAVIS et al., 2007; MIZUNO et al., 2010). Estes biopolímeros podem ser produzidos por diferentes espécies de bactérias e archaeobactérias, bem como por plantas geneticamente modificadas. Nas bactérias os PHA são produzidos sob condição de estresse nutricional, tal como limitação de fosfato ou nitrogênio, em conjunto com uma fonte de carbono em excesso no caldo de cultivo. O tipo de PHA produzido, tais como homopoliésteres, copoliésteres, terpoliésteres ou misturas de poliéster, depende da fonte de carbono (SUDESH et al., 2000).

A forma mais amplamente investigada e representativa de PHA é o poli-(3-hidroxiбутирато), ou simplesmente PHB. É um biopolímero termoplástico com propriedades mecânicas que são comparáveis às do polipropileno e polietileno (BARUD et al., 2011).

Para reduzir os custos de produção dos PHA, são utilizadas fontes de carbono alternativas no meio de fermentação, principalmente resíduos agro-industriais, tais como soro de leite, materiais lignocelulósicos e glicerina bruta residual obtida a partir da produção de biodiesel (YU et al., 2006; NATH et al., 2008; KOLLER et al., 2008; PANTAZAKI et al., 2009; BOSCO; CHIAMPO, 2010; MORALEJO-GARATE et al., 2013; GARCÍA et al., 2013).

3.2 Goma Xantana

A goma xantana (GX) é um biopolímero extracelular produzido por diversas bactérias Gram-negativas do gênero *Xanthomonas*. Sua estrutura primária é formada por unidades pentassacarídicas, geralmente constituída por cadeias lineares composta de duas unidades de glicose e ramificadas com duas unidades de manose e uma de ácido glicurônico (PALANIRAJ; JAYARAMAN, 2011). Em 1969 o FDA (Food and Drug Administration) aprovou seu uso na indústria de alimentos, que passou a se constituir em um produto com diferentes utilidades, tendo sua aplicação expandida para indústria farmacêutica, química e petroquímica (GARCÍA-OCHOA et al., 2000; FONTANIELLA et al., 2002).

Com base nos custos relativos do processo, a goma xantana produzida a partir de glicose ou de sacarose é ainda economicamente inviável, mas o uso de substratos oriundos de rejeitos agroindustriais tem sido uma alternativa para reduzir o custo final deste biopolímero (SHAH; ASHTAPUTRE, 1999; GARCÍA-OCHOA et al., 2000; THOMPSON; HE, 2006; KOJIMA et al., 2007). São exemplos de resíduos, extrato de alfarroba (ROSEIRO et al., 1992), água de lavagem de moinho de azeitona (LOPEZ; RAMOS-CORMENZANA, 1996), resíduos de citros (GREEN, 1994; BILANOVIC, 1994), ácido cítrico (JANA; GHOSH, 1995), soro de leite (YANG; SILVA, 1995; KONICEK et al., 1993) glicerina residual do biodiesel e resíduo líquido de sisal (ASSIS et al., 2014).

3.2.1 Glicerina como substrato

A glicerina bruta é um subproduto da indústria do biodiesel, é produzida a partir da reação de transesterificação de um óleo ou gordura com um álcool na presença de catalisadores. É um resíduo gerado em grandes volumes na produção de biodiesel (FELIZARDO, 2003; LEONETI et al., 2012). Para cada 100 kg de biodiesel produzido, são gerados, em média, 10 kg de glicerina bruta (AYOUB; ABDULLAH, 2012). Esta glicerina é impura e o custo significativo de purificação impede a sua utilização direta na indústria alimentícia e farmacêutica (ÇELIK et al., 2008). A glicerina bruta tem de 60-80% de pureza em comparação com sua forma purificada ou obtida por síntese (HAZIMAH; SALMIAH, 2003).

O emprego da glicerina como fonte alternativa de carbono em processos fermentativos reduz os custos de produção de polímeros e de outras substâncias de interesse comercial, como ácido succínico e ácido propiônico (NEVOIGT, 1997; WANG et al., 2001; ARRUDA et al., 2007; SILVA et al., 2009). Entre os desafios na utilização deste subproduto em processos fermentativos, destaca-se a necessidade de uma etapa de tratamento visando à remoção de impurezas e de sais como cloretos, fosfatos ou sulfatos de sódio ou potássio, os quais permanecem na fase do glicerol e podem interferir no metabolismo microbiano (REHMAN et al., 2008; ITO et al., 2005).

4. Misturas de amido e poli (butileno adipato-co-tereftalato) (PBAT)

Filmes de amido apresentam baixa permeabilidade aos gases O₂ e CO₂, e são utilizados em embalagens ativas na área de alimentos. Vários grupos de pesquisas estudam as características de filmes elaborados com amido termoplástico (TPS) e resinas biodegradáveis, as mais estudadas são os filmes de amido associado com polilactato (PLA), policaprolactona (PCL), polihidroxibutirato (PHB), poliesteramina e poli(butileno adipato-co-tereftalato) (PBAT) (AVÉROUS et al., 2001). Neste grupo, destaca-se o PBAT, um polímero biodegradável que apresenta propriedades mecânicas similares aos filmes de polietileno (KHEMANI et al., 2003), sendo considerado um copoliéster biodegradável pelas agências Européia, Americana e Japonesa (BASF, 2009). Suas propriedades mecânicas são semelhantes às do polietileno (PE) e sua combinação com biopolímeros, como o amido, pode resultar em filmes flexíveis com custo mais baixo e propriedades mecânicas e de barreira adequadas para utilização como embalagem de alimentos.

As especificações do PBAT indicam que embalagens à base desse polímero são indicadas para acondicionar frutos e hortaliças “*in natura*”, ou minimamente processadas, já que a porosidade e a permeabilidade ao vapor de água permitem que esses alimentos continuem respirando. Estudos têm sido feitos com embalagens à base de PBAT e amido em diferentes proporções comparadas com filmes de PBAT, utilizando propionato de cálcio [Ca (CH₃CH₂COOH)₂] como agente antimicrobiano e o permanganato de potássio (KMnO₄) como absorvedor de etileno. Os filmes foram usados para embalar acerola, que foi conservada por aproximadamente 10 dias (YAMASHITA et al., 2006).

5. Uso de nanopartículas em filmes poliméricos

Uma maneira atrativa de aumentar as performances mecânicas dos biopolímeros consiste em adicionar nanopartículas inorgânicas (LU et al., 2004; MIYAGAWA et al., 2005; LU; LAROCK, 2006) ou naturais (PETERSSON et al., 2007; JIANG et al., 2008) para preparar diferentes nanocompósitos de base biológica, obtendo assim melhores propriedades físico-mecânicas. Quando a matriz polimérica e o nanoreforço são derivados de recursos renováveis, o polímero é denominado de nanobiocompósito. Neste contexto, nanocristais de celulose (CNCs) ou nanowhiskers de celulose (CNWs) são excelentes candidatos para a melhoria das propriedades e aplicações dos polímeros de base renovável (HABIBI et al., 2010; HOLT et al., 2010 ; EICHHORN, 2011).

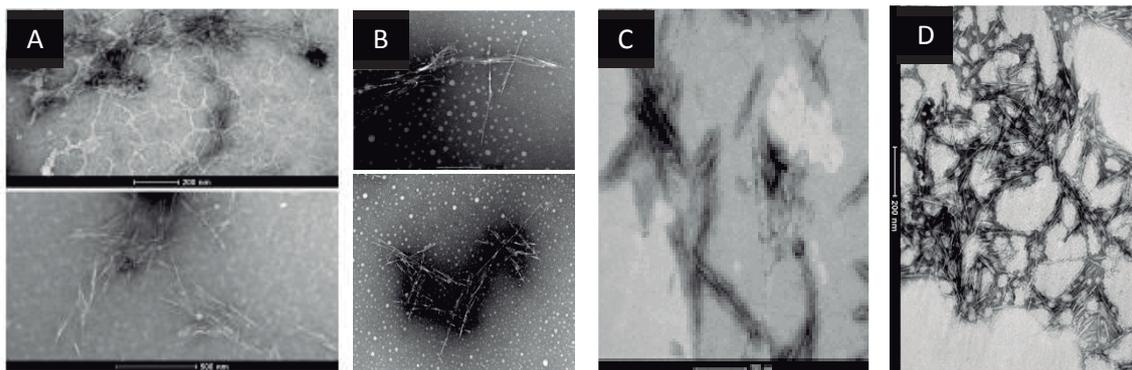
Além de nanopartículas de reforço, cujo papel principal é melhorar as propriedades mecânica e de barreira do material de embalagem, existem vários tipos de nanoestruturas responsáveis por outras funções, que conferem propriedades ativas ou "inteligentes" para o sistema de embalagem, tais como atividade antimicrobiana, imobilização de enzimas, biosensoriamento e outros (DE AZEREDO, 2009).

5.1 Nanocelulose

Os nanocristais de celulose são os domínios cristalinos de fontes celulósicas, obtidos através do processo de hidrólise ácida, possuindo características de elevada rigidez, alta cristalinidade e tamanho nanométrico. Essas nanopartículas têm sido incorporadas e avaliadas como material de reforço em matrizes poliméricas, devido ao seu potencial para melhorar as propriedades mecânicas, de barreira, térmicas, ópticas e dielétricas, e quando incorporadas em matrizes obtidas de fontes renováveis, resultam na formação de nanobiocompósitos totalmente biodegradáveis (FUKUMOTO; MAZZA, 2000; LOULI et al., 2004).

A dispersão e a incorporação dos nanocristais de celulose de diferentes fontes em filmes de amido têm sido amplamente relatadas na literatura (LU et al., 2006; MATHEW et al., 2008; GARCÍA et al., 2011; MACHADO et al., 2012; DA SILVA et al., 2012), por exemplo, nanocelulose da fibra de coco verde (MACHADO et al., 2014), nanocelulose de milho (COSTA et al., 2015), nanocristais de celulose de eucalipto (DA SILVA et al., 2012), nanocristais de celulose de licuri (COSTA et al., 2014) (Figura 1), obtendo-se assim, nanobiocompósitos com propriedades melhoradas.

FIGURA 1- Micrografias de nanowhisker de côco verde (A), nanowhisker de milho (B), nanowhisker de eucalipto (C) e nanowhisker de licuri (D) obtidas por microscopia..



Fonte: [A] Machado e cols. (2014); [B] Costa e cols. 2015; [C] Da Silva e cols. (2012); [D] Costa e cols. 2014.

Nanobiocompósitos utilizando nanowhiskers para reforçar biopolímeros hidrossolúveis como amido, acetato de celulose, ácido poliláctico e proteína de soja também são descritos na literatura (HELBERT et al., 1996; MATHEW; DUFRESNE, 2002; WANG et al., 2006).

6. Migração de partículas

Os nanocompósitos possuem grande potencial para aplicação no setor de embalagens de alimentos, pois são materiais inovadores que apresentam propriedades funcionais interessantes para promover a proteção e segurança dos alimentos. Entretanto, ainda existem importantes considerações a respeito da segurança toxicológica quanto ao seu uso em embalagens que entram em contato com os alimentos (RHIM et al., 2013).

A migração de elementos das embalagens para os alimentos pode ocorrer em função da dimensão das partículas, principalmente pelo desgaste dos bionanocompósitos em função do tempo. Poucos estudos têm sido realizados para avaliar o risco associado à presença destas partículas extremamente pequenas, sendo que muitas delas são biologicamente ativas no organismo humano ou no ambiente onde são liberadas (REIJNDERS, 2006; LI; HUANG, 2008; RESTUCCIA et al., 2010).

Rhim e colaboradores (2013) consideram que esta migração pode realmente ocorrer, pois uma vez presentes em embalagens, as nanopartículas podem eventualmente migrar para o alimento. Portanto, é importante verificar em que extensão esta migração ocorre, e preveni-la. Além da ingestão, a exposição também pode ocorrer

por contato dérmico e inalação. Além do mais, é preciso considerar que as nanopartículas liberadas no ambiente podem contaminar a cadeia alimentar.

Alguns estudos recentes têm mostrado que há razões para suspeitar que as nanopartículas exibem efeitos toxicológicos sobre os sistemas biológicos (OBERDORSTER et al., 2007; DONALDSON; SEATON, 2007). Crescentes evidências científicas indicam que nanopartículas podem atravessar as barreiras celulares e causar dano oxidativo e reações inflamatórias (SILVESTRE et al., 2011).

Devido às propriedades físico-químicas específicas e alta reatividade dos nanomateriais, estes podem influenciar os processos celulares básicos. A depender das suas características, os nanomateriais podem conduzir a um ou mais parâmetros de toxicidade, o que resulta na disfunção dos processos celulares básicos. Estudos *in vitro* têm sido empregados para avaliar os potenciais efeitos adversos dos nanomateriais à saúde humana, destacando sua capacidade de induzir estresse oxidativo celular, liberar íons tóxicos, afetar a atividade de transporte de elétrons/íons através da membrana celular, causar dano oxidativo e peroxidação lipídica, enquanto os resultados de estudos *in vivo* mostraram que estes materiais podem induzir efeitos adversos sobre os sistemas respiratório, cardiovascular e sistema nervoso (LANDSIEDEL et al., 2012; NIOSH, 2012).

A via patogênica mais relevante associada aos danos teciduais, em função da exposição à nanomateriais é representada pela formação de espécies reativas ao oxigênio (ROS) nas células (DONALDSON et al., 2009). Estes elementos oxidativos podem modular a concentração intracelular de cálcio, ativar os fatores de transcrição e induzir a produção de citocinas (BROWN et al., 2004). Outros pontos comuns de toxicidade envolvem citotoxicidade, genotoxicidade e a estimulação de resposta inflamatória e/ou imune (CHEN et al., 2007).

A questão da segurança e qualidade alimentar é uma preocupação central para empresas produtoras de embalagens, especialmente para indústrias de alimentos. Estas devem encontrar soluções que garantam a boa conservação de alimentos de acordo com as expectativas dos consumidores. As autoridades internacionais têm procurado enquadrar o risco através de regulamentos. O mais recente regulamento Europeu sobre materiais plásticos e multicamada (EC 10/2011) é mais rigoroso do que o anterior, diz respeito a sistemas reativos, em que os potenciais migrantes não são as substâncias que foram introduzidas na fabricação, mas os produtos de reação destas substâncias com o

meio ambiente ou com cada uma das próprias substâncias, denominados de subprodutos. O novo regulamento exige que a noção do risco gerado por uma substância diga respeito à própria substância, as suas impurezas e qualquer reação ou produtos de degradação que são previsíveis no contexto da sua utilização. Esta informação é totalmente pertinente na medida em que os riscos potenciais para a saúde pública possam resultar da migração destas substâncias (RIQUET et al., 2016).

7. Ensaios de citotoxicidade *in vitro*

Sabe-se que linhagens celulares quando mantidas em cultura dividem-se e multiplicam-se continuamente. A base dos ensaios de citotoxicidade está exatamente na avaliação da interferência induzida por agentes tóxicos sobre os processos metabólicos celulares e na investigação a respeito da maneira em que esses processos podem interferir no crescimento ou multiplicação celular, ou até mesmo provocar a morte celular, reduzindo, assim o número de células viáveis em comparação com culturas controles não tratadas. Estes ensaios tendem a simplificar os eventos quantificados, contudo, por serem métodos simples, de baixo custo e reprodutíveis, são extensamente empregados em processos de triagem (FRESHNEY, 1994).

Bioensaios *in vitro* para pré-avaliar a resposta humana são de grande importância na avaliação da citotoxicidade dos mais variados compostos, incluindo irritantes dérmicos (LEE et al., 2000, ROGERO et al., 2003), hidrocarbonetos e combustíveis (CHOU et al., 2003) e compostos naturais (SCHMIDT et al., 2009; 2010; 2011). Particularmente no caso da avaliação da toxicidade basal de materiais de uso médico-farmacêutico, sua aplicação já está bem fundamentada, uma vez que estas técnicas tiveram origem na década de 60 com a finalidade de avaliar a inocuidade de plásticos utilizados em embalagens farmacêuticas (WILSNACK, 1976; GAD, 2000). A *ASTM* a *ISO* as Farmacopeias Americana (USP, 2015) e Brasileira (BRASIL, 2010) preconizam metodologias *in vitro* para avaliação preliminar da reatividade biológica destes materiais poliméricos de uso hospitalar e farmacêutico, utilizando células fibroblásticas para mimetizar os tecidos conjuntivos que normalmente entram em contato com estes materiais. Estas metodologias alternativas *in vitro* foram amplamente avaliadas e atualmente também são reconhecidas por órgãos internacionais como a Central de Interagências para a Avaliação de Métodos Toxicológicos Alternativos (*NTP Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods* -

NICEATM) e o Comitê Coordenador Interagências para a Validação de Métodos Alternativos (*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods - ICCVAM*) (NICEATM-ICCVAM, 2012).

Os ensaios de biorreatividade por difusão e, por contato direto, são úteis na avaliação da citotoxicidade potencial de novos materiais e formulações para uso médico. Estes bioensaios também fazem parte de programas de controle de qualidade de componentes e materiais de uso médico-hospitalar a base de polímeros. Dentro da mesma linha de métodos alternativos, as técnicas para avaliação da biocompatibilidade de materiais plásticos, elastômeros e polímeros empregados na fabricação de produtos farmacêuticos, dispositivos de uso médico-hospitalar e correlatos, que venham a entrar em contato direto ou indireto com o paciente, também evoluíram no sentido de reduzir e/ou eliminar o uso de animais. Os polímeros de cloreto de polivinila (PVC) contendo aditivos e plastificantes (ex. dietilftalato), os elastômeros naturais como o látex contendo antioxidantes e compostos a base de enxofre além de outros componentes químicos que são utilizados para sua vulcanização, são alguns exemplos de compostos que, reconhecidamente podem causar efeitos adversos que vão desde uma simples alergia até um processo inflamatório severo dependendo das condições do paciente e da forma como são utilizados (VIDAL et al., 2009).

O uso dos métodos que definem a citotoxicidade basal, ou seja, que identificam a habilidade de um componente em causar morte celular como consequência de danos na função básica da célula, apresenta boa correlação com a toxicidade aguda em animais e no homem (EISENBRAND et al., 2002). Os testes de biocompatibilidade *in vitro* foram desenvolvidos para simular e prever as reações biológicas aos materiais quando em contato com os tecidos humanos. Estes ensaios determinam a citotoxicidade por meio da observação de um evento terminal, por exemplo, a permeabilidade das membranas citoplasmáticas de células a corantes, ou por meio da leitura de algum parâmetro metabólico como proliferação celular ou reações enzimáticas (HANKS et al., 1996).

O ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) também é uma técnica biológica para avaliar a citotoxicidade basal de substâncias em solução, e baseia-se na redução celular do sal de tetrazólio pelas células viáveis. A quantificação da redução de MTT constitui um método colorimétrico simples para avaliar viabilidade celular após a exposição das células aos agentes tóxicos. Após

redução do MTT pelas desidrogenases das células que permaneceram viáveis, ocorre a produção dos cristais de formazan de cor violeta, que ao serem dissolvidos absorvem na região do visível, podendo desta forma ser quantificados por espectrofotometria (MOSMAN, 1983).

8. Cultivo Celular

A proliferação *in vitro* difere da que ocorre *in vivo*. A adesão célula-célula e célula-matriz é reduzida e não possui as características de heterogeneidade e arquitetura tridimensional de um tecido *in vivo*, uma vez que seu meio nutricional e hormonal está modificado. Uma cultura primária é estabelecida a partir do crescimento de células oriundas de um fragmento de tecido obtido por desagregação mecânica ou enzimática, essas células possuem as características do tecido de origem, podem crescer em cultura por um determinado período de tempo. Essa forma de cultivo é a mais utilizada para estudar o comportamento de determinada célula *in vitro* devido à suas características genótípicas e fenótípicas. À medida que a cultura é repicada, as células com uma maior capacidade de proliferação irão predominar na garrafa de cultivo em detrimento das células que não se adaptaram bem ao cultivo, ao passo que essas células que permanecem viáveis ainda mantêm as características do tecido de origem, porém possuem alta proliferação. Esse tipo de célula é chamado linhagem celular contínua ou imortalizada, e é muito utilizada em pesquisa, pois pode ser mantida em cultura por um grande período de tempo. As células cultivadas podem ser aderentes ou não aderentes, o que significa dizer que algumas células poderão se ligar ao fundo da garrafa de cultura enquanto outras ficarão em suspensão no meio. As células aderentes são oriundas de tecidos rígidos e, por isso, são dependentes de ancoragem, ou seja, necessitam de adesão a uma superfície de contato para que possam iniciar a sua proliferação. As células não aderentes podem ser cultivadas em suspensão no meio e são derivadas de tecidos que não necessitam de ancoragem para proliferar e sobreviver (MOLINARO, 2010).

9. Linhagens celulares

9.1 Células de adenocarcinoma do epitélio colorretal humano (Caco-2)

Na busca por métodos alternativos que diminuam a quantidade de animais de laboratório, o uso de sistemas *in vitro* baseados em linhagens celulares que mimetizam

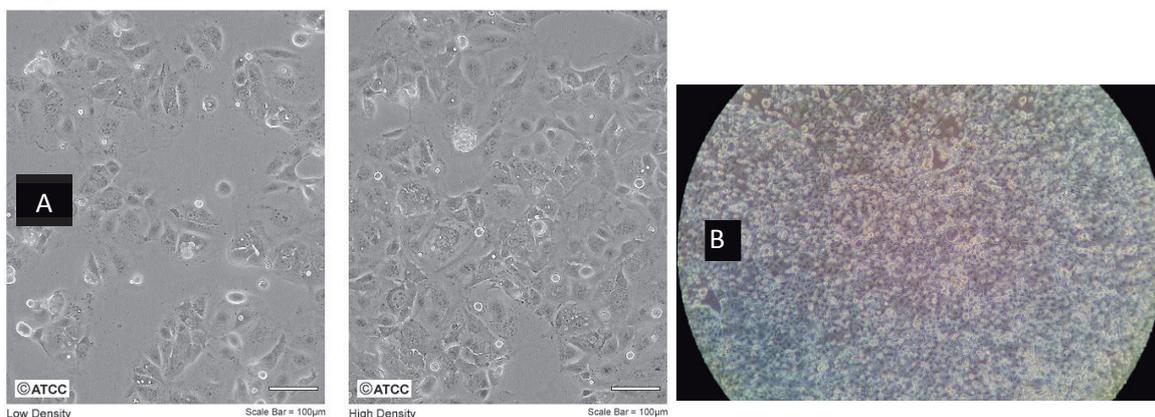
os mais variados tecidos humanos, como por exemplo, o epitélio gastrointestinal por meio do uso da linhagem Caco-2 (Figura 2), vem sendo cada vez mais empregados (GAN; THAKKER, 1996).

A linhagem celular Caco-2 é uma célula imortalizada oriunda de adenocarcinoma do epitélio colorretal humano. Embora derivada de carcinoma de cólon, quando cultivada sob condições específicas torna-se diferenciada e polarizada de tal maneira que seu fenótipo, morfológico e funcional, assemelha-se aos enterócitos que revestem o intestino delgado (HIDALO et al., 1989; PINTO et al., 1983; WALGREN, 1998). Ao crescerem por aderência, expressam as junções, microvilosidades e um número de enzimas e transportadores que são característicos dos enterócitos, como por exemplo, peptidases, esterases, *p*-glicoproteína, os transportadores de captação para os aminoácidos e os ácidos biliares. Por este motivo são amplamente utilizadas como um modelo *in vitro* que mimetiza a mucosa intestinal humana em estudos de absorção gastrointestinal de fármacos orais, sendo bastante relevante no processo de desenvolvimento de formulações farmacêuticas (GAN; THAKKER, 1996; BALIMANE et al., 2006).

O modelo do adenocarcinoma de cólon humano (Caco-2) também é amplamente utilizado para testes de permeação, sendo aceito pela Food and Drug Administration (FDA) para determinar o grau de permeabilidade de um fármaco e prever sua absorção *in vivo* através da medição de um coeficiente de permeabilidade aparente *in vitro* (FERREC et al., 2001; CASTILLO et al., 2006).

FIGURA 2- Células Caco-2 (A) 100 μ m e monocamada celular de células Caco-2 (B) com aumento de 100 vezes em microscópio ótico.

Designation: **Caco-2**



Fonte: (A) <http://www.atcc.org/products/all/HTB-37.aspx> em 29/02/2016; (B) fonte: próprio autor.

9.2 Células do tecido conjuntivo subcutâneo de camundongo (L929)

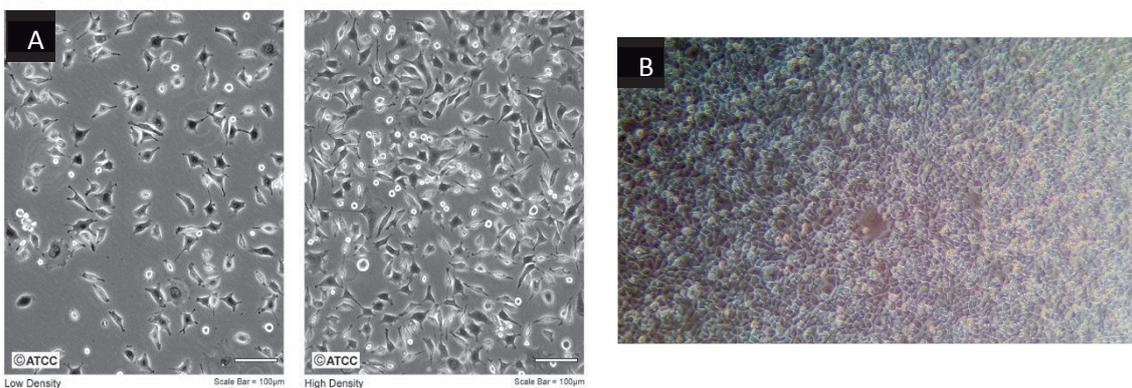
As células L929 (Figura 3) são uma linhagem de fibroblastos recomendada para testes de citotoxicidade (SERRANO et al., 2004). O subclone L929 da linhagem parental L, foi estabelecido por W. R. Earle no ano de 1940, sendo uma das primeiras linhagens celulares a serem estabelecidas em cultura contínua. A linhagem L é derivada do tecido conjuntivo subcutâneo, areolar e adiposo de um camundongo macho C3H/An de 100 dias de idade (ATCC, 1994).

Os fibroblastos são as células predominantemente encontradas em tecidos conectivos perdidos ou danificados, e são importantes nos mecanismos de reparação tecidual e na fase de remodelamento dos tecidos (PAN et al., 2006). Estas células são fundamentais para a produção de muitos componentes essenciais do tecido conectivo, como os componentes de matriz extracelular e, no tecido fibroso produzem o colágeno (RAE, 1981; BAXTER et al., 2002).

A linhagem L929 tem um longo histórico de uso em ensaios de citotoxicidade por ser uma linhagem bem estabelecida e caracterizada, além de apresentar resultados reprodutíveis em estudos interlaboratoriais (ASTM, 2006). A utilização das células L929 para o estudo da reatividade biológica de plásticos e de outros materiais poliméricos de aplicação farmacêutica e médico-hospitalar teve início na década de 60 na investigação da citotoxicidade de metais, plásticos e outros polímeros de uso odontológico. Sua popularidade foi de tal proporção, que passou a ser a linhagem celular de primeira escolha nos protocolos para avaliação da reatividade celular *in vitro* da Sociedade Americana de Ensaio e Materiais (ASTM) e da Organização Internacional para Padronização (ISO) além de outros Institutos Internacionais que atuam nesta área (HANKS et al., 1996).

FIGURA 3- Células NCTC L929 (A) 100µm e monocamada celular de L929 com aumento de 100 vezes em microscópio ótico (B).

Designation: **NCTC clone 929**

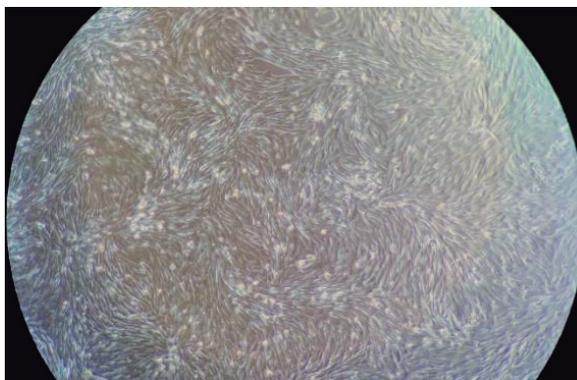


Fonte: (A) <http://www.atcc.org/products/all/HTB-37.aspx> em 01/03/2016. (B) próprio autor.

9.3 Células de córnea de coelho (SIRC)

A linhagem celular derivada de córnea de coelho (SIRC) tem sido uma das células mais amplamente utilizadas por muitos pesquisadores em vários estudos imunológicos e toxicológicos, além de outros que envolvem a fisiologia da córnea (Figura 4). Esta linhagem tem sido extensivamente usada para se predizer a irritação ocular, e vem demonstrando uma excelente correlação entre os efeitos *in vivo* e *in vitro* (HUTAK et al., 2003). Além de sua origem oftálmica, as vantagens desta linhagem celular estão em sua disponibilidade comercial e facilidade de cultivo (ROGUET et al., 1992).

FIGURA 4- Monocamada celular de células SIRC observadas em microscópio ótico com aumento de 100 vezes.



Fonte: próprio autor

REFERÊNCIAS

- ABREU, F.O.M.; FORTE, M.M.C.; LIBERMAN, S. A. Propriedades Mecânicas e Morfologia de Blendas de Polipropileno com TPES. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 16, n. 1, p. 71-78, 2006.
- APPENDINI, P.; HOTCHKISS, J.H. Review of antimicrobial food packaging. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 3, p. 113–126, 2002.
- ARRUDA, P.V.; RODRIGUES, R.C.L.B.; FELIPE, M.G.A. Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. **Revista Analytica**, v.26, p. 56-62, 2007.
- ASSIS, D.J.; BRANDÃO, L.V.; COSTA, L.A.S.; FIGUEIREDO, T.V.B.; SOUSA, L.S.; PADILHA, F.F.; DRUZIAN, J.I. A study of the effects of aeration and agitation on the properties and production of xanthan gum from crude glycerin derived from biodiesel using the response surface methodology. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.172, p.2769–2785, 2014b.
- 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: 03 de Março 2014.
- 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 : 03 de Março 2014.
- ATCC- American Type Culture Collection: Catalogue of Cell Lines & Hybridomas. 8th ed. Rockville, 1994.
- AVÉROUS, L.; LE DIGABEL, F. Properties of biocomposites based on lignocellulosic filler. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, p. 480-493, 2001.
- AYOUB M.; ABDULLAH A. Z. Critical review on the current scenario and significance of crude glycerol resulting from biodiesel industry towards more sustainable renewable energy industry. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, p. 2671–2686, 2012.
- BALIMANE, P.V.; CHONG, S.; MORRISON, R.A. Current methodologies used for basado en monolayer Caco-2 cells with Aplicación in Estudios Absorption Pharmaceuticals. **Revista Colombiana de Ciencias Químicas Farmacéuticas**, 2006.
- BARUD, H.; SOUZA, J.; SANTOS, D.; CRESPI, M.; RIBEIRO, C.; MESSADDEQ, Y. Bacterial cellulose/poly(3-hydroxybutyrate) composite membranes. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 1279–1284, 2011.
- BASF, Product information Ecoflex F BX 70112009. Disponível em https://www.basf.com/documents/corp/en/about-us/publications/reports/2010/BASF_Report_2009.pdf acesso em 03/03/2016.

BAXTER, L.C.; FRAUCHIGER, V.; TEXTOR, M.; AP GWYNN, I.; RICHARDS, R. G. Fibroblast and osteoblast adhesion and morphology on calcium phosphate surfaces. **European Cells & Materials Journal**, v. 4, p. 1-17, 2002.

BILANOVIC, D.; SHELEF, G.; GREEN, M. **Bioresource Technology**, v. 48, p.169, 1994.

BONILLA, J.; ATARÉS, L.; VARGAS, M.; CHIRALT, A. Edible films and coatings to prevent the detrimental effect of oxygen on food quality: possibilities and limitations. **Journal of Food Engineering**, v. 110, p. 208-213, 2012.

BOSCO, F.; CHIAMPO, F. Production of polyhydroxyalcanoates (PHAs) using milk whey and dairy wastewater activated sludge production of bioplastics using dairy residues. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 109, p. 418–421, 2010.

BOWER, D. I. **An Introduction to Polymer Physics**; Cambridge University Press: Cambridge, 2002.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**, v. 2 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, p. 546, 2010.

BRODY A.; STRUPINSKY E. R.; KLINE, L.R. **Active packaging for food applications**. CRC Press. Florida, 2010.

BROWN, D.M.; DONALDSON, K.; BORM, P.J.; SCHINS, R.P.; DEHNHARDT, M.; GILMOUR, P.; JIMENEZ, L.A.; STONE, V. Calcium and ROS-mediated activation of transcription factors and TNF-alpha cytokine gene expression in macrophages exposed to ultrafine particles. **Amer. Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 286, p. 344–353, 2004.

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 Ciencias Químico Farmacéuticas**, 2006.

CAVAR, S.; MAKSIMOVIĆ, M. Antioxidant activity of essential oil and aqueous extract of *Pelargonium graveolens* L'Her, **Food Control**, v. 23, p. 263-267, 2012.

ÇELİK, E.; OZBAY, N.; OKTAR, N.; ÇALIK, P. Use of biodiesel byproduct crude glycerol as the carbon source for Fermentation processes by recombinant *Pichia pastoris*. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v.47, p. 2985- 2990, 2008.

CHAUDHRY, Q.; SCOTTER, M.; BLACKBURN, J.; ROSS, B.; BOXALL, A.; CASTLE, L.; AITKEN, R.; WATKINS, R. Applications and implications of nanotechnologies for the food sector. **Food Additives & Contaminants**, v. 25, p. 241–258, 2008.

CHEN, Z.; MENG, H.; XING, G.; CHEN, C.; ZHAO, Y. Toxicological and biological effects of nanomaterials. **International Journal of Nanotechnology**. v.4, p.179–196, 2007.

CHOU, C.C.; RIVIERE, J.E.; MONTEIRO-RIVIERE, N.A. The cytotoxicity of jet fuel aromatic hydrocarbons and dose-related interleukin-8 release from human epidermal keratinocytes. **Archives of Toxicology**, v. 77, p. 384–391, 2003.

- CLARINVAL, A. M.; HALLEUX, J. In *Biodegradable Polymers for Industrial Applications*; Smith, R., Ed.; Woodhead: Cambridge, United Kingdom, p. 3, 2005.
- COSTA, L.A.S.; ASSIS, D. D. J.; GOMES, G.V.P.; DA SILVA, J. B.A.; FONSÊCA, A. F.; DRUZIAN, J. I. Extraction and Characterization of Nanocellulose from Corn Stover. **Materials Today: Proceedings**, v. 2, p. 287–294, 2015.
- COSTA, S. S.; DRUZIAN, J. I.; MACHADO, B. A. S.; SOUZA, C. O.; GUIMARÃES, A. G. Bi-Functional Biobased Packing of the Cassava Starch, Glycerol, Licuri Nanocellulose and Red Propolis. **Plos One**, v. 9, 2014.
- CRUZ-ROMERO, M.C.; MURPHY, T.; MORRIS, M.; CUMMINS, E.; KERRY, J.P. Antimicrobial activity of chitosan, organic acids and nano-sized solubilisates for potential use in smart antimicrobially-active packaging for potential food applications. **Food Control**, v.34, p. 393-397, 2013.
- DA SILVA, J. B. A.; PEREIRA, F. V.; DRUZIAN, J. I. Cassava Starch-Based Films Plasticized with Sucrose and Inverted Sugar and Reinforced with Cellulose Nanocrystals. **Journal of Food Science**, v. 77, p. 6, 2012.
- DAINELLI, D.; GONTARD, N.; SPYROPOULOS, D.; BEUKEN, E.Z.; TOBBACK, P. Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns. **Trends in Food Science & Technology**, v. 19, p. 103-112, 2008.
- DE AZEREDO, H. M. C. Nanocomposites for food packaging applications. **Food Research International**, v. 42, n. 9, p. 1240-1253, 2009.
- DONALDSON, K.; BORM, P.J.; CASTRANOVA, V.; GULUMIAN, M. The limits of testing particle-mediated oxidative stress *in vitro* in predicting diverse pathologies; relevance for testing of nanoparticles. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 6, 2009. doi:10.1186/1743-8977-6-13.
- DONALDSON, K.; SEATON, A. The Janus faces of nanoparticles. **Journal for Nanoscience and Nanotechnology**, v. 7, p. 11-4067, 2007.
- EICHHORN, S.J. Cellulose nanowhiskers: promising materials for advanced applications. **Soft Matter**, v. 7, p. 303–15, 2011.
- EISENBRAND, G.; POOL-ZOBEL, B.; BAKER, V.; BALLS, M.; BLAAUBOER, B. J.; BOOBIS, A.; CARERE, A.; KEVEKORDES, S.; LHUGUENOT, J. C.; PIETERS, R.; KLEINER, J. Methods of *in vitro* toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 193-236, 2002.
- FELIZARDO, P. M. G. - “**Produção de biodiesel a partir de óleos usados de frituras**”. 2003. Monografia, Instituto Superior Técnico, Portugal, 2003.
- 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.
- FONTANIELLA, B.; RODRÍGUES, C.W.; PIÑÓN, D.; VICENTE, C.; LEGAZ, M.-E. Identification of xanthans isolated from sugarcane juices obtained from scalded plants

infected by *Xanthomonas albilineans*. **Journal of Chromatography B**, v. 81, p. 270-275, 2002.

FRESHNEY, R.I. **Culture of Animal Cells**. A Manual of Basic Technic. 3 th edition. New York: Wiley-Liss, Inc; 1994.

FUKUMOTO, L.R.; MAZZA, G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 8, p. 3597-3604, 2000.

GAD, S.C. **In Vitro Toxicology**. 2 ed., Taylor and Francis, Philadelphia, 2000.

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*, 1996.

GARCÍA, J.A.; LÓPEZ, M.P.; DORADO, N.; KOPSAHELIS, M.; ALEXANDRI, S.; PAPANIKOLAOU, M.A.; VILLAR, A.A. K. Evaluation of by-products from the biodiesel industry as fermentation feedstock for poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production by *Cupriavidus necator*. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 16–22, 2013.

GARCÍA, N. L.; RIBBA, L.; DUFRESNE, A.; ARANGUREN, M.; GOYANES, S. Effect of glycerol on the morphology of nanocomposites made from thermoplastic starch and starch nanocrystals. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 203, 2011.

GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; CASAS, J. A.; GÓMEZ, E. Xanthan gum: production, recovery, and properties. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 549-579, 2000.

GORNI, A. A. **Introdução aos plásticos**. 2003. Disponível em <<http://www.gorni.eng.br/intropol.html>> acesso em: 03/03/2016.

GREEN, M.; SHELEF, G; BILANOVIC, D. The effect of various citrus waste fractions on xanthan fermentation. **Chemical Engineering Journal**, v. 56, p.37, 1994.

GRISI, C.V.B.; VEIGA-SANTOS, P.; SILVA, L. T.; CABRAL-ALBUQUERQUE, E. C.; DRUZIAN, J. I Evaluation of the viability of incorporating natural antioxidants in bio-based packagings. **Nova Science Publishers - Food Chemistry Research Developments**, v. 1, p. 1-11, 2008.

HABIBI, Y.; LUCIA, L.A.; ROJAS, O. J. Cellulose nanocrystals: chemistry, self-assembly, and applications. **Chemical Reviews**, v. 110, p. 3479–500, 2010.

HANKS, C.T.; WATAHA, J.C.; SUN, Z. In vitro models of biocompatibility: a review. **Dental Material**, v.12, p.186-193, 1996.

HAZIMAH, A. H; SALMIAH, A. Recovery of glycerol and diglycerol from glycerol pitch. **Journal of Oil Palm Research**, v. 15, p. 1-5, 2003.

HELBERT, W.; CAVAILLE, J. Y.; DUFRESNE, A. Thermoplastic nanocomposites filled with wheat straw cellulose whiskers. Part 1: Processing and mechanical behavior. **Polymer Composites**, v. 17, p. 604-611, 1996.

HIDALGO, I. J. et al. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco2) as a models system for intestinal epithelial permeability. **Gastroenterology**, v. 96, n. 3, p. 736–49, 1989.

HOLT, B. L.; STOYANOV, S.D.; PELAN, E.; PAUNOV, V.N. Novel anisotropic materials from functionalised colloidal cellulose and cellulose derivatives. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, p. 58–70, 2010.

HUTAK, M.C.; KAVANAGH, M.E.; AGARWAL, V.; AFOUNA, M.I.; KHAN, M.A.; REDDY, I.K. Use of SIRC rabbit corneal cell lines grown on polycarbonate- or polyester-based filters to assess the in vitro corneal transport/toxicity screening using pilocarpine with or without benzalkonium chloride. **Journal of Toxicology**, v. 22, p. 101- 114, 2003.

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

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

ITO, T.; NAKASHIMADA, Y.; SENBA, K.; MATSUI, T.; NISHIO, N. Hydrogen ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, p. 260–265, 2005.

JANA, A. K.; GHOSH, P. Xanthan biosynthesis in continuous culture: Citric acid as an energy source. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. v. 80, p. 485, 1995.

JIANG, L.; MORELIUS, E.; ZHANG, J.; WOLCOTT, M.; HOLBERY, J. Study of the poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/cellulose nanowhisker composites prepared by solution casting and melt processing. **Journal of Composite Materials**, v. 42, p. 2629–45, 2008.

JIMÉNEZ, A.; FABRA, M.J.; TALENS, P.; CHIRALT, A. Edible and Biodegradable Starch Films: A Review. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, p. 2058-2076, 2012.

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

KHARDENAVIS, A. A.; KUMAR, M.S.; MUDLIAR, S.N.; CHAKRABARTI, T. Biotechnological conversion of agro-industrial wastewaters into biodegradable plastic, poly-hydroxybutyrate. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 3579–3584, 2007.

KHEMANI, R. G.; CONTI, D.; ALONZO, T. A.; BART, R. D. 3rd; NEWTH, C. J. Effect of tidal volume in children with acute hypoxemic respiratory failure. *Intensive Care Med*, v. 35, n. 8, p. 1428-37, 2009.

KOJIMA, M.; MITCHELL, D.; WARD, W. Considering Trade Policies for Liquid biofuels - May (2007). International Bank for Reconstruction and Development/World Bank. <http://www.fao.org/uploads/media/0705_ESMAP_World_Bank_Considering_Trade_Policies_for_Liquid_Biofuels_02.pdf>. Accessed: October 10, 2010.

KOLLER, M. P.; HESSE, R.; BONA, C.; KUTSCHERA, A.; ATLIĆ, G. B. Biosynthesis of high quality polyhydroxyalkanoate co- and terpolyesters for potential

- medical application by the archaeon *Haloferax mediterranei*. **Macromolecular Symposia.**, v. 253, p. 33–3, 2007.
- KOLLER, M.; BONA, R.; CHIELLINI, E.; FERNANDES, E. G.; HORVAT, P.; KUTSCHERA, C.; HESSE, P.; BRAUNEGG, G. Polyhydroxyalkanoate production from whey by *Pseudomonas hydrogenovora*. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4854–4863, 2008.
- KONICEK, J.; LASIK, J.; SAFAR, H. Xanthan gum produced from whey by a mutant strain of *Xanthomonas campestris*. **Folia Microbiologica**, v. 38, p. 403, 1993.
- LANDSIEDEL, R.; FABIAN, E.; MA-HOCK, L.; VAN RAVENZWAAY, B.; WOHLLEBEN, W.; WIENCH, K.; OESCH, F. Toxicity/biokinetics of nanomaterials. **Archives of Toxicology**, v. 86, p. 1021–1060, 2012.
- LEE, J.K.; KIM, D.B.; KIM, J.I.; KIM, P.Y. In vitro cytotoxicity tests on cultured human skin fibroblasts to predict skin irritation potential of surfactants. **Toxicology in Vitro**, v. 14, p. 345–349, 2000.
- LEE, S.Y. Plastic bacteria—progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. **Trends in Biotechnology**, v. 14, p. 431–438, 1996.
- LEONETI, A. B.; ARAGÃO-LEONETI, V.; OLIVEIRA, S. V. W. B. Glycerol as a by-product of biodiesel production in Brazil: Alternatives for the use of unrefined glycerol. **Renewable Energy**, v. 45, p. 138, 2012.
- LI, L.H.; HUANG, L. Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles. **Molecular Pharmacology**, v. 5, p. 496–504, 2008.
- LOPEZ, M. J.; RAMOS-CORMENZANA, A. Xanthan production from olive mill wastewaters. Proc. Olive Oil Processes and By Products Recycling; Granada, Spain, Sep 10–13. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 38, p. 263, 1996.
- LÓPEZ-DE-DICASTILLO, C.; GÓMEZ-ESTACA, J.; CATALÁ, R.; GAYARA, R.; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P. Active antioxidant packaging films: Development and effect on lipid stability of brined sardines. **Food Chemistry**, v. 131, p. 1376–1384, 2012.
- LOULI, V.; RAGOUSSIS, N.; MAGOULAS, K. Recovery of phenolic antioxidants from wine industry by-products. **Bioresource Technology**, v. 92, p. 201–208, 2004.
- LU, J.; HONG, C.K.; WOOL, R.P. Bio-based nanocomposites from functionalized plant oils and layered silicate. **The Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics**, v. 42, p. 1441–50, 2004.
- LU, Y.; LAROCK, R.C. Novel biobased nanocomposites from soybean oil and functionalized organoclay. **Biomacromolecules**, v. 7, p. 2692–700, 2006.
- LU, Y.; WENG, L.; CAO, X. Morphological, thermal and mechanical properties of ramie crystallites—reinforced plasticized starch biocomposites. **Carbohydrate Polymers**, v. 63, p. 198–204, 2006.

LUENGO, J.M.; GARCÍA, B.; SANDOVAL, A.; NAHARRO, G.; OLIVERA, E.R. Bioplastic from microorganisms. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 251–260, 2003.

MA, W.; TANG, C.H.; YIN, S.W.; YANG, X.Q.; QI, J.R.; XIA, N. Effect of homogenization conditions on properties of gelatin–olive oil composite films. **Journal of Food Engineering**, v. 113, p.136-142, 2013.

MACHADO, B. A. S.; NUNES, I. L.; PEREIRA, F. V.; DRUZIAN, J. I. Development and evaluation of the effectiveness of biodegradable films of cassava starch with nanocelulose as reinforcement and yerba mate extract as an additive antioxidante. **Ciência Rural**, v. 42, p. 2085, 2012.

MACHADO, B. A. S.; REIS, J. H.O.; DA SILVA, J. B.; CRUZ, L.S.; NUNES, I. L.; PEREIRA, F.V.; DRUZIAN, J. I. Obtenção de nanocelulose da fibra de coco verde e incorporação em filmes biodegradáveis de amido plastificados com glicerol. **Química nova**, v. 37, n. 8, p. 1275-1282, 2014. <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20140220>

MACHADO, B.A.S. **Desenvolvimento e caracterização de filmes flexíveis de amido de mandioca com nanocelulose de coco**. 2011. 161f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, BA, 2011.

MACHADO, B.A.S.; NUNES, I. L.; PEREIRA, F. V.; DRUZIAN, J. I. Processo para a preparação de nanobiocompósitos tipo filmes flexíveis reforçados com nanopartículas de celulose tipo nanowhiskers. Patente protocolizada no INPI, 2010.

MALI, S.; GROSSMANN, M.V. E.; YAMASHITA, F. Filmes de amido: produção, propriedades e potencial de utilização. **Ciências Agrárias**, v. 31, p. 137-156, 2010.

MANO, E. B.; MENDES, L. C. **Introdução a polímeros**. 2.ed. São Paulo: E. Blücher, p. 191, 1999.

MATHEW, A. P.; DUFRESNE, A. Morphological investigation of nanocomposites from sorbitol plasticized starch and tunicin whiskers. **Biomacromolecules**, v. 3, p. 609-617, 2002.

MATHEW, A. P.; THIELEMANS, W.; DUFRESNE, A. Mechanical properties of nanocomposites from sorbitol plasticized starch and tunicin whiskers. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 109, p. 4065, 2008.

MIYAGAWA, H.; MISRA, M.; DRZAL, L.T.; MOHANTY, A.K. Novel biobased nanocomposites from functionalized vegetable oil and organically-modified layered silicate clay. **Polymer**, v. 46, p. 445–53, 2005.

MIZUNO, K.; OHTA, A.; HYAKUTAKE, M.; ICHINOMIYA, Y.; TSUGE, T. Isolation of polyhydroxyalkanoate-producing bacteria from a polluted soil and characterization of the isolated strain *Bacillus cereus* YB-4. **Polymer Degradation and Stability**, v. 95, p. 1335–1339, 2010.

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 01/03/2016.

MORALEJO-GARATE, H.; KLEEREBEZEM, R.; MOSQUERA-CORRAL, B.M.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M. Impact of oxygen limitation on glycerol-based biopolymer production by bacterial enrichments. **Water Research**, v. 47, p. 1209–1217, 2013.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.

MÜLLER, C.M.O.; LAURINDO, J.B.; YAMASHITA, F. Effect of cellulose fibers addition on the mechanical properties and water vapor barrier of starch-based films. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 1328-1333, 2009.

NATH, A.; DIXIT, M.; BANDIYA, A.; CHAVDA, S.; DESAI, A. J. Enhanced PHB production and scale up studies using cheese whey in fed batch culture of *Methylobacterium* sp. ZP24. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 5749–5755, 2008.

NATIONAL INSTITUTE FOR OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH (NIOSH). 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.

NEVOIGT, E.; STAHL, U. Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, FEMS. **Microbiology Reviews**, v. 21, p. 231-241, 1997.

NEWELL, D.G.; KOOPMANS, M.; VERHOEF, L.; DUIZER, E.; AIDARAKANE, A.; SPRONG, H.; GIESSEN, J. V. D.; KRUSE, H. Food-borne diseases-the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, p. 3-15, 2010.

NICEATM- ICCVAM, 2012. **Alternative test methods evaluation** - In vitro pyrogen test methods. Disponível em: <http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/FR/FR-E8-27790.pdf>. Acessado em 15/10/2012.

OBERDORSTER, G.; STONE, V.; DONALDSON, K. Toxicology of nanoparticles: a historical perspective. **Nanotoxicology**, v. 1; p. 2–25, 2007.

PALANIRAJ, A.; JAYARAMAN, V. J. Production, recovery and applications of xanthan gum by *Xanthomonas campestris*. **Journal of Food Engineering**, v. 106, p.1, 2011.

PAN, H.; JIANG, H. L.; CHEN, W. L. Interaction of dermal fibroblasts with electrospun composite polymer scaffolds prepared from dextran and poly lactide-coglycolide. **Biomaterials**, v. 27, p. 3209-3220, 2006.

PANTAZAKI, A. A. et al. Production of polyhydroxyalkanoates from whey by *Thermus thermophilus* HB8. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 847–853, 2009.

PEREIRA-DE-ABREU, D.A.; LOSADA, P.P.; MAROTO, J.; CRUZ, J.M. Lipid damage during frozen storage of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) in active packaging film containing antioxidants. **Food Chemistry**, v. 126, p. 315–320, 2011.

PETERSSON, L.; KVIEN, I.; OKSMAN, K. Structure and thermal properties of poly(lactic acid)/cellulose whiskers nanocomposite materials. **Composites Science and Technology**, v. 67, p. 2535–44, 2007.

PINTO, M.; ROBIN-LEON S.; APPAY, M.D.; KEDINGER, M.; TRIADOU, N.; DUSSAULX, E.; LACROIX, B.; SIMON-ASSMAN, P.; HAFFEN, K.; FOGH, J. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. **Biology of the Cell**, v. 47, p. 323–30, 1983.

RAE, T. **Cell biochemistry in relation to the inflammatory response to foreign materials**, In: **Fundamental Aspects of Biocompatibility**. Williams DF, p.159-181, 1981.

RAMOS, M.; JIMÉNEZ, A.; PELTZER, M.; GARRIGÓS, M.C. Characterization and antimicrobial activity studies of polypropylene films with carvacrol and thymol for active packaging. **Journal of Food Engineering**, v. 109, p. 513-519, 2012.

REHMAN, A.; WIJESEKARA, R.G.; NOMURA, N.; SATO, S.; MATSUMURA, M. Pre-treatment and utilization of raw glycerol from sunflower oil biodiesel for growth and 1,3-propanediol production by *Clostridium butyricum*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 2008.

REIJNDERS, L. Cleaner nanotechnology and hazard reduction of manufactured Nanoparticles. **Journal of Cleaner Production**, v. 14, n. 2, p. 124–133, 2006.

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.

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.

RIQUET, A.M.; BREYSSEC, C.; DAHBIÉ, L.; LORIOTD, C.; SEVERINE, I.; CHAGNON, M.C. The consequences of physical post-treatments (microwave and electron-beam) on food/packaging interactions: A physicochemical and toxicological approach. **Food Chemistry**, v. 199, p. 59–69, 2016.

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

ROGUET, R.; DOSSOU, K.G.; ROUGIER A. Prediction of eye irritation potential of surfactants using the SIRC-NRU cytotoxicity test. Third SPTC Meeting. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 20, p. 451-456, 1992.

ROSEIRO, J. C.; COSTA, D. C.; COLLACO, M.T.A. Batch and fed-cultivation of *Xanthomonas campestris* in carob extracts. **Food Science and Technology**, v. 25, p. 289–293, 1992.

- SALMIERI, S.; LACROIX, M. Physicochemical properties of alginate/polycaprolactone-based films containing essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 10205–10214, 2006.
- SARANTÓPOULOS, C.I.G.L.; OLIVEIRA, L. M.; PADULA, M.; COLTRO, L.; ALVES, R. M.V.; GARCIA, E. E. C. - Embalagens Plásticas Flexíveis. Principais polímeros e avaliação de propriedades. Campinas: CETEA/ ITAL, p. 267, 2002.
- SCARFATO, P.; DI MAIO, L.; INCARNATO, L. Recent advances and migration issues in biodegradable polymers from renewable sources for food packaging. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 132, 2015. DOI: 10.1002/app.42597
- SCHMIDT, C.A., MURILLO, R., BRUHN, T., BRINGMANN, G., GOETTERT, M., HEINZMANN, B., BRECHT, V., LAUFER, S., MERFORT, I. Catechin Derivatives from Parapiptadenia rigida with Wound-Healing Properties. **Journal of Natural Products**, v. 73, p. 2035-2041, 2010.
- SCHMIDT, C.A., MURILLO, R., HEINZMANN, B., LAUFER, S., WRAY, V., MERFORT, I. Structural and Conformational Analysis of Proanthocyanidins from Parapiptadenia rigida, and Their Wound-Healing Properties. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 1427-1436, 2011.
- SCHMIDT, C., FRONZA, M., GOETTERT, M., GELLER, F., LUIK, S., FLORES, E.M.M., BITTENCOURT, C.F., ZANETTI, G.D., HEINZMANN, B.M., LAUFER, S., MERFORT, I. Biological studies on Brazilian plants used in wound healing. **Journal Ethnopharmacol**, v. 122, p. 523–532, 2009.
- SERRANO, M. C.; PAGANI, R.; VALLET-REGI, M.; PENA, J.; RAMILA, A.; IZQUIERDO, I.; PORTOLES, M. T. In vitro biocompatibility assessment of poly(epsilon-caprolactone) films using L929 mouse fibroblasts. **Biomaterials**, v. 25, p. 5603-5611, 2004.
- SHAH, A.; ASHTAPUTRE, A. Evaluation of rheological properties of the exopolysaccharide of Sphingomonas paucimobilis GS-1 for application in oil exploration. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 442-445, 1999.
- 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.
- SILVA, G.P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advances**, v.27, p.30-39, 2009.
- SILVA, L.T. **Desenvolvimento e avaliação de embalagens biodegradáveis com ação antioxidante contendo café e cacau**. 2009. 148f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimento) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, BA, 2009.
- SILVESTRE, C.; DURACCIO C. S. Food packaging based on polymer nanomaterials. **Progress in Polymer Science**, v. 36, p. 82-1766, 2011.
- SIRIPATRAWAN, U., HARTE, B.R. Physical properties and antioxidant activity of a active film from chitosan incorporated with green tea extract. **Food Hydrocolloids**, v. 24, p. 770-775, 2010.

SOUZA, C.O.; SILVA, L.T.; SILVA, J.R.; LÓPEZ, J.A.; VEIGA-SANTOS, P.; DRUZIAN, J.I. Mango and acerola pulps as antioxidant additives in cassava starch bio-based film. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 2248-2254, 2011.

SOUZA, C.O.; VEIGA-SANTOS, 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.

SUDESH, K.; ABE, H.; DOI, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. **Progress in Polymer Science**, v. 25, p. 1503–1555, 2000.

SUPPAKUL, P.; MILTZ, J.; SONNEVELD, K.; BIGGER, S.W. Active Packaging Technologies with an Emphasis on Antimicrobial Packaging and its Applications. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 2, 2003.

THOMPSON, J. C.; HE, B. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. **Applied Engineering in Agriculture**, v. 22, p. 261-265, 2006.

U.S. Food and Drug Administration. **Glycerin; GRAS status as a direct human food ingredient**. Federal Register, v. 48, p. 5759–60, 1969.

USP - **THE UNITED STATES PHARMACOPEIA**, Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 38 ed., 2015.

VEIGA, P.S.; DRUZIAN, J.I. Absorvedores de umidade/ antiembaçantes biodegradáveis a base de amido/fécula para serem aplicados em produtos de higiene pessoal, alimentícios ou farmacêuticos. Patente protocolizada no INPI, 2007.

VEIGA-SANTOS, P. OLIVEIRA, L. M.; CEREDA, M. P.; ALVES, A. J.; SCAMPARINI, A. R. P. Microstructure and color of starch-gum films: Effect of additives and deacetylated xanthan gum. Part 2. **Food Hydrocolloids**, v. 19, n. 6, p. 1064-1073, 2005b.

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, 2005a.

VIDAL, M.N.P.; AIUB C.; ABRANTES, S.; ZAMITH, H.P.S. Evaluation of Brazilian medical devices using agar diffusion cytotoxicity assay. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, p. 84-87, 2009.

WALGREN, R. A.; WALLE, U. K.; WALLE, T. Transport of quercetin and its glucosides across human intestinal epithelial Caco-2 cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 55, p. 1721–1727, 1998.

WANG, H.; YANG, H.; SHIVALILA, C.S.; DAWLATY, M.M.; CHENG, A.W.; ZHANG, F.; JAENISCH, R. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. **Cell**, v. 153, p. 910–918, 2013.

- WANG, Y.; CAO, X.; ZHANG, L. Effects of Cellulose Whiskers on Properties of Soy Protein Thermoplastics. **Macromolecular Bioscience**, v. 6, p. 524-531, 2006.
- WANG, Z.; ZHUGE, J.; FANG, H.; PRIOR, B.A. Glycerol production by microbial fermentation: A review. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 201- 223, 2001.
- WILSNACK, R.E. Quantitative cell culture biocompatibility testing of medical devices and correlation to animal tests. **Biomaterials, Medical Devices, and Artificial Organs**, v. 4, p. 235-261, 1976.
- YAMASHITA, F.; NAKAGAWA, A.; VEIGA, G. F.; MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E. Embalagem ativa para frutos de acerola. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 9, n. 4, p. 95-100, 2006.
- 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**, 2002.
- YANG, S. T.; SILVA, E. M. Novel Products and New Technologies for Use of a Familiar Carbohydrate, Milk Lactose. **Journal of Dairy Science**, v. 8, p. 2541, 1995.
- YEZZA, A.; HALASZ, A.; LEVADOUX, W.; HAWARI, J. Production of poly--hydroxybutyrate (PHB) by *Alcaligenes latus* from maple sap. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 77, p. 269–274, 2007.
- YU, L.; DEAN, K.; LI, L. Polymer blends and composites from renewable resources. **Progress in Polymer Science**, v. 31, p. 576–602, 2006.
- YU, P.H.; CHUA, H.; HUANG, A.L.; HO, K.P. Conversion of food industrial wastes by *Alcaligenes latus* into polyhydroxyalkanoates. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 77, p. 445–454, 1999.

CAPÍTULO II

BIOENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE EMBALAGENS ALIMENTÍCIAS E COMPONENTES UTILIZADOS EM SUA PRODUÇÃO

BIOENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE EMBALAGENS ALIMENTÍCIAS E COMPONENTES UTILIZADOS EM SUA PRODUÇÃO

RESUMO

No sentido convencional, as embalagens são utilizadas para estender o prazo de armazenamento dos produtos embalados conferindo proteção mecânica, química e biológica. Para satisfazer consumidores cada vez mais exigentes e, devido aos problemas ambientais acarretados pelo descarte de embalagens tradicionais produzidas a partir de derivados de petróleo, têm sido desenvolvidos materiais inovadores, como os filmes flexíveis biodegradáveis e ativos que, além da proteção, possibilitam a interação com o produto embalado, trazendo benefícios extras. Entretanto, ainda são escassos os dados a respeito da segurança toxicológica destes materiais, especialmente se constituídos de bionanocompósitos, cuja taxa de migração das nanopartículas da embalagem para o alimento permanece muito pouco conhecida. O objetivo deste trabalho consiste em implementar as metodologias para avaliação da biorreatividade *in vitro* de materiais poliméricos de uso médico-hospitalar descritas em protocolos internacionais e nas Farmacopeias, e adaptá-las à linhagem Caco-2, com a finalidade de avaliar a citotoxicidade de embalagens de uso alimentício e componentes utilizados em sua produção. Linhagens de fibroblastos (L929 e SIRC) também foram utilizadas para comparação dos resultados. Os ensaios por contato direto e por difusão em ágar (contato indireto) foram realizados em placas de 60 mm contendo uma suspensão de $1,0 \times 10^6$ células.mL⁻¹. As amostras de matrizes poliméricas biodegradáveis (PBAT, PHA, acetato celulose, entre outras) e convencionais (PEBD, PEAD, PP, PPBM), embalagens comerciais, aditivos (nanopartículas de celulose e amido), filmes bionanocompositos, entre outras, foram incubadas durante 24 h e sua reatividade foi determinada a partir da visualização direta do efeito proporcionado sobre as células. Os testes de contato direto com as células Caco-2 resultaram em 40% das amostras com algum grau de reatividade, destas, 15% foram classificadas como suave a moderada. Quando submetidas ao teste de difusão em ágar, 20% das amostras revelaram algum grau de citotoxicidade, sendo que 5% destas respostas foram classificadas entre suave a moderada. Com as células L929 os resultados obtidos foram muito semelhantes, o que demonstra a adequação e a sensibilidade das células Caco-2 ao bioensaio. O ensaio de MTT, adaptado para as células Caco-2, revelou que a maioria das amostras não causou dano celular nas condições avaliadas, apenas 2 amostras de glicerina residual de biodiesel, utilizadas como substrato alternativo no processo fermentativo para produção de biopolímeros, apresentaram citotoxicidade em concentrações superiores a 12,5% (v/v). A adaptação das técnicas comumente utilizadas na avaliação da citotoxicidade de materiais poliméricos de uso médico-hospitalar mostrou-se bastante promissora quando aplicada em amostras de embalagens de alimentos e polímeros convencionais ou biodegradáveis, assim como, nos componentes empregados na sua fabricação. De forma análoga a qualquer ensaio *in vitro* para estudo da toxicidade, a correlação da resposta obtida com os prováveis efeitos no organismo humano depende da avaliação conjunta com outras técnicas apropriadas, uma vez que estes bioensaios, apesar de apresentarem grande sensibilidade, são considerados como ensaios preliminares na avaliação da citotoxicidade.

Palavras chave: Embalagens. Segurança alimentar. Citotoxicidade. Biopolímeros. Células Caco-2. Biorreatividade.

ABSTRACT

In the conventional way, the packaging is used to extend the storage time of packaged products, providing chemical, biological and mechanical protection. In an attempt to meet ever more customers demanding, and because of the environmental problems created by the use of conventional packaging based petroleum derivatives, innovative materials have been developed, such as active and biodegradable flexible films that are able to promote the protection and interaction with the packaged product. However, it is still necessary to obtain more data about the toxicological safety of these materials, especially if they are made of bionanocomposites, whose rate of migration of the nanoparticles from packaging to food is still very unclear. The main of this work was to implement, adapt and test Pharmacopeial *in vitro* methodologies used to evaluate the biological reactivity of plastics and elastomers from medical devices or for pharmaceutical purposes, in order to assess the cytotoxicity of packaging and biodegradable or conventional films, as well as, alternative polymeric materials and other components used in the manufacturing process of films intended for food use. It was used the Caco-2 cell line, a specific strain of intestinal epithelial cells. The biological reactivity, in the contact tests, was also evaluated in L929 fibroblast strain. Samples were incubated for 24 hours and their reactivity was determined by direct visualization of the effect on the cell monolayer fixed in 60 mm plates. After 24 h incubation, the bioreactivity was measured by visual inspection of the cells around the sample. The results obtained by direct contact test in the Caco-2 cells showed a total of 40% of the samples with some toxic effect, being 15% of them classified as mild to moderate reactivity. When subjected to the agar diffusion test, 20% of the samples showed some degree of cytotoxicity, being 5% of them with mild to moderate reactivity. When tested in L929 cells, the results were very similar, confirming the suitability and sensitivity of Caco-2 cells for this bioassay. The tetrazolium blue reduction assay (MTT), also adapted to Caco-2 cells, revealed that the majority of the samples did not cause cell damage, only 2 samples of residual glycerin from biodiesel, used as alternative substrate in the fermentation process for biopolymers production, showed cytotoxicity when tested at concentrations higher than 12,5% (v/v). The adjustment of the techniques commonly used to evaluate the cytotoxicity of polymeric materials of medical devices showed to be very promising for test the cytotoxicity food packaging and conventional or biodegradable polymers, as well as the components used on packaging manufacture. Similarly to any *in vitro* assay used to study the basal toxicity, the correlation of the biological response observed and the real effect in the human body depends of the evaluation together other appropriate techniques, since such bioassays, despite having great sensitivity, are considered as preliminary trials in assessing cytotoxicity.

Key words: Food packaging. Food safety. Cytotoxicity. Biopolymers. Caco-2 cells.

1 INTRODUÇÃO

A principal função da embalagem em um alimento é a proteção contra fatores externos, como luz, oxigênio, umidade, microrganismos, estresse mecânico e demais contaminantes. Outras funções essenciais dizem respeito a apresentação das informações sobre o produto, atratividade ao consumidor e transporte. Fatores como custo razoável, viabilidade técnica, adequação para contato com alimentos, possibilidade de reciclagem ou reutilização e baixo impacto ambiental também são desejáveis (AHVENAINEN, 2003; THARANATHAN, 2003).

As embalagens constituídas de materiais plásticos convencionais como polietileno (PE), polipropileno (PP) e de policloreto de vinila (PVC), apesar de possuírem excelentes propriedades mecânicas e de barreira são consideradas não-biodegradáveis, pois são inertes à ação microbiana e necessitam de um longo tempo para se decompor na natureza (SHAH et al., 2015).

Muitos conceitos novos nas embalagens de alimentos foram introduzidos para melhorar a segurança alimentar e satisfazer as exigências dos consumidores, com destaque para a incorporação de antioxidantes, aromas, agentes antimicrobianos e outros aditivos aos filmes, assim como o desenvolvimento de embalagens capazes de interagir com o produto e o desenvolvimento de embalagens biodegradáveis a partir de fontes renováveis, tais como o amido ou polímeros de origem microbiana (KESTER; FENNEMA, 1986; MÜLLER et al., 2009; SOUZA et al., 2013). Tais fatores têm impulsionado o desenvolvimento de novas embalagens e matérias-primas para a sua elaboração (AHVENAINEN, 2003; COLES, 2003).

A nanotecnologia tem aberto novos caminhos de pesquisa e desenvolvimento em vários domínios, sua aplicação em alimentos e agricultura desempenha um papel importante na melhoria da produção, processamento, armazenamento, transporte, rastreabilidade e segurança dos alimentos (CHAUNDRY et al., 2008; AESAN, 2010). Os nanomateriais têm demonstrado possuir características inovadoras que podem ser aplicadas no desenvolvimento de novas embalagens com melhores qualidades, principalmente em relação as propriedades de barreira (PEREIRA DE ABREU et al., 2007; SILVESTRE et al., 2011).

Ao mesmo tempo em que estas inovações representam uma forte tendência nesta área, destaca-se a preocupação com a segurança no uso de tamanha gama de substâncias incorporadas às embalagens, uma vez que estudos sobre a migração das nanopartículas e outros componentes da embalagem para o alimento ainda são escassos (AVELLA, 2005; CHAUNDRY et al., 2008; SIMON, 2008, RHIM et al., 2013). Ao passo que mais e mais produtos de consumo contendo nanomateriais estejam disponíveis no mercado, a exposição da população em geral irá inevitavelmente aumentar, elevando a preocupação sobre o potencial de toxicidade e o impacto ambiental dessas partículas. Sendo assim, uma vez que ainda há uma falta de conhecimento sobre os riscos para a saúde humana e para a segurança ambiental representada pelo desenvolvimento em expansão e uso destes materiais, parece haver uma necessidade urgente para reunir mais informações sobre o assunto (MARTIROSYAN; SCHNEIDER, 2014).

Bioensaios *in vitro* para prever a resposta humana têm sido muito utilizados na avaliação da citotoxicidade das mais variadas substâncias. Sua aplicação no estudo da toxicidade de materiais poliméricos de uso farmacêutico já está bem fundamentada, uma vez que estas técnicas tiveram origem na década de 60, com a preocupação de avaliar a inocuidade de plásticos destinados ao uso farmacêutico ou de materiais médico-hospitalares como sondas e cateteres (WILSNACK, 1976; GAD, 2000).

Institutos Internacionais como a Sociedade Americana de Ensaio e Materiais (ASTM) e a Organização Internacional para Padronização (ISO) já disponibilizam normas padronizadas para ensaios de citotoxicidade de materiais poliméricos para uso médico-hospitalar, odontológico e farmacêutico (ISO, 2007; 2009; ASTM, 2006; 2007). As Farmacopeias Americana (USP, 2015) e Brasileira (BRASIL, 2010) também preconizam metodologias *in vitro* para avaliação preliminar da reatividade biológica destes materiais em células fibroblásticas.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho consistiu em implementar as metodologias para avaliação da biorreatividade *in vitro* de materiais poliméricos de uso médico-hospitalar descritas em protocolos internacionais e nas Farmacopeias, e adaptá-las à linhagem Caco-2, com a finalidade de avaliar a citotoxicidade de embalagens de uso alimentício e componentes utilizados em sua produção.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

A implementação dos ensaios seguiu as especificações estabelecidas nos protocolos da ASTM, ISO e nas Farmacopeias para ensaios de biorreatividade de materiais poliméricos de uso médico-hospitalar, odontológico e farmacêutico (ASTM, 2006; 2007; ISO, 2007; 2009; BRASIL, 2010; USP, 2015), avaliando-se a necessidade de alterações para a adequação das metodologias às amostras de embalagens alimentícias e produtos usados na sua produção. Todos os ensaios também seguiram as normas de Boas Práticas de Laboratório e as normas de biossegurança para manipulação de células.

2.1 Amostras

As amostras listadas no quadro abaixo são oriundas de pesquisas realizadas no Laboratório de Análises Aplicadas e de Biomateriais (LAPBIM) da Universidade Federal da Bahia. As demais embalagens convencionais de uso alimentício foram adquiridas em estabelecimentos comerciais.

QUADRO 1 - Amostras de filmes e embalagens de uso alimentício, bem como componentes utilizados na sua produção.

AMOSTRAS	
Filmes Biodegradáveis <ul style="list-style-type: none"> Filme polibutileno adipato co-tereftalato (PBAT) Filme PBAT + nanopartículas de amido (PBAT + amido) Filme de amido + nanopartículas de amido; Filme de acetato de celulose com anilina e baunilha Filme de acetato de celulose com acetona Filme para embutidos cárneos 	Aditivo <ul style="list-style-type: none"> Nanopartículas de amido de mandioca
	Biopolímeros <ul style="list-style-type: none"> Goma xantana (GX) Polihidroxialcanoatos (PHAs)
	Glicerina do biodiesel (substrato) <ul style="list-style-type: none"> Glicerina UFBA (GU) Glicerina Petrobrás (GP) Glicerina Comanche (GC)
Filmes Convencionais <ul style="list-style-type: none"> Filme de polietileno de baixa densidade (PEBD) Filme de polietileno de alta densidade (PEAD) Filme de polipropileno (PP) Filme de polipropileno biorientado metalizado (PPBM) 	Nanowhiskers <ul style="list-style-type: none"> eucalipto (MACHADO et al., 2014) licuri (COSTA et al., 2014) milho (COSTA et al., 2015) côco (DA SILVA et al., 2012)
Embalagens Convencionais	
<ul style="list-style-type: none"> Embalagem de patê Embalagem de doce de amendoim Embalagem metálica (leite condensado) Revestimento de caixa de leite 	<ul style="list-style-type: none"> Embalagem de queijo Embalagem metálica (leite em pó) Revestimento de caixa de suco

Fonte: próprio autor

2.2 Materiais e equipamentos

Plásticos descartáveis estéreis e apirogênicos com superfície tratada para adesão celular [placas de petri 10x60 mm; placas de 96 cavidades com fundo chato; garrafas para cultivo celular (Kasvi^R); vermelho neutro (Sigma^R), ágar bacteriológico (Himedia^R), 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 termostático (Fanem^R), vortex (Phoenix^R) estufa incubadora de CO₂ (Panasonic^R), microscópio invertido campo claro e contraste de fase (TCM 400^R), leitora espectrofotométrica de microplacas (EZ Reader 400^R), micropipetadores (Kasvi^R).

2.3 Linhagens celulares

As linhagens de células Caco-2 (NIH – CCIAL 063, epitélio intestinal), SIRC (ATCC CCL-60, fibroblasto de córnea de coelho) e NCTC L929 (ATCC CCL-1 – CCIAL 020, fibroblasto de camundongo) foram obtidas do Instituto Adolfo Lutz (São Paulo, BR) e mantidas em meio Essencial Mínimo - MEM (Sigma^R) com soro fetal bovino 10% (Vitrocell Embriolife), contendo penicilina 100 UI.mL⁻¹ e estreptomicina 0,1 mg.mL⁻¹ (Sigma^R). Todas as incubações foram a 37 °C, 5,0% de CO₂ e 95% de umidade relativa (UR) em estufa de CO₂ para cultivo celular (Panasonic, Japão).

2.4 Preparo das amostras para ensaio de MTT

As soluções estoque das amostras líquidas ou em suspensão, contendo 10.000 µg.mL⁻¹, foram preparadas a partir de 10 mg da amostra em meio MEM. A partir das soluções concentradas, foram efetuadas diluições seriadas no mesmo meio para obter as soluções de trabalho.

2.5 Preparo das amostras e controles para os testes de difusão em ágar e contato direto

Os filmes e demais amostras sólidas, analisadas por meio dos ensaios de difusão em ágar e por contato direto, foram preparadas a partir de porções planas, com tamanho aproximado de 0,25 cm² para aplicação direta sobre as placas. Como controle positivo, utilizou-se fragmentos de látex natural (0,25 cm²) e como controle negativo utilizou-se polímero de alta densidade atóxico (ISO 2007; 2009). As amostras e controles, em condição asséptica, foram manuseados em cabine de fluxo laminar de ar (Veco^R).

2.6 Manutenção e preparo das células para os ensaios

As linhagens de células, de crescimento aderente, foram mantidas em frascos de 75 cm², contendo 15 ml de Meio Essencial Mínimo (MEM) suplementado com soro fetal bovino (SFB) 10% (v/v). As células foram incubadas a 37 °C, em atmosfera com 95% de UR e 5,0% de CO₂. O meio foi substituído a cada 2 a 3 dias durante a fase de manutenção e crescimento. Entre 24 e 48 h antes dos experimentos, a monocamada com 80 a 90% de confluência, foi removida da garrafa com auxílio de tripsina/EDTA. A reação foi finalizada com 5 mL de meio MEM e a suspensão resultante foi transferida para tubo estéril e centrifugada a 1100 rpm durante 5 min. Após remoção do sobrenadante, as células foram ressuspensas com meio MEM para obter suspensão contendo 1,0x10⁶ células.mL⁻¹. Após transferência dos volumes para as placas, estas foram incubadas a 37 °C, 95% UR e 5,0% de CO₂ durante 24 h para fixação celular e crescimento até atingir confluência de 90% necessária para início dos experimentos.

2.7 Ensaios de biorreatividade por difusão em ágar e contato direto

2.7.1 Implementação e adequação dos ensaios

Os testes iniciais seguiram os procedimentos descritos nos protocolos de ensaios *in vitro* para avaliação da citotoxicidade de materiais poliméricos de uso médico-hospitalar, odontológico e farmacêutico que utilizam células de tecido conjuntivo do tipo fibroblasto (ASTM, 2006; 2007; ISO, 2007; 2009; BRASIL, 2010; USP, 2015). A adequação das técnicas para as 3 linhagens celulares (Caco-2, SIRC e L929) foi executada utilizando somente o controle positivo (látex natural) e negativo (polímero de alta densidade), cuja intenção foi estabelecer e padronizar o tamanho das placas, o volume e a concentração celular, o tempo de incubação para confluência celular, concentração e volume de ágar para o ensaio de difusão, o volume de meio no ensaio de contato direto e a utilização ou não de corante vermelho neutro. Todos os procedimentos foram realizados de forma asséptica e sob fluxo laminar de ar.

2.7.2 Realização dos ensaios

2.7.2.1 *Difusão em ágar*

Após padronizados, os testes por difusão em ágar foram realizados a partir da adição de 4 mL da suspensão celular contendo $1,0 \times 10^6$ células.mL⁻¹ em placas de 60 mm de diâmetro, seguido de incubação a 37 °C, 5,0% CO₂, 95% de UR para fixação e crescimento celular até atingir 80 a 90% de confluência (24 h). Após a remoção do meio sobrenadante foi adicionado 1,5 mL de meio MEM a 40-45 °C contendo ágar na concentração final de 0,5% (p/v), para obter uma fina e homogênea camada sobre as células. Após a solidificação, as amostras e os controles foram cuidadosamente colocados sobre o ágar e as placas foram incubadas a 37 °C, 5,0% CO₂, 24 h. Os testes das amostras e controles foram feitos em duplicata. Todas as placas tiveram seu crescimento celular examinado em microscópio invertido antes e após a incubação. A reatividade biológica foi descrita e classificada de acordo com a Tabela 1.

2.7.2.2 *Contato direto*

Para os testes por contato direto, as placas foram preparadas da mesma forma como descrito no ensaio de difusão, exceto pela adição do ágar, que foi substituído por 600 µL de meio MEM, que foi a quantidade adequada para permitir o contato das amostras e controles com as células e mantê-las hidratadas. A interpretação dos resultados foi realizada da mesma forma que o teste de difusão em ágar. Os testes das amostras e controles foram feitos em duplicata.

Para ambos os procedimentos, o sistema de ensaio de cultura de células é considerado adequado se as respostas observadas forem classificadas como nível 0 (sem reatividade) para o controle negativo e no mínimo nível 3 (moderada) para o controle positivo. Para a interpretação da reatividade foi utilizado o microscópio para verificar a morfologia celular, sendo que a medição do halo foi realizada com auxílio de paquímetro (macroscopicamente).

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

Classificação	Reatividade	Descrição da Zona de Reatividade
0	Nenhuma	Nenhuma zona detectável ao redor ou sob a amostra
1	Leve	Células mal formadas ou degeneradas sob a amostra
2	Suave	Zona limitada à área sob a amostra
3	Moderada	Zona estende-se de 5,0 a 10,0 mm além da amostra
4	Forte	Zona estende-se mais que 10,0 mm além da amostra

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

2.7.3 Ensaio de redução do sal de tetrazólio – MTT

Utilizou-se o protocolo descrito por Mosmann (1983), modificado para placa de 96 poços com células Caco-2 (ISO, 2009; SCHMIDT et al., 2011). Em cada poço foi adicionado 100 μL da suspensão celular com aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células. mL^{-1} . Após fixação e crescimento celular (24 h, 37 °C e 5,0% CO_2) transferiu-se 50 μL de cada amostra diluída e/ou ressuspensa em meio MEM nas concentrações 33, 66, 100, 133, 166, 200, 266 e 333 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, para os nanowhiskers e as gomas xantanas e concentrações de 5; 12,5; 25; 37,5; 50% (v/v) para as glicerinas, seguido de incubação por 24 h, 37 °C e 5,0% CO_2 . Para o controle positivo adicionou-se 1 μL de partenolídeo (20 mM) e 49 μL de meio MEM e para o controle negativo foi adicionado 50 μL de MEM. Após este período, o sobrenadante foi aspirado, as células foram lavadas com 100 μL de PBS estéril e, a cada cavidade foi adicionado 50 μL de MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] recentemente preparado a 0,5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ em MEM. Após incubação adicional de 3h (37 °C, 5% CO_2) o sobrenadante foi aspirado e as células foram lavadas com PBS estéril. A extração do formazan gerado pelas células foi realizada com DMSO (100 μL) e após 1h de incubação determinou-se a absorbância de cada cavidade a 595nm. As amostras e os controles foram testados em duplicata. A viabilidade celular, expressa em percentual, foi calculada a partir da comparação da absorbância média da amostra em relação à absorbância média do controle negativo, considerada como 100% de viabilidade.

2.8 Análise Estatística

Para análise dos dados foi utilizada a estatística descritiva simples para avaliação de fatores como a média, desvio padrão e desvio padrão relativo. Os testes estatísticos foram realizados com um nível de significância de 5%.

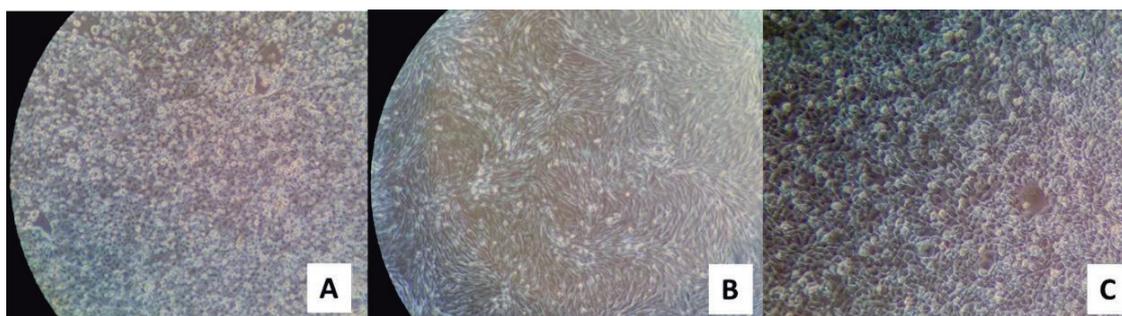
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Implementação e adequação dos bioensaios

Para a implementação dos ensaios de biorreatividade por contato direto ou indireto (com ágar) testou-se inicialmente o tamanho das placas e a concentração celular. Para as três linhagens celulares foram avaliadas as concentrações de $1,0 \times 10^5$; $5,0 \times 10^5$ e $1,0 \times 10^6$ células.mL⁻¹ em placas com diâmetro de 30 mm, 60 mm e 100 mm, que receberam volumes de 2,0; 4,0 e 6,0 mL das suspensões celulares, respectivamente. Observou-se que as concentrações abaixo de $1,0 \times 10^6$ células.mL⁻¹ atingiram 80 a 90% de confluência em períodos superiores a 24 h, principalmente as células Caco-2 que têm uma taxa de crescimento lenta, necessitando em média de 32 h para dobrar a população celular (FRESHNEY, 2010).

Nestas condições, as placas de 30 mm proporcionaram taxa de crescimento satisfatória em função do menor diâmetro e da proximidade entre as células. Entretanto, devido à pequena área disponível, poucas amostras podem ser adicionadas em uma mesma placa. As placas de 100 mm são adequadas para o teste simultâneo de várias amostras, porém necessitam o preparo de uma grande quantidade de células, o que significa um custo efetivo mais alto para a realização do experimento, pois impacta diretamente nos gastos com os consumíveis. A condição de ensaio que utilizou placas de 60 mm de diâmetro, com 4 mL da suspensão contendo $1,0 \times 10^6$ células.mL⁻¹ foi selecionada para a continuação dos ensaios por apresentar uma ótima confluência para todas as células em 24 h (Figura 1), com área de superfície para até 4 posições de aplicação da amostra além dos controles e, por possibilitar a execução de todo o experimento em um prazo total de 48 h incluindo a leitura final.

FIGURA 1- Confluência celular obtida nas placas de 60 mm incubadas por 24 h com 4 mL da suspensão de 1×10^6 células.mL⁻¹ para (A) Caco-2, (B) SIRC e (C) NCTC L929.



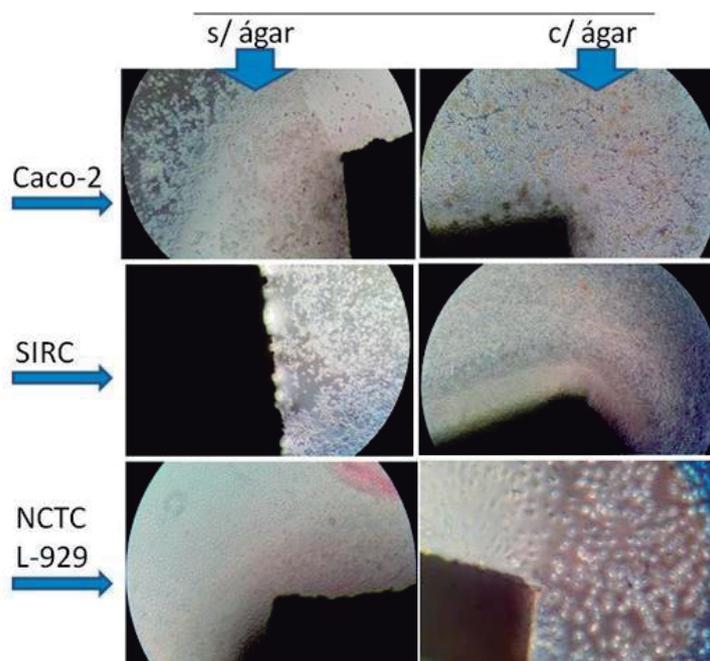
Fonte: próprio autor

Na sequência, foi determinada a concentração de ágar e seu volume (espessura) na placa para o ensaio por contato indireto. Os procedimentos descritos nas Farmacopeias e nos protocolos internacionais para ensaio de biorreatividade de polímeros de uso médico-hospitalar e farmacêutico não trazem estas informações do procedimento de forma detalhada, recomendando apenas que após atingir a confluência celular, o meio de cultivo seja removido e substituído por meio de cultivo recente contendo ágar ou agarose em uma concentração final de 0,5 a 3% (ISO, 2007; 2009; ASTM, 2006; 2007; BRASIL, 2010; USP, 2015).

A concentração e o volume de agar na camada de superfície são parâmetros importantes a serem estabelecidos, pois a difusão da amostra tende a diminuir com o aumento da espessura do ágar, podendo afetar diretamente o resultado. Foram avaliadas concentrações finais de ágar de 0,5%, 0,67% e 1,0% (p/v) no meio MEM, e volumes de 1,2 mL, 1,4 mL, 1,5 mL, 1,8 mL na placa de 60 mm que foi selecionada para continuidade dos experimentos. A concentração final de 0,5% (p/v) de ágar no meio MEM, com volume de 1,5 mL de meio foi a condição que permitiu a preparação satisfatória das placas e apresentou resultados de biorreatividade equivalentes ao ensaio por contato direto nos testes com o controle positivo (C+) para todas as linhagens celulares (Figura 2).

No teste de contato direto foi necessário estabelecer e padronizar o volume de meio a ser adicionado sobre a monocamada celular propagada nas placas de 60 mm antes da deposição das amostras e controles. Buscou-se estabelecer a menor quantidade possível de meio a ser adicionado, de forma a manter as células submersas e, ao mesmo tempo, permitir o contato das amostras com a monocamada sempre na mesma posição de aplicação durante o período de incubação de 24 h, evitando assim que as amostras mais leves fossem deslocadas com a movimentação do meio. Dentre os volumes testados, a menor quantidade de meio MEM que permitiu a manutenção da viabilidade celular, sem deslocar a amostra da sua posição de aplicação nas placas foi o volume de 600 μ L.

FIGURA 2- Reatividade biológica (morte celular) das células Caco-2, SIRC e L929 no teste de contato direto (sem ágar) e de difusão (com ágar), utilizando fragmento de látex de 0,25 cm² como controle positivo.



Fonte: próprio autor

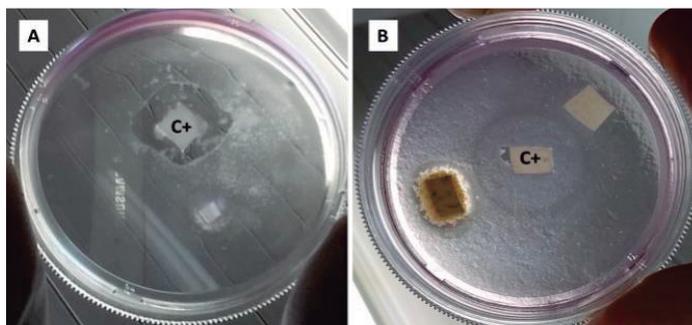
O controle positivo, quando avaliado por contato direto e por difusão em ágar (contato indireto) nas células Caco-2 apresentou resultados semelhantes (Figura 3). Nos testes por difusão em ágar, o C+ apresentou halos de reatividade (morte celular) com tamanho médio de 5,5 mm, medido com paquímetro a partir da borda do fragmento de látex. Neste caso, o halo formado apresentou uma circunferência mais regular devido a difusão homogênea dos compostos através do ágar. Quando observado em microscópio, as células não viáveis apresentavam morfologia alterada e tamanho reduzido, perdendo o contato entre elas.

Nos ensaios de contato direto, o C+ apresentou halos com tamanho médio de 4,5 mm, portanto, menores e mais irregulares, como pode ser observado na Figura 3. Macroscopicamente pode-se verificar que, na maioria dos casos as células se desprendem da placa, facilitando a observação e medição do halo, porém devido a sua irregularidade, a medida do halo deve ser feita em todas as faces da amostra para expressar o valor médio. Sob observação em microscópio, as células não viáveis apresentavam morfologia alterada e tamanho reduzido.

Para os dois sistemas de ensaio, ficou comprovado que, dentro das condições estabelecidas na fase de implementação e adequação, ambos reagem de forma

semelhante à presença de substâncias com atividade citotóxica do fragmento de látex utilizado como controle positivo (C+).

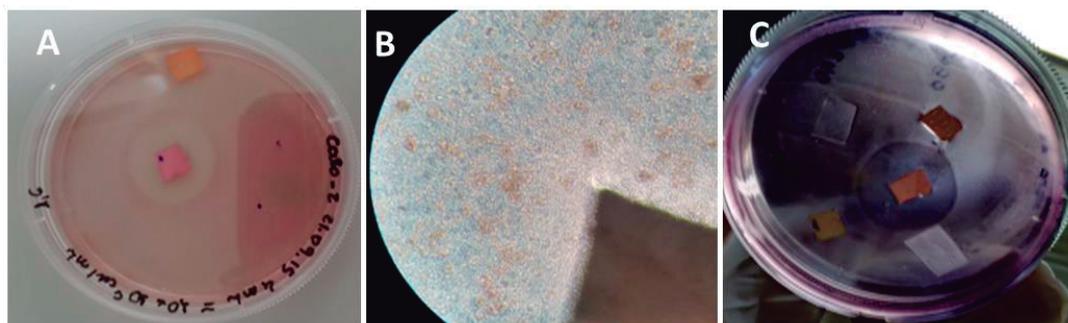
FIGURA 3 - Zona de reatividade observada para o controle positivo (fragmento de látex: C+) sobre monocamada confluyente de células Caco-2, após 24h de contato, sem ágar (A) e com ágar (B).



Fonte: próprio autor

Para facilitar a visualização do halo de reatividade nos ensaios com ágar, utilizou-se o corante vermelho neutro (cloridrato de 3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina) que é incorporado pelas células que permaneceram viáveis. O corante a 0,4% (p/v) diluído a 1:80 em meio MEM foi adicionado às placas ao final da incubação das amostras e o resultado pode ser observado na Figura 4. O halo formado pelo C+ após 24 h de contato com as células Caco-2 e L929 pode ser visualizado na Fig. 4A e 4C, respectivamente. Fica evidente a ausência de cor devido a não incorporação do corante nas células próximas ao fragmento de látex. A Figura 4B apresenta o controle negativo (C-) com destaque para as células viáveis que incorporaram o corante. A utilização do corante permite diferenciar claramente as células não viáveis das demais, facilitando a medição do tamanho do halo de reatividade.

FIGURA 4 - Ensaio de difusão em ágar com adição de corante vermelho neutro às células Caco-2 em contato com (A) o controle positivo e (B) controle negativo; e (C) células L929 em contato com o controle positivo.



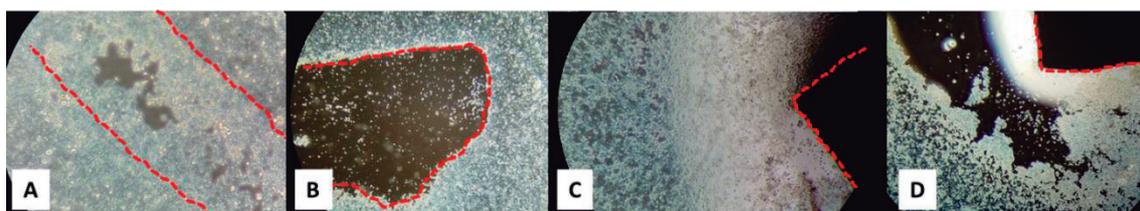
Fonte: próprio autor

Os ensaios por contato direto e difusão em ágar, foram considerados adequados, pois as respostas observadas foram classificadas como nível zero (sem reatividade) para o controle negativo e, no mínimo, nível 3 (moderada) para o controle positivo, conforme a recomendação descrita nos protocolos para ensaio de biorreatividade de biomateriais e polímeros de uso em materiais médico-hospitalares (BRASIL, 2010; USP, 2015).

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

A Figura 5 apresenta exemplos dos graus de reatividade obtidos nos testes com as células epiteliais Caco-2, interpretados de acordo com a gradação de biorreatividade (Tabela 1) recomendada para testes de biomateriais e outros polímeros utilizados em materiais de uso médico-hospitalar, a qual foi adotada para as amostras avaliadas pelos bioensaios que estão sendo propostos por este estudo. Atribui-se grau **zero** de reatividade quando as células sob e ao redor da amostra permanecem inalteradas. O grau **leve** é atribuído quando são observadas células com morfologia alterada, porém viáveis, somente na área sob a amostra. Quando ocorrer morte celular somente sob a área da amostra esta reatividade foi classificada como **suave**. Quando o halo de morte celular se estender entre 5,0 e 10,0 mm, a resposta é graduada como **moderada**. Para halos com diâmetro superior a 10,0 mm além da borda da amostra é atribuída reatividade **forte**.

FIGURA 5– Exemplos de classificação da biorreatividade em graus (A) leve, (B) suave, (C) moderado e (D) forte, observados nas células Caco-2 após 24 h de contato direto com a amostra. Área pontilhada indica a posição da amostra.



Fonte: próprio autor

Os primeiros resultados obtidos com as duas metodologias demonstraram que os testes foram promissores e, portanto, poderiam ser aplicados às amostras elencadas no estudo, dentro das condições estabelecidas. Observou-se que, além da boa reprodutibilidade, são métodos rápidos, tem boa sensibilidade e são financeiramente viáveis para a execução dos estudos propostos.

A partir da comprovação que as células Caco-2 e SIRC apresentaram reatividade ao C+ da mesma forma que os fibroblastos L929 tradicionalmente utilizados em protocolos para avaliação da biorreatividade de materiais poliméricos de uso médico-hospitalar, os experimentos foram continuados somente com as células epiteliais intestinais (Caco-2) para buscar evidências da presença de componentes tóxicos nas amostras, os quais podem ser transferidos para os alimentos e assim causar toxicidade em células do aparelho digestivo.

3.2 Citotoxicidade por contato direto e por difusão em ágar

Nos ensaios de citotoxicidade uma grande variedade de células são classicamente utilizadas, destacam-se as células epiteliais de córnea, células pulmonares, células de ovário de hamster chinês (CHO), células renais de hamster (BHK), células renais caninas, células hepáticas de rato (RL4) e a linhagem celular L929 oriunda de fibroblastos de camundongos. Esta última é a linhagem indicada nos protocolos ISO, ASTM e Farmacopeicos para ensaios de biorreatividade de polímeros médico-hospitalares (GAD; McCORD, 2008). Para possibilitar a comparação de resultados e otimizar os bioensaios, é importante a padronização e a harmonização dos procedimentos e abordagens experimentais, assim como o uso de ensaios adequados com linhagens celulares bem caracterizadas, de preferência, de origem humana.

Os testes de reatividade das amostras sólidas (filmes convencionais e biodegradáveis, biopolímero, embalagens metálicas e revestimentos de caixa de alimentos) sobre as células de epitélio intestinal (Caco-2) utilizando a metodologia por contato direto e por difusão em ágar apresentaram os resultados resumidos na Tabela 2. Em todas as análises o controle positivo apresentou halo médio superior a 5,0 mm, determinado a partir da borda do fragmento de látex. O controle negativo foi utilizado em todos os ensaios e não apresentou reatividade. Todas as amostras foram testadas em duplicata, por meio de ensaios independente

TABELA 2 - Biorreatividade das amostras e controles, após 24 h de incubação, com células Caco-2 por contato direto e difusão em ágar.

Amostra	Contato direto		Difusão em ágar	
	Clas.	Reatividade	Clas.	Reatividade
Controle +	4	Forte	4	Forte
Controle -	0	N	0	N
PBAT	0	N	0	N
Amido + NA	1	Leve	0	N
PBAT + NA	0	N	0	N
PEBD	2 a 3	Suave a moderada	1	Leve
PPBM	2 a 3	Suave a moderada	2	Suave
PEAD	0	N	0	N
PP	1	Leve	0	N
PHA (P)	2 a 3	Suave a moderada	2 a 3	Suave a moderada
PHA (U)	2	Suave	0	N
PHA (C)	0	N	0	N
Acetato	0	N	0	N
Acetato + baunilha	0	N	0	N
Emb. embutidos cárneos	0	N	0	N
Emb. patê	0	N	0	N
Revestimento cx. suco	0	N	0	N
Revestimento cx. leite	0	N	0	N
Emb. de queijo	0	N	0	N
Emb. doce de amendoim	1	Leve	2	Suave
Emb. metálica (leite em pó)	0	N	0	N
Emb. metálica (leite cond.)	0	N	0	N

Legenda: (N): sem reatividade. PBAT: poli(butileno adipato co-tereftalato); PEBD: polietileno de baixa densidade; PEAD: polietileno de alta densidade; PP: polipropileno; PPBM: polipropileno biorientado metalizado; PHA: polihidroxialcanoato; NA: nanopartículas de amido.

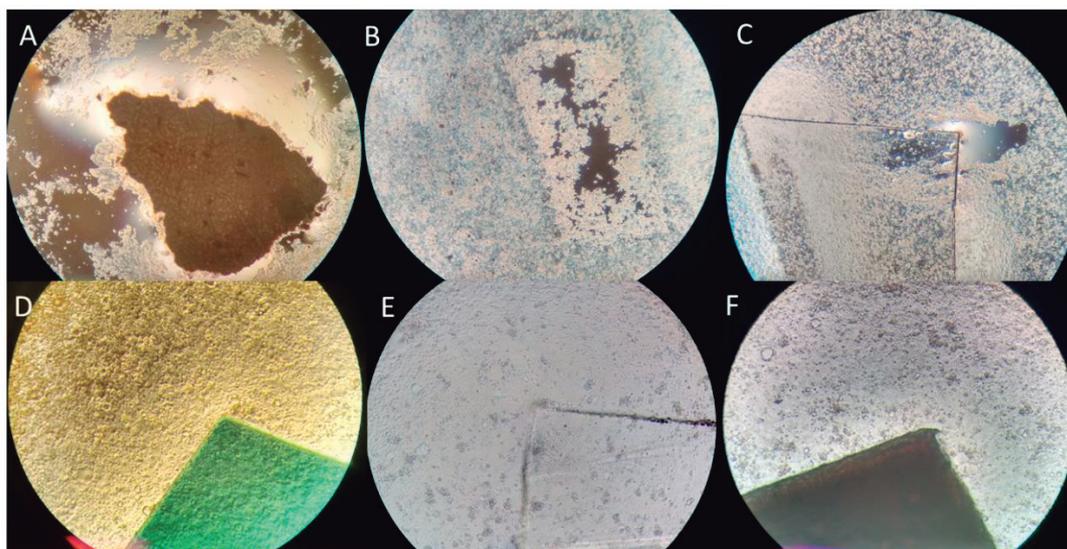
De acordo com os dados apresentados na Tabela 2, das vinte (20) amostras analisadas pelo protocolo do contato direto, sete (7) apresentaram reatividade nas células. Com a adição da camada de ágar, o número de amostras com algum grau de reatividade foi reduzido para quatro (4) amostras, o que pode ser explicado pela presença do ágar, uma vez que sua espessura, o grau de polimerização e a característica de difusibilidade das substâncias neste meio pode potencializar ou inibir a resposta biológica. Com a técnica de difusão em ágar, observou-se que o grau de resposta mais elevado, classificado entre suave e moderado (nível 2 a 3), ocorreu em apenas uma amostra.

Normalmente a camada superficial de ágar, é utilizada para evitar que a amostra cause dano mecânico às células, porém esta camada deve ter características de

composição e espessura que permitam a difusão de substâncias lixiviáveis presentes nas amostras.

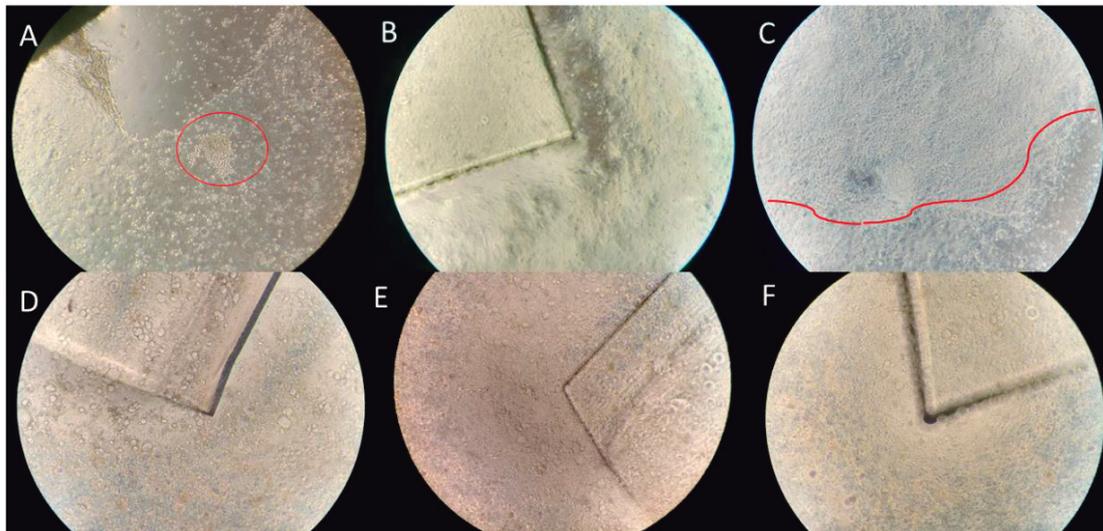
No ensaio por contato direto, como o próprio nome indica, a amostra é colocada diretamente sobre a monocamada celular, o que pode levar a um aumento da sensibilidade do bioensaio (ASTM, 2006; 2007; BRASIL, 2010; USP, 2015). As Figuras 6 e 7 ilustram graus de biorreatividade observados para algumas amostras sobre as células Caco-2 em contato direto e indireto, respectivamente. Amostras apresentando citotoxicidade (6A, 6B, 6C), (7A, 7B, 7C) e amostras sem reatividade (6D, 6E, 6F), (7D, 7E, 7F).

FIGURA 6- Exemplos de respostas observadas no ensaio por contato direto Caco-2. (A) PHA-P, (B) PPBM, (C) PP, apresentaram citotoxicidade. (D) Acetato + baunilha, (E) embalagem de produtos cárneos, (F) PBAT + NA, não apresentaram citotoxicidade.



Fonte: próprio autor.

FIGURA 7- Exemplos de respostas observadas no ensaio por contato indireto em células Caco-2. (A) embalagem de doce de amendoim; (B) PEBD; (C) PPBM, apresentaram citotoxicidade. (D) embalagem para produtos cárneos; (E) embalagem de patê; (F) PP, não apresentaram citotoxicidade.



Fonte: próprio autor.

Para efeito de comparação dos dados obtidos com as células de epitélio intestinal humano (Caco-2) todas as amostras também foram avaliadas na linhagem celular recomendada pelos protocolos internacionais para avaliação de materiais poliméricos de uso médico-hospitalar, a linhagem L929 de fibroblastos de camundongo. A Tabela 3 apresenta os resultados dos ensaios por contato direto e por difusão em ágar realizados com os fibroblastos. Oito amostras apresentaram reatividade, sendo 4 delas com resposta entre suave e moderada (nível 2 a 3). Na presença da camada de ágar, observou-se novamente uma diminuição na intensidade das respostas, assim como destacado para nos ensaios com as células Caco-2. Em todos os testes, o controle positivo apresentou halo médio superior a 5,0 mm e o controle negativo não apresentou reatividade. As amostras foram avaliadas em duplicata, por meio de ensaios independentes.

TABELA 3 - Biorreatividade das amostras e controles, após 24 h de incubação, com fibroblastos L929 por contato direto e difusão em ágar.

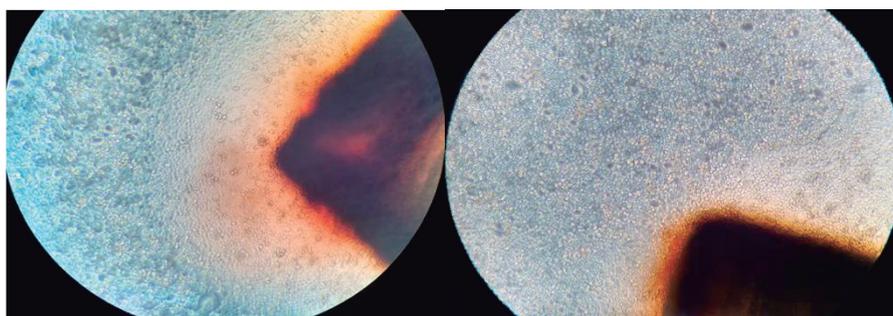
Amostra	Contato direto		Difusão em ágar	
	Clas.	Reatividade	Clas.	Reatividade
Controle +	4	Forte	4	Forte
Controle -	0	N	0	N
PBAT	0	N	0	N
Amido + NA	1	Leve	0	N
PBAT + NA	0	N	0	N
PEBD	2 a 3	Suave a moderada	2	Suave
PPBM	2 a 3	Suave a moderada	2	Suave
PEAD	0	N	0	N
PP	2 a 3	Suave a moderada	1	Leve
PHA (P)	2 a 3	Suave a moderada	2 a 3	Suave a moderada
PHA (U)	2	Suave	2	Suave
PHA (C)	2	Suave	2	Suave
Acetato	0	N	0	N
Acetato + baunilha	0	N	0	N
Emb. embutidos cárneos	0	N	0	N
Emb. patê	0	N	0	N
Revestimento cx. suco	0	N	0	N
Revestimento cx. leite	1	Leve	2	Suave
Emb. de queijo	0	N	0	N
Emb. doce de amendoim	0	N	0	N
Emb. metálica (leite em pó)	0	N	0	N
Emb. metálica (leite cond.)	0	N	0	N

Legenda: (N): sem reatividade. PBAT: poli(butileno adipato co-tereftalato); PEBD: polietileno de baixa densidade; PEAD: polietileno de alta densidade; PP: polipropileno; PPBM: polipropileno biorientado metalizado; PHA: polihidroxialcanoato; NA: nanopartículas de amido.

Em uma análise comparativa, observou-se que, exceto pelas amostras de revestimento de caixa de leite e o filme PHA (C) que não reagiram nas células Caco-2 e a embalagem de doce de amendoim que não reagiu com as células L929, os demais resultados foram muito semelhantes, inclusive quanto ao grau de intensidade de resposta. Notadamente, o ensaio por contato direto demonstrou maior sensibilidade em ambas as células, o que poderia ser interpretado pelo fato de que, algum dano mecânico influenciou o resultado, porém há de se destacar a robustez da metodologia por contato direto, pois como mostram as Tabelas 2 e 3, e a Figura 8, as amostras de embalagens metálicas não apresentaram nenhum indício de dano às células quando testadas sem ágar. Apesar da Figura 8A mostrar um halo claro em torno fragmento metálico, esse halo é devido à dispersão da luz. Quando a amostra foi removida, observou-se que as células não apresentavam nenhuma alteração morfológica. De fato, os protocolos para

avaliação de citotoxicidade recomendam que o ágar ou a agarose sejam utilizadas quando é necessário proteger as células caso a amostra represente risco de dano mecânico (ASTM, 2006; 2007; BRASIL, 2010; USP, 2015), porém deve-se avaliar a real necessidade da adição do ágar, uma vez que a preparação deste ensaio é mais elaborada, pois a deposição do meio contendo o ágar sobre a camada celular deve ser realizada de forma rápida e com o meio aquecido entre 40 a 45 °C, para que se obtenha uma camada perfeitamente uniforme sem agredir as células.

FIGURA 8- Amostra embalagem metálica: (A) lata de leite condensado; (B): lata de leite em pó. Sem irregularidades ou danos na monocamada celular.



Fonte: próprio autor

Quando um alimento entra em contato direto com um material de embalagem, qualquer que seja sua natureza há interações entre eles. Estas interações podem levar à adsorção de constituintes oriundos do material de embalagem e conseqüente alteração de características sensoriais. Por outro lado, muitos compostos possuem baixa massa molecular e se difundem facilmente através do polímero. Como conseqüência, há uma tendência de transferência (migração) destes compostos para a superfície do material, com posterior interação com o produto acondicionado, podendo causar a exposição do consumidor a substâncias com potencial tóxico (ARVANITOYANNIS; BOSNEA, 2004). A transferência de substâncias da embalagem para o alimento varia de acordo com a composição do material, com o processo de fabricação da embalagem, com o nível de degradação do material decorrente dos processos de transformação, entre outros fatores (KONKOL et al., 2003).

Parâmetros relacionados à natureza química do produto embalado, além de condições de tempo e temperatura de contato entre produto e embalagem também são críticos para a determinação do risco potencial de contaminação.

Apesar de características de atoxicidade citada na literatura, foi observado neste estudo que nas amostras dos filmes a base de polipropileno [convencional (PP) e

biorientado metalizado (PPBM)] e de polietileno de baixa densidade (PEBD), ocorreu migração de produtos tóxicos, evidenciada pelas alterações morfológicas e até mesmo a morte celular após 24 h de contato com estes materiais (Tabelas 2 e 3). E entre as causas está a possibilidade da presença de monômeros, oligômeros e polímeros de baixa massa molecular; agentes de polimerização tais como catalisadores, emulsificantes, produtos de decomposição de iniciadores e aditivos; impurezas de agentes de polimerização e aditivos; aditivos utilizados para os processos de transformação, solventes provenientes da composição de tintas de impressão e outras substâncias contaminantes (CATALÁ; GAVARA, 2002; KUZNESOF, 2002; KONKOL et al., 2003; ARVANITTOYANNIS; BOSNEA, 2004).

A amostra de polietileno de alta densidade (PEAD) não apresentou nenhum efeito em todos os ensaios realizados (Tabelas 2 e 3). De fato, as Farmacopeias e os protocolos de ensaio recomendam o uso de polietileno de alta densidade como controle negativo nos ensaios de biorreatividade em função de ser um material mais inerte, portanto, com menor tendência de interagir mais com ambiente ou com o que está em contato (ASTM, 2006; 2007; BRASIL, 2010; USP, 2015).

O principal componente dos filmes de amido pode ser degradado por fungos e/ou bactérias e pela ação de enzimas, resultando na formação de CO₂, água e açúcares. No caso de blendas (amido + plásticos), o amido degrada mais rapidamente, favorecendo a degradação da matriz sintética por facilitar o acesso de microrganismos, podendo ser total ou parcialmente biodegradável (FRANCHETTI; MARCONATO, 2006). Talvez seja esta uma das possíveis causas da amostra de amido + nanoamido ter provocado danos às células, embora o nanoamido tenha se comportado como não tóxico nos ensaios e é considerado um material atóxico com grande aplicação na produção de nanocompósitos e filmes ativos para embalagens de alimentos (SHAH et al., 2015).

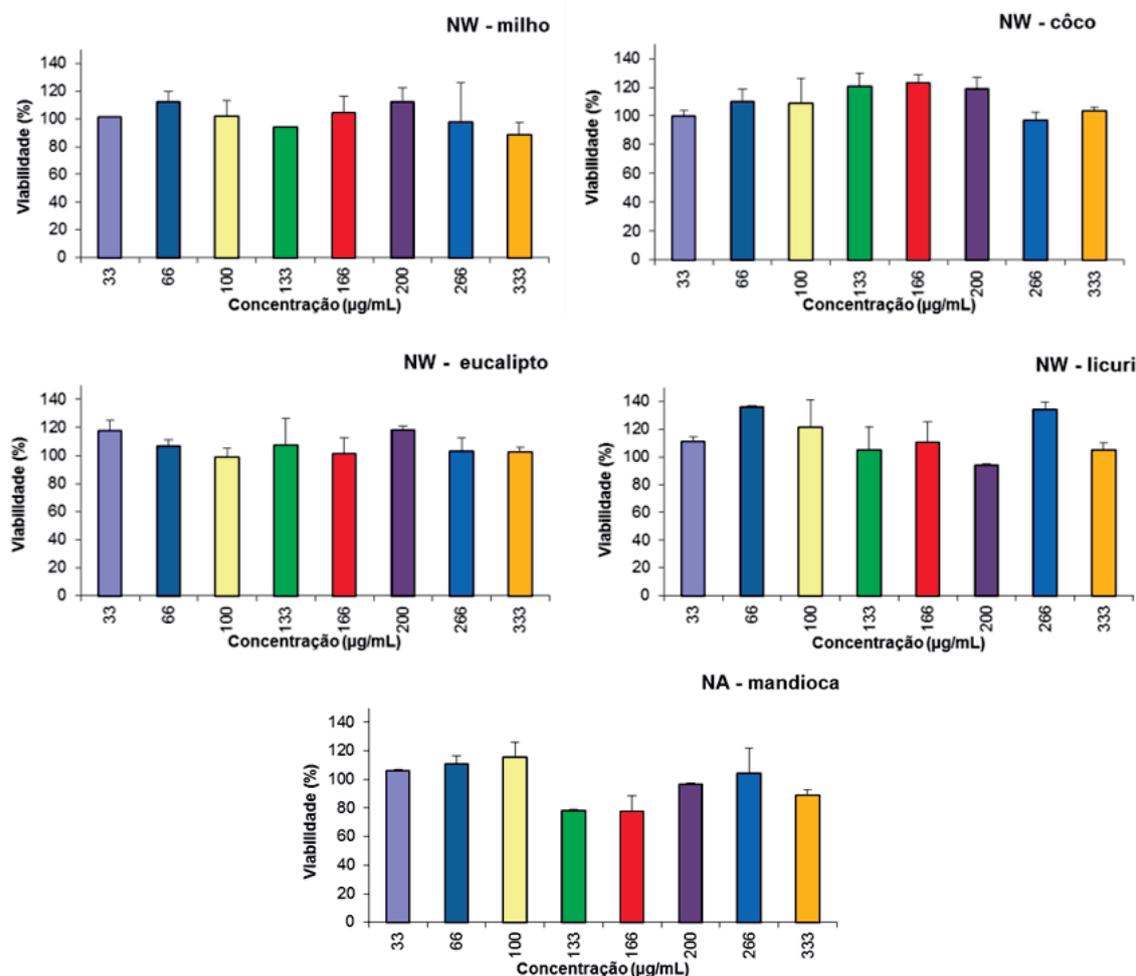
3.3 Citotoxicidade por MTT

Testes iniciais com células Caco-2 foram realizados de forma comparativa com os fibroblastos L929. Verificou-se a necessidade de iniciar o experimento com uma concentração celular de Caco-2 contendo $1,0 \times 10^6$ células.mL⁻¹ para obter confluência em 24 h.

No ensaio de MTT, foram testadas as amostras líquidas e as micronizadas que são utilizadas na composição de alguns dos filmes de embalagem avaliados nos ensaios de contato direto e por difusão em ágar. Os nanowhiskers de celulose de milho, côco, eucalipto e licuri, assim como as nanopartículas de amido de mandioca, utilizados para melhorar a qualidade e propriedades de filmes destinados a embalagens alimentícias foram submetidos ao ensaio de MTT nas concentrações de 33, 66, 100, 133, 166, 200, 266 e 333 µg.mL⁻¹. Após 24 h de contato com as células Caco-2 não se observou citotoxicidade, conforme pode ser observado nos gráficos que compõem a Figura 9. Os resultados obtidos não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) entre as concentrações avaliadas quando analisadas pelo teste Tukey.

Apesar de que os estudos toxicológicos de materiais celulósicos ainda se encontram em estágio inicial (JORFI; FOSTER, 2015), existem dados na literatura que descrevem que concentrações de nanocristais de celulose (CNC) entre 0,02 a 100 µg.mL⁻¹ não causaram citotoxicidade, já concentrações acima de 200 µg.mL⁻¹ induziram a morte celular e alterações na expressão gênica em fibroblastos (DONG et al., 2012; PEREIRA et al., 2013). Já Yang et al. (2013) avaliaram CNCs isolados de algodão pelo ensaio do MTT em fibroblastos 3T3 e observaram uma pequena diminuição da viabilidade nas concentrações entre 100 a 1000 µg.mL⁻¹ após 1 dia de exposição. Entretanto estudos com as células Caco-2 não foram encontrados na literatura.

FIGURA 9- Viabilidade celular (%) das células Caco-2 após 24 h de contato com as amostras de nanowhiskers (NW) de milho, côco, eucalipto, licuri e nanopartículas de amido (NA) de mandioca, determinada por meio do ensaio de MTT. Barra de erro: desvio padrão da média.



Fonte: próprio autor

A utilização de nanocelulose em materiais biomédicos como implantes, engenharia de tecidos, liberação de fármacos, cicatrização de feridas, aplicações cardiovasculares e outras, tem apresentado um grande desenvolvimento nos últimos anos devido às suas excelentes propriedades físicas e biológicas, em particular a sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade (JORFI; FOSTER, 2015).

Dentre os processos de preparação de nanowhiskers de celulose, independente da fibra lignocelulósica utilizada, destacam-se os processos químicos, que após as etapas de extração da polpa de celulose geram as nanopartículas por hidrólise ácida com a utilização de ácidos fortes, como sulfúrico (H_2SO_4) e/ou clorídrico (HCl). As nanofibras de celulose são uma classe atraente de nanomateriais para a elaboração

nanocompósitos de alta resistência, leves e de baixo custo (HELBERT et al., 1996; PODSIADLO et al., 2005).

Poucos estudos estão presentes na literatura sobre a migração das nanopartículas da embalagem para os alimentos (AVELLA et al., 2005; CHAUDHRY et al., 2008; SIMON et al., 2008). Em estudos que avaliaram a migração de argila a partir de garrafas PET e filmes de fécula de batata e amido de batata com blendas de poliéster, observou-se uma migração detectável de nanoargila, porém insignificante. Outro estudo relata a migração de nanopartículas de prata de embalagens de alimentos, compósitos de nanopartículas de prata em polipropileno. Também neste caso o nível de migração detectado foi inferior ao limite de quantificação. Embora estes casos pareçam dar algumas garantias sobre a segurança, o número de testes sobre a migração ainda é muito limitado e uma investigação mais aprofundada precisa ser realizada antes de usar esses materiais (SILVESTRE et al., 2011).

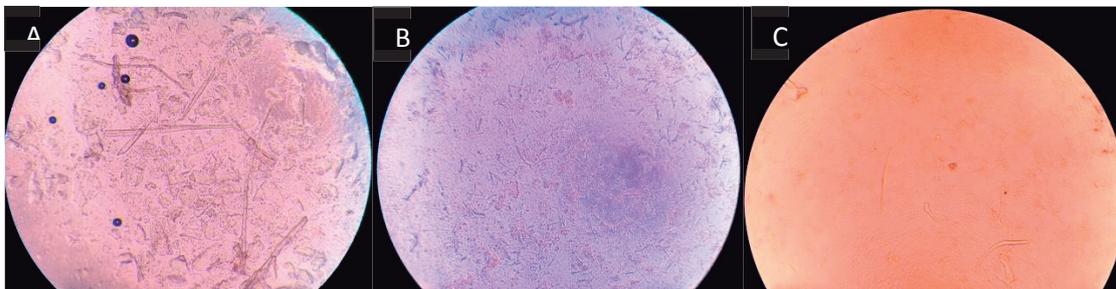
Evidências científicas relatam que nanopartículas livres podem atravessar barreiras celulares e que a exposição de algumas destas nanopartículas podem conduzir a danos oxidativos e reações inflamatórias (BORM et al., 2006; HUNT; MEHTA, 2006; NEL et al., 2006; POWERS et al., 2006; FISCHER; CHAN, 2007; WIESNER; BOTTERO, 2007; CHAUDHRY et al., 2008; LEWINSKI et al., 2008; MROZ et al., 2008; BOUWMEESTER et al., 2009). A viabilidade celular das células Caco-2 foi testada frente a formulações de nanopartículas de zeína - caseína sódio (CAS) nas concentrações de 0,2; 0,5 e 1,0 mg.mL⁻¹. Nenhum efeito tóxico foi detectado sobre a viabilidade celular em todas as concentrações avaliadas durante os três dias de incubação (LUO et al., 2013).

Segundo estudo realizado por Juliano e colaboradores (2011), a solução de quitosana malato (CM) afetou a viabilidade celular de forma dose dependente. A CM foi considerada não-tóxica em concentrações de 0,05 a 2,5 mg.mL⁻¹, mas a viabilidade celular diminuiu gradualmente após o tratamento com 5 mg.mL⁻¹ e 10 mg.mL⁻¹, atingindo o valor mínimo de 5±2% a 15 mg.mL⁻¹, nesta concentração, a mortalidade celular foi próxima ao do controle positivo (2 ± 1%).

A Figura 10 mostra imagens obtidas do ensaio de MTT com nanopartículas de milho (Fig. 10A), nanopartículas de licuri (Fig. 10B), e nanopartícula de eucalipto (Fig.

10C). Evidenciando o contato das partículas com as células, sem contudo apresentar citotoxicidade.

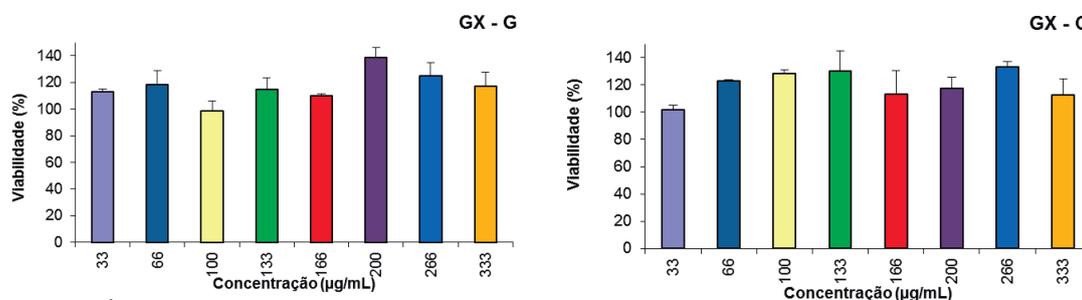
FIGURA 10- Fotomicrografia dos nanowhisker de (A) milho $333\mu\text{g.mL}^{-1}$; (B) de licuri $333\mu\text{g.mL}^{-1}$ e (C) de eucalipto $333\mu\text{g.mL}^{-1}$ em contato com as células Caco-2 durante o ensaio de MTT. Aumento de 100x.



Fonte: próprio autor.

A goma xantana, tradicionalmente utilizada como aditivo alimentar em função de suas excelentes propriedades poliméricas e viscoelásticas, também foi avaliada no ensaio de MTT, e as duas amostras de goma xantana analisadas não apresentaram citotoxicidade nas condições avaliadas (Figura 11), o que corrobora com os dados de inocuidade atribuídos a este composto, que está muito presente no nosso cotidiano, incluindo alimentos, cosméticos, medicamentos entre outros (MATEESCU et al., 2015; SCARFATO et al., 2015) A goma xantana possui classificação E 415 na Lista Europeia de Aditivos Alimentares Permitidos, não recebendo, portanto nenhuma limitação de consumo, além de possuir o status de Ingestão Diária Aceitável (IDA) não especificada de acordo com a Comissão de Especialistas em Aditivos Alimentares da OMS/FAO (JECFA) (RASCHIP et al., 2011).

FIGURA 11- Viabilidade celular (%) das células Caco-2 após 24 h de contato com a goma xantana “G” e “C”, determinada por meio do ensaio de MTT. Barra de erro: desvio padrão da média.



Fonte: próprio autor.

Em trabalhos desenvolvidos no Laboratório de Análises Aplicadas e de Biomateriais (LAPBIM) da Universidade Federal da Bahia, a amostra de glicerina residual de biodiesel “C” (GC) foi utilizada como substrato fermentescível para

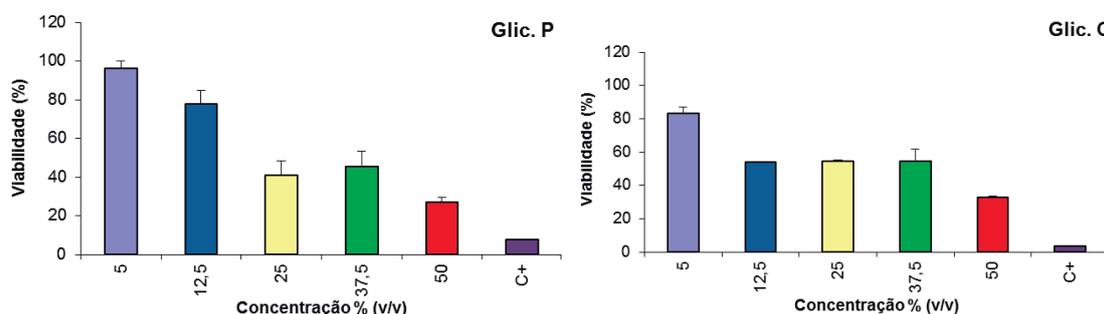
produção da goma xantana, identificada por GX-C (BRANDÃO et al., 2013; ASSIS et al., 2014a; 2014b). Neste sentido, ao avaliar a toxicidade da glicerina “C” no ensaio de MTT foi observado que a mesma apresentou resposta citotóxica dose dependente nas células Caco-2, com diferenças significativas de viabilidade celular entre as concentrações ($p < 0,05$; Tukey) e também com relação ao controle (Figura 12). Entretanto nenhum efeito tóxico residual parece ter sido transferido para o biopolímero GX-C conforme mostra a Figura 11. Este dado é interessante, e contribui ainda mais para a segurança no uso deste biopolímero, mesmo quando produzido a partir de substratos alternativos, como neste caso da amostra GX-C.

Em estudos desenvolvidos por Campos e cols. (2014), as glicerinas GP; GU e GC também foram utilizadas como fonte alternativa de carbono para o *Cupriavidus necator* IPT 026 durante a produção dos polihidroxialcanoatos PHA (P), PHA (U) e PHA (C), respectivamente, os quais foram avaliados nos ensaios de contato direto e por difusão em ágar (Tabela 2 e 3). Por este motivo, as glicerinas GP e GU também foram avaliadas no ensaio de MTT. A glicerina “U” além de muito viscosa, interferiu no experimento promovendo a auto-redução do MTT, sendo assim, não foi possível avaliar sua citotoxicidade pelo ensaio de MTT.

No caso do polihidroxialcanoato PHA (C), a citotoxicidade observada nas células L929 por contato direto e indireto (Tabela 3) pode estar associada, de alguma forma, ao efeito citotóxico que a glicerina C apresentou no ensaio do MTT (Figura 12), entretanto, pode haver também a influência de outros fatores sobre esta biorreatividade.

A glicerina P (GP) também apresentou resposta citotóxica dose dependente quando avaliada pelo MTT (Figura 12), e o polihidroxialcanoato PHA (P), produzido com esta glicerina, também mostrou citotoxicidade suave a moderada (níveis 2 a 3) quando avaliado no ensaio de contato direto e indireto com as células Caco-2 e L929 (Tabela 2 e 3). Neste caso, também é provável que algum efeito tóxico residual da glicerina seja responsável pela toxicidade observada no polímero, porém mais estudos são necessários, uma vez a resposta biológica pode estar associada a outros elementos que compõem ou estão associados ao o polímero ou seu processo de produção.

FIGURA 12- Viabilidade celular (%) das células Caco-2 após 24 h de contato com a glicerina P e C, determinada por meio do ensaio de MTT. Barra de erro: desvio padrão da média.



Fonte: próprio autor.

O biodiesel com base na transesterificação do lipídio gera um fluxo de glicerol bruto, que representa, em peso, 10% do total de biodiesel produzido (CAVALHEIRO et al., 2012). Embora o glicerol seja uma importante matéria prima industrial, a fase rica em glicerol tem um valor econômico relativamente baixo, devido à presença de impurezas, tais como metanol, sais, mono- e di-glicéridos, e ácidos graxos (CAVALHEIRO et al., 2012; SPOLJARIC et al., 2013).

A pureza do glicerol proveniente do biodiesel varia de 55 a 90%, dependendo da matéria-prima e do processo utilizado na fabricação do biocombustível (AMARAL et al., 2009). Entre as impurezas encontradas podemos citar o hidróxido de sódio, metanol, ácidos graxos livres, sais de ácido graxo, ésteres, compostos de enxofre, proteínas e minerais (THOMPSON; HE, 2006). Tais impurezas fazem com que o glicerol de biodiesel tenha baixo valor agregado. Além disso, decréscimo na viabilidade e mudanças morfológicas como perda de forma e danos na membrana celular foram observados em células expostas a ácidos graxos insaturados (KNAPP; MELLY, 1986; HAZEL; GRAHAM, 1990), que podem estar presentes no glicerol bruto oriundo da produção à partir de óleos vegetais (REHMAN et al., 2008). Já a presença de nutrientes adicionais como fontes de carbono, nitrogênio, cálcio, magnésio, fósforo e sódio no resíduo de glicerol exercem efeito positivo no crescimento de microrganismos (ÇELIK et al., 2008)

Segundo Johnson e Taconi (2007) o glicerol bruto pode conter contaminantes, incluindo metais pesados, tais como Cádmio (Cd), Crômio (Cr), que variam de acordo

com cada refinaria de biodiesel, especificação do metal e pH (VALE et al., 2011). Os gliceróis brutos (GC e GP) foram analisados no estudo de Ribeiro e colaboradores (2015) que identificaram a presença dos metais Cd e Cr, assim como o semimetal arsênio (As) em quantidades abaixo do limite de determinação do espectrofotômetro, com exceção do Crômio, fator este que também pode estar associado com a citotoxicidade observada pelo ensaio de MTT para estas amostras (Figura 12). De acordo com Thompson e He (2006), a glicerina residual também pode conter uma variedade de outros elementos, tais como Ca, Mg, P e S, independentemente da fonte de matéria-prima processada.

De acordo com os padrões dos Estados Unidos e da Europa, os limites de metais em embalagens de plástico são 100 mg.g^{-1} (EUA) e 1400 mg.g^{-1} (Europa), respectivamente, para Zinco (Zn) e 22.500 mg.g^{-1} (EUA) e $750 \text{ }\mu\text{g.g}^{-1}$ (Europa), respectivamente, para o Cobre (Cu). Em média, as concentrações de Zn e Cu encontradas no estudo de Ribeiro e colaboradores (2015), avaliando PHAs e glicerina, foram 99,08% e 99,89% abaixo dos limites internacionais. Entretanto, devido à alta sensibilidade dos ensaios *in vitro*, esta concentração detectada pode interferir no metabolismo celular.

4 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos na implementação e execução dos ensaios de citotoxicidade por biorreatividade e MTT, pode-se inferir que os mesmos foram satisfatórios do ponto de vista técnico. A adaptação das metodologias comumente utilizadas na avaliação da citotoxicidade de materiais poliméricos de uso médico-hospitalar mostrou-se bastante promissora quando empregada no ensaio de embalagens destinadas ao uso alimentício e componentes empregados na sua fabricação, tornando-a potencialmente aplicável na avaliação da citotoxicidade basal destes materiais, contribuindo assim com os estudos de segurança alimentar.

Quanto à extrapolação destes resultados para o organismo humano, pode-se traçar um paralelo com as orientações de interpretação dos bioensaios de reatividade empregados no estudo da citotoxicidade e biocompatibilidade de plásticos e outros polímeros utilizados em materiais de uso médico-hospitalar e farmacêutico. Os

bioensaios para avaliação de citotoxicidade possuem um longo histórico no *screening* da biocompatibilidade e, mesmo apresentando muitas vantagens como fácil manuseio, baixo custo relativo, sensibilidade, possibilidade de testes *ex-vivo*, capacidade de gerar dados qualitativos e quantitativos de forma rápida, além de permitirem a observação direta do efeito sobre as células, estes ensaios devem ser considerados como técnicas preliminares na predição da biorreatividade.

Portanto, sabe-se que, desde sua implementação na década de 50, para a avaliação de plásticos de embalagens farmacêuticas, a interpretação dos dados gerados deve ser realizada em conjunto com outros testes apropriados devido à sensibilidade dos ensaios de biorreatividade, as amostras consideradas citotóxicas devem ser avaliadas conjuntamente com os dados obtidos de estudos *in vivo* para que se possa correlacionar os resultados obtidos e o risco real que os mesmos representam à saúde humana. Os resultados obtidos devem ser confirmados com uma análise complementar.

REFERÊNCIAS

AMARAL, P.F.F.; FERREIRA, T.F.; FONTES, G.C.; COELHO, M.A.Z. Glycerol valorization: New biotechnological routes. **Food and Bioproducts Processing**, v. 87, p. 179-186, 2009.

ARVANITOYANNIS, I.; BOSNEA, L. - Migration of Substances from Food Packaging Materials to Foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, p. 63-76, 2004.

ASSIS, D. J. Influência da natureza do rejeito agroindustrial fermentado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* nas propriedades das gomas xantana resultantes. **Polímeros**, v. 24, n. 2, 2014a.

ASSIS, D.J.; BRANDÃO, L.V.; COSTA, L.A.S.; FIGUEIREDO, T.V.B.; SOUSA, L.S.; PADILHA, F.F.; DRUZIAN, J.I. A study of the effects of aeration and agitation on the properties and production of xanthan gum from crude glycerin derived from biodiesel using the response surface methodology. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.172, p.2769–2785, 2014.

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: 03 de Março 2014.

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 : 03 de Março 2014.

AVELLA, M.; DE VLIENER, J.; ERRICO, M.E.; FISCHER, S.; VACCA, P.; VOLPE, M. Biodegradable starch/clay nanocomposite films for food packaging applications. **Food Chemistry**, v. 93, p. 467–47, 2005.

BARILE, F.A. Introduction to in Vitro Cytotoxicity, Mechanisms and Methods, CBC Press, Boca Raton, FL, 1994.

BORM, P.J.; ROBBINS, D.; ROBBINS, S.; HAUBOLD, T.; KUHNBUSCH, H.; FISSAN, K.; DONALDSON, R.; SCHINS, V.; STONE, W.; KREYLING, J.; LADEMANN, J.; KRUTMANN, D.; WARHEIT, E.; OBERDORSTER. The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 14, p. 3–11, 2006.

BOUWMEESTER, H.; DEKKERS, S.; NOORDAM, M.Y.; HAGENS, W.I.; BULDER, A.S.; DE HEER, C. Review of health safety aspects of nanotechnologies in food production. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 53, p. 52–62, 2009.

BRANDÃO, L. V.; ASSIS, D. J.; LÓPEZ, J. A.; ESPIRIDIÃO, M. C. A.; ECHEVARRIA, E. M.; DRUZIAN, J. I. Bioconversion from crude glycerin by *Xanthomonas campestris* 2103: xanthan production and characterization. **Brazilian**

Journal of Chemical Engineering, v. 30, n.4, 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-66322013000400006>.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**, v. 2 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, p. 546, 2010.

CATALÁ, R.; GAVARA, R. Fundamentos y mecanismos de los fenómenos de migración. In: Migración de componentes y residuos de envases em contacto com alimentos. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, CSIC: Valencia, p. 346, 2002.

CAVALHEIRO, J.M.B.T.; RAPOSO, R.S.; DE ALMEIDA, M.C.M.D.; CESÁRIO, M.T.; SEVRIN, C.; GRANDFILS, C.; DA FONSECA, M.M.R. Effect of cultivation parameters on the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-4-hydroxybutyrate-3-hydroxyvalerate) by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 391–397, 2012.

ÇELIK, E.; OZBAY, N.; OKTAR, N.; ÇALIK, P. Use of biodiesel byproduct crude glycerol as the carbon source for Fermentation processes by recombinant *Pichia pastoris*. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v.47, p. 2985- 2990, 2008.

CHAUDHRY, Q.; SCOTTER, M.; BLACKBURN, J.; ROSS, B.; BOXALL, A.; CASTLE, L.; AITKEN, R.; WATKINS, R. Applications and implications of nanotechnologies for the food sector. **Food Additives & Contaminants**, v. 25, p. 241–258, 2008.

COSTA, L. A. S.; ASSIS, D. D. J.; GOMES, G. V. P.; DA SILVA, J. B. A.; FONSÊCA, A. F.; DRUZIAN, J. I. Extraction and Characterization of Nanocellulose from Corn Stover. **Materials Today: Proceedings**, v. 2, p. 287–294, 2015.

COSTA, S. S.; DRUZIAN, J. I.; MACHADO, B. A. S.; SOUZA, C. O.; GUIMARÃES, A. G. Bi-Functional Biobased Packing of the Cassava Starch, Glycerol, Licuri Nanocellulose and Red Propolis. **PLOS ONE**. www.plosone.org, v. 9, 2014.

DA SILVA, J. B. A.; PEREIRA, F. V.; DRUZIAN, J. I. Cassava Starch-Based Films Plasticized with Sucrose and Inverted Sugarand Reinforced with Cellulose Nanocrystals. **Journal of Food Science**, v. 77, p. 6, 2012.

DONG, S.; HIRANI, A. A.; COLACINO, K. R.; LEE, Y. W.; ROMAN, M. Cytotoxicity and Celular Uptake of Cellulose Nanocrystals. **Nano Life**, v. 2, 2012. DOI: 10.1142/S1793984412410061

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.

FISCHER, H.; CHAN, W. Nanotoxicity: the growing need for in vivo study. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 6, p. 565–571, 2007.

FRANCHETTI, S. M. M.; MARCONATO, J. C. Polímeros biodegradáveis – uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 811-816, 2006.

FRESHNEY, R.I. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications**, 6th ed., Wiley-Blackwell, New York, 2010.

GAD, S.C. **In Vitro Toxicology**. 2 ed., Taylor and Francis, Philadelphia, 2000.

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.

GORNI, A. A. **Introdução aos plásticos**. 2003. Disponível em <<http://www.gorni.eng.br/intropol.html>> acesso em: 03/03/2016.

HAZELL, S.L.; GRAHAM, D.Y. Unsaturated fatty acids and viability of *Helicobacter (Campylobacter) pylori*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, p.1060–1061, 1990.

HELBERT, W.; CAVAILLE, J. Y.; DUFRESNE, A. Thermoplastic nanocomposites filled with wheat straw cellulose whiskers. Part 1: Processing and mechanical behavior. **Polymer Composites**, v. 17, p. 604-611, 1996.

HUNT, G.; MEHTA, M.D. (Eds.), **Nanotechnology: risk, ethics and law**. London: Earthscan, p. 296, 2006.

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

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

JOHNSON, D.T.; TACONI, K.A. The glycerin glut: options for the value-added conversion of crude glycerol resulting from biodiesel production. **Environmental Progress**, v. 26, p. 338–348, 2007.

JORFI, M.; FOSTER, E.J. Recent advances in nanocellulose for biomedical applications. **Journal of Applied Polymer Science**. v.132, p.1-19, 2015. DOI: 10.1002/APP.41719

JULIANO, C. I; GALLERI, G.; KLEMETSrud, T.; KARLSEN, J.; GIUNCHEDI, P. Effect of chitosan malate on viability and cytoskeletal structures morphology of Caco-2 cells. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 42, p. 223-30, 2011.

KNAPP, H.R.; MELLY, H.A. Bactericidal effects of polyunsaturated fatty acids. **Journal of Infect Disease**, v. 154, p.84–94, 1986.

KONKOL, L., M.; CROSS, R., F.; HARDING, I. H.; 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 Additives & Contaminants**, v. 20, p. 972-98, 2003.

KUZNESOF, P. M. **Legislación sobre envases para alimentos en los Estados Unidos. In: Migración de componentes y residuos de envases em contacto com alimentos**. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, CSIC: Valencia, p. 65-84, 2002.

LEWINSKI, N.; COLVIN, V.; DREZEK, R. Cytotoxicity of nanoparticles. **Small**, v. 4, p. 26–49, 2008.

LUO, Y. C.; TENG, Z.; WANG, T. T. Y.; WANG, Q. Cellular Uptake and Transport of Zein Nanoparticles: Effects of Sodium Caseinate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 7621–7629, 2013.

MACHADO, B. A. S.; REIS, J. H.O.; DA SILVA, J. B.; CRUZ, L.S.; NUNES, I. L.; PEREIRA, F.V.; DRUZIAN, J. I. Obtenção de nanocelulose da fibra de coco verde e incorporação em filmes biodegradáveis de amido plastificados com glicerol. **Química nova**, v. 37, n. 8, p. 1275-1282, 2014. <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20140220>

MARTIROSYAN, A.; SCHNEIDER, Y.-J. Engineered Nanomaterials in Food: Implications for Food Safety and Consumer Health. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v.11, p.5720-5750, 2014.

MATEESCU, A.L.; DIMOV, T.V.; GRUMEZESCU, A.M.; GESTAL, M.C.; CHIFIRIUC, M.C. Nanostructured bioactive polymers used in food-packaging. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v.16, p.121-127, 2015.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity. **Journal of Immunological Methods**,v. 65, p. 55–63, 1983.

MROZ, R.M.; SCHINS, R.P.; LI, H.; JIMENEZ, L.A.; DROST, E.M.; HOLOWNIA, A.; MACNEE, W.; DONALDSON, K. Nanoparticle-driven DNA damage mimics irradiation-related carcinogenesis pathways. **European Respiratory Journal**, v. 31, p. 241–251, 2008.

NEL, A.; XIA, T.; MADLER, L.; LI, N. Toxic potential of materials at the nanolevel. **Science**, v. 311, p. 622–627, 2006.

PEREIRA, M.M.; RAPOSO, N.R.B.; BRAYNER, R.; TEIXEIRA, E.M.; OLIVEIRA, V.; QUINTAO, C.C.R.; CAMARGO, L.S.A.; MATTOSO, L.H.C.; BRANDAO, H.M. Cytotoxicity and expression of genes involved in the cellular stress response and apoptosis in mammalian fibroblast exposed to cotton cellulose nanofibers. **Nanotechnology**, v.24, 075103, 2013. <http://dx.doi.org/10.1088/0957-4484/24/7/075103>

PODSIADLO, S.Y.; CHOI, B.; SHIM, J.; LEE, M.; CUDDIHY, N.A.; KOTO, V. Molecularly engineered nanocomposites: layer-by-layer assembly of cellulose nanocrystals. **Biomacromolecules**, v. 6, p. 2914–2918, 2005.

POWERS, K.; BROWN, S.; KRISHNA, V.; WASDO, S.; MOUDGIL, B.; ROBERTS, S. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials. Part VI. Characterization of nanoscale particles for toxicological evaluation. **Toxicological Sciences**, v. 90, p. 296–303, 2006.

RASCHIP, I.E., HITRUC, E.G.; OPREA, A.M.; POPESCU, M.C.; VASILE, C. In vitro evaluation of the mixed xanthan/lignin hydrogels as vanillin carriers. **Journal of Molecular Structure**. v.1003, p.67–74, 2007.

REHMAN, A.; WIJESEKARA, R.G.; NOMURA, N.; SATO, S.; MATSUMURA, M. Pre-treatment and utilization of raw glycerol from sunflower oil biodiesel for growth and 1,3-propanediol production by *Clostridium butyricum*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 2008.

- 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.
- RIBEIRO, P. L. L.; DA SILVA, A. C. M. S.; FILHO, J. A. M.; DRUZIAN, J. I. Impact of different by-products from the biodiesel industry and bacterial strains on the production, composition, and properties of novel polyhydroxyalkanoates containing achiral building blocks. **Industrial Crops and Products**, v.69, p. 212–223, 2015.
- RIQUET, A.M.; BREYSSEC, C.; DAHBIE, L.; LORIOTD, C.; SEVERINE, I.; CHAGNON, M.C. The consequences of physical post-treatments (microwave and electron-beam) on food/packaging interactions: A physicochemical and toxicological approach. **Food Chemistry**, v. 199, p. 59–69, 2016.
- SCARFATO, P.; DI MAIO, L.; INCARNATO, L. Recent advances and migration issues in biodegradable polymers from renewable sources for food packaging. **Journal of Applied Polymer Science**, v.132, 2015. DOI: 10.1002/app.42597
- SCHMIDT, C.A., MURILLO, R., HEINZMANN, B., LAUFER, S., WRAY, V., MERFORT, I. Structural and Conformational Analysis of Proanthocyanidins from *Parapiptadenia rigida*, and Their Wound-Healing Properties. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 1427-1436, 2011.
- 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.
- SIMON, P.; CHAUDHRY, Q.; BAKOS, D. Migration of engineered nanoparticles from polymer packaging to food – a physicochemical view. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 47, p. 105–113, 2008.
- SPOLJARIC, M. L.; KOLLER, M.; MUHR, A.; SALERNO, A.; REITERER, A.; MALLI, K.; ANGERER, H.; STROHMEIER, K.; SCHOBER, S.; MITTELBACH, M.; HORVAT, P. Mathematical modeling of poly[(R)-3-hydroxyalkanoate] synthesis by *Cupriavidus necator* DSM 545 on substrates stemming from biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 133, p. 482–494, 2013.
- THOMPSON, J. C.; HE, B. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. **Applied Engineering in Agriculture**, v. 22, p. 261-265, 2006.
- USP - **THE UNITED STATES PHARMACOPEIA**, Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 38 ed., 2015.
- VALE, M.S.; ABREU, K.V.; GOUVEIA, S.T.; LEITÃO, R.C.; SANTAELLA, S.T. Toxicity effect of Cr(VI) and Zn(II) on growth of filamentous fungi *Aspergillus niger* isolated from industrial effluent. **Engenharia Sanitarista e Ambiental**, v. 16, p. 237–244, 2011.
- WIESNER, M.R.; BOTTERO, J.Y. **Environmental nanotechnology**. Applications and impacts of nanomaterials. McGraw-Hill Professional, New York, 2007.
- WILSNACK, R.E. Quantitative cell culture biocompatibility testing of medical devices and correlation to animal tests. **Biomaterials, Medical Devices, and Artificial Organs**, v.4, p.235-261,1976.