



ENSAIOS TOXICOLÓGICOS: UM ESTUDO SOBRE A UTILIZAÇÃO DE TESTES *IN VIVO* E *IN VITRO*

Naiara Sarmenghi Moura¹, Anna Carolina Motta Vasconcelos², Bruna Magnago Bernabé³,
Luciano José Quintão Teixeira⁴, Sergio Henrique Saraiva⁵

1. Graduada em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Espírito Santo, Aracruz, Espírito Santo, Brasil (naiarasarmenghi@yahoo.com.br).
2. Graduada em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Espírito Santo, Cachoeiro de Itapemirim, Espírito Santo, Brasil (annacarolina.mottavasconcelos@gmail.com).
3. Mestranda em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, Espírito Santo, Brasil (brunabernabe@gmail.com).
4. Professor Doutor da Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, Espírito Santo, Brasil (luqteixeira@yahoo.com.br).
5. Professor Doutor da Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, Espírito Santo, Brasil (shsaraiva@yahoo.com.br).

Recebido em: 06/10/2012 – Aprovado em: 15/11/2012 – Publicado em: 30/11/2012

RESUMO

Toxicologia é a ciência que estuda os efeitos adversos das substâncias químicas sobre os organismos vivos e sistemas biológicos avaliando a probabilidade que este agente químico tem de provocar algum dano. A toxicologia de alimentos constitui uma subárea da toxicologia que possui enorme relevância para a saúde humana, tendo como objetivo analisar e definir quais alimentos tem ou não potencial de apresentar toxicidade nas condições normais de consumo. Atualmente é crescente o uso de aditivos para prolongar a vida de prateleira de produtos e, portanto há grande demanda por formas confiáveis de avaliar a toxicidades destas novas substâncias. O teste *in vivo* utiliza animais para avaliar a toxicidade de determinadas substâncias. Estes experimentos requerem um grande número de cobaias, causam muito sofrimento e a morte dos animais testados, e, por isso estão sendo muito criticado. Para tentar solucionar este problema foi criado o programa 3R's, para redução (Reduction), refinamento (Refinement) e substituição (Replacement) dos animais, sendo um teste alternativo com o objetivo de substituir o teste *in vivo*. Os testes *in vitro* podem ser utilizados para detectar a toxicidade de substâncias que serão utilizadas em seres humanos e utiliza organismos como, bactérias, fungos, algas. Sendo assim, o presente trabalho tem como objetivo explicar como são realizados os testes *in vivo* e *in vitro*, a importância da implantação do programa 3R's para avaliar a toxicidade das substâncias presentes ou adicionadas aos alimentos.

PALAVRAS-CHAVES: Toxicologia, aditivos alimentares, teste *in vitro*, teste *in vivo*, IDA, NOAEL, LD₅₀.

TOXICOLOGICAL STUDIES FROM TESTS *IN VIVO* AND *IN VITRO*

ABSTRACT

Toxicology is the science that studies the adverse effects of chemicals on living organisms and biological systems by assessing the probability that this chemical agent must cause some harm. Food toxicology is a subfield of toxicology that has enormous relevance to human health, and to analyze and define which foods have or not the potential toxicity in normal consumption. Currently there is a growing use of additives to extend the shelf life of the products and therefore there is great demand for reliable ways to evaluate the toxicities of these new substances. *In vivo* testing using animals to assess the toxicity of substances. These experiments require large numbers of experimental animals, causing much pain and death of the animals tested, and therefore being heavily criticized. Trying to solve this problem was created the 3R's program for reduction, refinement and replacement of animals, being an alternative test to replace the *in vivo* test. *In vitro* can be used to detect the toxicity of substances to be used in humans and utilizes organisms as bacteria, fungi, algae and shellfish in the tests. Thus, this paper aims to explain how the tests are performed *in vivo* and *in vitro*, the importance of implementing the program 3R's to evaluate the toxicity of the present or added substances food.

KEYWORDS: Toxicology, additives, *in vitro* tests, *in vivo* tests, ADI, NOAEL, DL₅₀.

INTRODUÇÃO

Toxicologia é a ciência que estuda os efeitos adversos causados pela interação entre as substâncias químicas e os organismos vivos ou sistemas biológicos. Ela avalia a probabilidade da ocorrência de efeitos adversos devido a exposição a determinada substância e em quais condições ela pode causar danos. Assim, sempre que for lançado um novo produto que terá contato direto com o homem tais como medicamento, agrotóxico, aditivos alimentares etc., devem ser realizados estudos para predizer os riscos toxicológicos dessa nova substância (CAZARIN, *et al.*, 2004; AZEVEDO, 2010).

Desde a antiguidade animais têm sido utilizados como modelos vivos para avaliar o risco toxicológico de diversas substâncias e medicamentos. Eles também foram empregados em testes com o gás mostarda utilizado em guerra. Estes experimentos são conhecidos como estudos toxicológicos *in vivo* e causa morte e sofrimento de um grande número de animais (CRUZ, 2003).

A primeira manifestação social a cerca de uma nova visão sobre as pesquisas que utilizam e provocam dor em animais vertebrados denominou-se *Cruelty to Animals Act* e foi redigida em 1876 (PETROIANU, 1996). Anos após essa manifestação, alguns autores afirmaram que as boas pesquisas devem respeitar o programa 3R's. Este programa é assim denominado devido às três palavras em inglês que regem o programa - *Reduction, Refine, Replace* – que em português significa - Reduzir, Refinar e Substituir. Este programa tem como principal objetivo reduzir o número de animais empregados em pesquisas, buscar o refinamento de técnicas que permitam diminuir o sofrimento dos animais e substituir animais por outras formas de vidas, como os estudos *in vitro* (PETROIANU, 1996; CRUZ & ANGELIS, 2010).

Além do estudo *in vivo*, existe também o estudo *in vitro*, que vem sendo utilizado com mais frequência, devido ao grande rigor nos laboratórios com o uso de animais. São estudos que permitem prever a toxicidade de uma substância em seres humanos com a utilização de micro-organismos como bactérias, fungos; enzimas; proteínas; culturas celulares, entre outras (ROGERO, *et al.*, 2003; BEDNARCZUK, *et al.*, 2010).

Esses ensaios permitem limitar o número das variáveis experimentais, sua execução é mais simples e mais rápida que a do teste *in vivo* e podem substituir os animais ou, ao menos, servirem como um estudo precedente ao teste *in vivo*, (ROGERO, *et al.*, 2000; ROGERO, *et al.*, 2003).

A toxicologia de alimentos constitui uma subárea da toxicologia que tem uma enorme importância para a saúde humana. Ela tem como objetivo analisar e definir quais alimentos possuem ou não potencial de causar danos a saúde humana. A toxicidade de um alimento ocorre devido à presença de um ou mais compostos presentes no mesmo, que podem causar danos à saúde dos seres vivos, estando diretamente relacionada com diversas condições, tais como: exposição da substância, sua natureza, concentração no alimento, frequência de ingestão, tempo com que o alimento vem sendo ingerido, via de introdução no organismo e susceptibilidade individual (MIDIO & MARTINS, 2000).

O presente trabalho tem como objetivo explicar como são realizados os testes *in vivo* e *in vitro*, a importância da implantação do programa 3R's nesses testes, para avaliar a toxicidade das substâncias, ressaltando a importância desses ensaios nos dias atuais onde deve-se assegurar a segurança da ingestão das novas substâncias que são desenvolvidas todos os anos.

ENSAIOS TOXICOLÓGICOS

Os ensaios toxicológicos são feitos para determinar os níveis de ingestão das substâncias que não causem dano ao ser humano. Para isso, a determinação desse nível deve ser feita analisando diversos níveis e parâmetros.

A determinação de um nível de ingestão diária de um composto químico, com base no peso corporal do ser humano, como aditivos alimentares, resíduos de pesticidas e contaminantes de alimentos, que podem ser consumidos com segurança, não causando risco aos seres humanos, é expressa em base de peso corpóreo e denominada de IDA (Ingestão Diária Aceitável), determinada pelos testes toxicológicos (ANVISA, 2006). Contudo, antes da determinação da IDA, é necessário que seja estabelecido o nível de ingestão abaixo do qual o efeito toxicológico não é observado, conhecido como NOAEL (WATANABE & NUTTI, 2002).

A partir do NOAEL (do inglês: *no observed adverse effect level*) se determina o nível de IDA, por meio da divisão do nível de NOAEL por um fator de segurança, que depende da substância, mas geralmente é utilizado o valor 100, porém esse fator pode ser maior ou menor dependendo da substância em estudo, conforme pode ser visto na Equação 1 (JARDIM & CALDAS, 2009). Esse fator de segurança é devido a diversos fatores que influenciam na toxicidade de uma substância e o dano que a mesma pode causar ao ser humano. Primeiramente os fatores do sistema biológico tais como idade, peso corpóreo, temperatura, estado nutricional e patológico, fatores genéticos. Depois são consideradas as características da substância, como a forma e o tamanho das partículas, concentração ingerida, a afinidade, solubilidade e sensibilidade da substância no tecido ou organismo humano, entre outros (OLIVEIRA, 2008).

$$IDA = \frac{NOAEL}{\text{Fator de segurança}} \quad (01)$$

Para a determinação do NOAEL são necessários uma série de testes toxicológicos, tais como o estudo de toxicidade aguda, subcrônica e crônica, genotoxicidade, carcinogenicidade, imunotoxicidade, reprodução entre outros (WATANABE & NUTTI, 2002).

A toxicidade aguda ocorre devido a um único contato (dose única) ou múltiplos contatos com o agente tóxico, num intervalo de tempo de aproximadamente 24 horas, normalmente avaliam a mortalidade ou a imobilidade dos organismos, influência em reações bioquímicas, metabolismo, entre outros. Os efeitos aparecem de imediato ou no decorrer de alguns dias, no máximo duas semanas (PIMENTEL, *et al.*, 2006; AMARAL & SILVA, 2007).

A partir do teste de toxicidade aguda é possível determinar um parâmetro muito importante conhecido como dose letal (LD₅₀). A LD₅₀ é definida como a quantidade de substância química, que quando ingerida em uma só dose oral, expressa em mg de substância química por massa do organismo em kg, causa a morte de 50% dos animais expostos a substância, dentro de um período de 14 dias (COSTA, *et al.*, 2008). Contudo, em meados da década de 70, este teste começou a ser usado como teste de comparação e classificação da toxicidade, e com o tempo tornou-se um teste de pré-requisito para várias agências reguladoras (como a FDA) responsáveis por aprovar novos aditivos alimentares, ingredientes cosméticos, químicos industriais, novos fármacos e pesticidas (VALADARES, 2006).

Ao contrário dos testes de toxicidade aguda, os testes de toxicidade crônica e sub-crônica decorre do efeito tóxico após exposição prolongada a doses acumulativas de agente tóxico, num período prolongado, geralmente, maior que três meses a alguns anos, procedentes de fontes alimentares ou ambientais, avaliam parâmetros subletais como reprodução, crescimento e deformidades, caracterizando o efeito de dose-resposta (ROMANELLI, 2004).

ADITIVOS ALIMENTARES E SUAS TOXICIDADES

O comportamento alimentar da população vem sendo modificado nas últimas décadas, devido ao acelerado ritmo da vida urbana e da entrada da mulher no mercado de trabalho, que diminui seu tempo dedicado ao cuidado com a alimentação da família e, paralelamente a isto as indústrias de alimentos começaram a lançar no mercado opções de produtos prontos e rápidos de serem preparados. Contudo, a necessidade de se utilizar aditivos alimentares nos produtos aumenta cada vez mais (MÖRSCHBÄCHER & SOUZA, 2011). E cada nova substância precisa passar por testes rigorosos de toxicidade.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) e Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) definem aditivo alimentar como sendo a substância intencionalmente adicionada ao alimento com a finalidade de conservar, intensificar ou modificar suas propriedades, desde que não prejudique seu valor nutritivo (OMS, 1995).

Os aditivos alimentares podem ser classificados como Geralmente Reconhecidos como Seguros – GRAS (Generally Recognized as Safe) e os Geralmente Não Reconhecidos como Seguros – Não-GRAS. Para o caso dos aditivos GRAS, não há necessidade de aplicação de rigor quanto à limitação de dosagens, visto a baixa possibilidade de causar intoxicações. São encontradas

nesta categoria substâncias tais como: sal, açúcar, condimentos e os aditivos adicionais (FDA, 2012).

Já os aditivos Não-GRAS necessitam de uma estipulação de índices de aplicação, como: Limite Máximo Permitido, nível de Ingestão Diária Admissível e nível de Ingestão Semanal Admissível. Se os níveis permitidos forem ultrapassados, o referido aditivo passa a ser definido como contaminante direto do alimento (BURDOCK, *et al.*, 2006). Portanto, um aditivo alimentar será contaminante direto de um alimento sempre e quando não tiver seu uso permitido naquele alimento ou quando estiver numa concentração maior que a permitida.

No Quadro 1 podem ser observados os principais aditivos alimentares utilizados na indústria de alimentos, assim como suas funções e toxicidade, podendo notar que a os aditivos possuem baixa toxicidade, podem causar reações tóxicas no metabolismo, alergias, alterações no comportamento e a longo prazo podem se tornar carcinogênica.

QUADRO 1 - Principais aditivos alimentares, suas funções e toxicidade

Tipo	Função	Toxicidade
Antiespumante	Previne ou reduz a formação de espumas.	Composto com nula ou baixíssima toxicidade.
Antiumectante	São capazes de reduzir características higroscópicas de alimentos e diminuir a tendência das partículas individuais a aderir umas às outras.	Pouco tóxico. Pode ocorrer desidratação da pele, membranas mucosas e olhos, podendo causar irritação local. Irritante para o sistema respiratório.
Antioxidante	Retarda o aparecimento de alteração oxidativa do alimento.	Altas doses de antioxidantes podem conduzir a problemas de saúde, incluindo a diarreia, sangramento e o risco de reações tóxicas.
Corante	Confere, intensifica ou restaura a cor do alimento.	Os corantes podem causar desde simples urticárias, passando por asma e reações imunológicas, chegando até ao câncer em animais de laboratórios.
Conservante	Impede ou retarda a alteração dos alimentos provocada por microrganismos e enzimas.	Os conservantes podem desencadear sintomas de asma, caracterizada por dificuldades respiratórias, falta de ar, sibilos, tosse em indivíduos susceptíveis.
Edulcorante	É diferente dos açúcares que dão sabor doce aos alimentos.	A toxicidade a curto prazo tem sido estudada sem, porém, mostrar efeitos significativos.

Espessante	Aumenta a viscosidade dos alimentos.	Em geral, os espessantes não apresentam toxicidade ao serem ingeridos nos alimentos. No entanto, alguns podem causar efeitos adversos à pessoas específicas. Podendo causar asma, dermatite, distensão gastrointestinal, náuseas, flatulência, câimbras abdominais, diarreia, colite ulcerativa e pode ser carcinogênica em ratos.
Gelificante	Dá textura através da formação de gel.	Não possui atividade tóxica, não inibe o crescimento, não causa a incidência de tumores, não afeta os índices hematológicos, não causa nenhum efeito maléfico nos órgãos.
Estabilizante	Manutenção de dispersão uniforme de duas ou mais substâncias imiscíveis em um alimento.	De uma maneira geral, não apresentam toxicidade ao serem ingeridos nos alimentos.
Aromatizante/flavorizante	Substâncias ou misturas com propriedades aromáticas, sápidas ou ambas, capazes de dar ou reforçar o aroma, o sabor ou ambos dos alimentos.	Não há perigo de toxicidade nos aromatizantes naturais. Já nos artificiais, quando as doses são mais altas do que o permitido, podem provocar ações irritantes e câncer.
Umectante	Protege os alimentos da perda de umidade em ambiente de baixa umidade relativa ou que facilitam a dissolução de um pó em meio aquoso.	Baixa toxicidade.
Regulador da acidez	Altera ou controla a acidez ou alcalinidade dos alimentos.	Baixa toxicidade.

Emulsificante	Tornam possível a formação ou manutenção de uma mistura uniforme de duas ou mais fases imiscíveis no alimento.	Baixa toxicidade.
Melhoradores da farinha	São substâncias que ser adicionadas a farinha, melhoram sua qualidade tecnológica.	Baixa toxicidade.
Ressaltante de sabor	Ressalta e realça o sabor e/ou aroma de um alimento.	Baixa toxicidade.
Fermentos químicos	São substâncias ou misturas de substâncias que liberam gás e desta maneira, aumentam o volume de massa.	Baixo potencial de toxicidade.
Agente de firmeza	Tornam ou mantêm os tecidos de frutas ou hortaliças firmes e crocantes, ou interagem com agentes gelificantes para produzir ou fortalecer um gel.	Baixa toxicidade.
Sequestrante	Complexos químicos com os íons metálicos.	Baixa toxicidade e irritabilidade.
Espumantes	Possibilitam a formação ou manutenção da dispersão uniforme de uma fase gasosa em um alimento líquido ou sólido.	Baixa ou nenhuma toxicidade.

Fonte: ANVISA, 1997; POLÔNIO & PERES, 2009; AUN, *et al.*, 2011; FAO, 2012.

Com isso, pode-se observar que o consumo de produtos alimentícios, com níveis inadequados de aditivos alimentares, causam sérias implicações à saúde dos seres vivos, principalmente para gestantes, crianças e idosos que são mais sensíveis. Por isso, para que haja a autorização da utilização de algum aditivo alimentar é necessário a realização de diversas análises toxicológicas, verificando seus efeitos no organismo. Após diversos testes, a regulamentação da atividade do aditivo alimentar no Brasil é feita pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, sendo que nos Estados Unidos é feita pela FDA (Food and Drug Administration). Com o intuito de padronizar e disponibilizar um maior número de informações, na década de 60 foi criado o JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives), que tem o objetivo de analisar o potencial tóxico, mutagênico e carcinogênico dos aditivos alimentares. Sendo assim, a utilização de aditivos nos alimentos só deve ser permitida quando for necessário e vantajoso para o processo (ANTUNES & ARAUJO, 2000; TONETTO, *et al.*, 2008).

TESTE *IN VIVO*

Os modelos de estudos toxicológicos *in vivo* abordam ensaios de toxicidade aguda, subcrônica e crônica, onde estes devem tratar da mutagenicidade, embriofetotoxicidade, alterações de fertilidade, carcinogenicidade, e indução de dependência (VALADARES, 2006).

O teste de toxicidade aguda deve ser feito em pelo menos três espécies de animais diferentes, sendo uma não roedora. Este teste permite avaliar o início, a natureza e a duração da intoxicação, incluindo exames clínicos e patológicos nos animais. São utilizados grupos de animais com diferentes doses chegando a 2000 mg/Kg de peso corpóreo da substância testada. Posteriormente, é verificado se houve morte (ANVISA, 1996).

Um exemplo do teste de toxicidade aguda apresentado pela FDA (2003a), são os estudos de toxicidade em curto prazo com roedores: são, geralmente, realizados entre 14 a 28 dias e seus resultados podem ajudar a prever doses adequadas da substância para os ensaios sub-crônicos futuros ou estudos de toxicidade crônica. Podem ser usados para determinar o valor de NOAEL e para outros parâmetros toxicológicos, e permitir que futuros estudos em roedores sejam projetados com ênfase especial em órgãos-alvo identificados.

Nos testes de toxicidade sub-crônica, ou de curta duração, o experimento dura, geralmente, entre 21 e 90 dias. Permite identificar se o efeito é acumulativo ou não e auxilia a detectar os órgãos afetados após serem submetidos a doses múltiplas. Utiliza no mínimo duas espécies diferentes de animais, sendo uma não roedora, e pelo menos três doses distintas. Os animais devem ser observados ao menos uma vez ao dia quanto ao consumo de ração, peso, mudança de cor, textura do pelo, alteração motora e alteração de comportamento. São realizados exames de sangue, urina e fezes no início, meio e no final do experimento. O período de exposição pode chegar a três meses. A dose utilizada não deve ultrapassar 2 g/Kg de peso corpóreo da substância testada. Após o experimento, os animais sobreviventes devem ser sacrificados e devem ser feitos exames de sangue e patológico (ANVISA, 1996).

Dois exemplos de estudos de toxicidade sub-crônica com roedores e não roedores são apresentados abaixo:

- Os estudos de toxicidade sub-crônica com roedores: são, geralmente, realizados durante 90 dias (três meses), podendo se estender até 12 meses. Os resultados destes estudos podem ser usados para determinar o NOAEL para alguns parâmetros toxicológicos, e permitir que futuros estudos de toxicidade a longo prazo em roedores e não roedores sejam projetados com ênfase especial em órgãos-alvo identificado. Não é possível determinar o potencial carcinogênico de uma substância de teste nos estudos de toxicidade sub-crônica normalmente (FDA, 2003b).
- Os estudos de toxicidade sub-crônica com não roedores (geralmente cães): são, geralmente, realizadas por 90 dias (três meses), mas eles podem ser realizadas em até 12 meses. Os resultados destes estudos podem ajudar a prever as doses adequadas da substância de ensaio para futuros estudos de toxicidade crônica. Podem ser usados para determinar o NOAEL para alguns parâmetros toxicológicos, e permitir que futuros estudos de toxicidade a longo prazo em roedores e não roedores sejam projetados com ênfase especial em órgãos-alvo identificados. Os estudos de toxicidade sub-crônica, geralmente, não podem determinar o potencial carcinogênico de uma substância (FDA,

2003c).

Nos testes de toxicidade crônica o objetivo é estudar a exposição repetida e prolongada de uma substância. Ele permite avaliar o potencial carcinogênico. O estudo dura mais de três meses, variando de seis meses a dois anos para roedores e um ano para não roedor. Normalmente é feito com ratos e camundongos, utilizando 50 animais em cada grupo a fim de chegar com pelo menos 30 animais vivo no final do experimento. Deve-se examinar os animais duas vezes ao dia, pela manhã e a tarde (ANVISA, 1996).

Um exemplo de estudo de toxicidade crônica de acordo com FDA (2003d) é o estudo de toxicidade de um ano com não-roedores (geralmente cães): deve ser realizada por um período mínimo de 12 meses (um ano). Os resultados desses testes podem ser usados para caracterizar a toxicidade da substância em animais não roedores e determinar a dose da substância que não produz efeitos adversos observados (NOAEL) para alguns parâmetros toxicológicos. Os testes de toxicidade de um ano não são conduzidos com o objetivo de avaliar a carcinogenicidade, embora os dados destes testes possam revelar informações sobre a carcinogenicidade da substância de ensaio.

Em geral, a pesquisa toxicológica tenta manter constante todas as variáveis, como seleção do animal, idade, sexo, dieta do animal durante o experimento, exceto a exposição de produtos químicos a serem testados. Assim, qualquer alteração no grupo experimental é assumida como sendo perturbação causada pela exposição ao produto. Portanto, a maioria dos estudos toxicológicos geralmente utiliza uma variedade de doses de uma substância química para determinar os limites tóxicos do componente. Um componente importante da investigação toxicológica é dose-resposta. Experiências com animais são conduzidas para determinar as relações dose-resposta de um composto para medir a extensão de qualquer efeito observado em várias doses e diligência em busca de uma dose que não tem efeito mensurável fisiológica. Esta informação é útil na compreensão dos mecanismos de toxicidade e os dados permitem extrapolar os efeitos nos animais para humanos (GOLDSTEIN & HENIFIN, 2000).

Na Tabela 1 está apresentada uma pesquisa feita pela Research Defence Society (RDS) no ano de 2002 para o número de animais utilizados em procedimentos científicos na Grã-Bretanha. Assim eles descobriram que foram usados 2,5 milhões de animais, sendo os roedores as espécies de maior relevância. (CAZARIN, *et al.*, 2004).

TABELA 1 – Porcentagem de animais utilizados na Grã-Bretanha, em procedimentos científicos, no ano de 2002

Espécies	%
Ratos e camundongos	84
Peixes, anfíbio, répteis e pássaros	12
Ovelhas, vacas, porcos e outros animais de grande porte	2,3
Pequenos mamíferos e outros roedores (coelho e furão)	1,5
Cães e gatos (espécies de laboratório)	0,3
Macacos	0,15

Fonte: CAZARIN, *et al.*, 2004.

Os testes de toxicidade *in vivo* estão sendo muito criticados em função do grande número de animais requerido e do sofrimento causado aos mesmos durante alguns tipos de experimento. Diante deste cenário, indústrias e órgãos governamentais de regulamentação e controle da qualidade estão sob crescente pressão para substituir ensaios *in vivo* por métodos alternativos que não utilizem animais. Desse modo, a preocupação com o uso de animais nos experimentos para teste de toxicidade é um assunto largamente discutido. Para isso, várias leis e projetos foram elaborados para que o número de animais nos testes fosse reduzido e para que esses animais possuam uma boa qualidade de vida antes e durante os testes. Atualmente, no Brasil, existem os comitês de ética responsáveis pela avaliação e aprovação de projetos de pesquisa com animais, que são responsáveis por controlar o uso de animais em experimentos (BEDNARCZUK, *et al.*, 2010).

PROGRAMA 3R's

O programa 3R's é denominado dessa forma devido as iniciais, em inglês, das principais finalidades, que são redução (Reduction), refinamento (Refinement) e substituição (Replacement), que consiste na redução do número de animais utilizados nas pesquisas; reduzir, ao mínimo possível, o sofrimento dos animais e a busca de métodos alternativos para substituir os testes *in vivo*. O Quadro 2 aponta as principais ações e metas propostas para consolidar os objetivos do programa 3R's, além de contribuir para a aceitação e evolução deste programa (CAZARIN, *et al.*, 2004).

QUADRO 2 – Ações e metas fundamentais para o cumprimento dos objetivos do programa 3R's

REDUÇÃO	REFINAMENTO	SUBSTITUIÇÃO
<ul style="list-style-type: none"> -Desenvolver novos protocolos com a utilização de menor número de animais por experimento. -Evitar a replicação dos estudos conduzidos <i>in vivo</i>. -Priorizar estudos com relevância e que possam ser extrapolados para espécie humana. -Desenvolver novas metodologias e modelos de triagem. -Aperfeiçoar a qualidade técnica dos ensaios. -Diminuir o número de animais em testes retirando do ensaio o maior número de informações possíveis. 	<ul style="list-style-type: none"> -Valorizar os avanços científicos empregando as novas metodologias. -Preocupar-se com o bem estar dos animais, reduzindo o sofrimento dos mesmos. 	<ul style="list-style-type: none"> -Desenvolver novas metodologias que possam substituir os ensaios <i>in vivos</i>. -Métodos <i>in vitro</i> e alternativos, assim como aqueles que se utilizam de células humanas devem ser priorizados.

Fonte: CAZARIN, *et al.*, 2004.

A substituição de animais no Brasil é questão legal. A lei federal 9.605/98 que prevê penalidades (três meses a um ano de prisão, além de multa) para o uso de animais em experimentos que envolvam dor, sempre que houver métodos

alternativos. Além disso, a objeção de consciência, assegurada pela Constituição, pode ser utilizada para garantir os direitos individuais dos alunos que se negam a assistir ou participar de aulas que utilizam animais (BRASIL, 1998).

TESTE *IN VITRO*

Os testes *in vitro* são essenciais para detectar a toxicidade de substâncias que serão utilizadas em seres humanos, pois é fundamental que se conheça o efeito da substância antes da aplicação nos humanos. Os testes *in vitro* são métodos alternativos que vem sendo utilizados com mais frequência, já que diminuem o uso de animais em laboratórios (LIMA, 2006).

Os testes *in vitro* podem ser realizados com bactérias, fungos, algas e crustáceos, além de frações subcelulares presentes no sistema biológico como suspensões celulares, cultivo de tecidos, cultivos celulares, enzimas e proteínas. Contudo, os estudos com cultura de células vêm se destacando dentre os demais (FRAZIER, 1992).

Os estudos com culturas de células ou citotoxicidade são realizados com células de vários tecidos, tanto de origem humana quanto animal, desde que a proliferação celular ocorra e que seja possível sua análise. É um teste rápido, reprodutível e sensível, além disso, existem diversas vantagens em utilizar cultura celular, como o controle de pH, tensão de CO₂ e O₂, de temperatura, da pressão osmótica. As condições fisiológicas podem ser relativamente constantes, fatores que não são encontrados nos testes com animais (ROGERO, *et al.*, 2003; PRADO, 2012).

A análise de citotoxicidade pode ser feita verificando contagem de células totais, formação de colônia, aderência celular, produtos de metabolismo entre outros. Os métodos mais utilizados para a avaliação *in vitro* de modelos da citotoxicidade são de difusão em ágar e o método de incorporação do corante vermelho neutro (2-amino-3-metil-7dimetil-amino-cloreto de fenazina) (CRUZ, 2003).

O método de incorporação com corante vermelho neutro é realizado com a incorporação do corante na membrana das células, concentrando-se nos lisossomos, por ligação eletrostática com grupo aniônica, contudo as substâncias testadas danificam as membranas das células, e conseqüentemente, liberam o corante no interior das mesmas, sendo assim podem-se verificar as células vivas, danificadas e mortas, pela intensidade ou ausência de coloração da cultura celular apresentada no final do teste. O método de difusão em ágar é realizado semeando a cultura celular em placa de Petri, tendo como ponto positivo a utilização de material que possui ação citotóxica como fragmentos de látex (ROGERO, *et al.*, 2003; VIDAL, 2007; ABREU, 2008; BEDNARCZUK, *et al.*, 2010).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir da análise das informações contidas neste trabalho acerca dos estudos toxicológicos a partir dos testes *in vivo* e *in vitro*, é possível concluir que o teste *in vivo* utiliza animais para testar a toxicidade de determinadas substâncias levando a morte de vários animais, e esse teste está sendo criticado em função do grande número de animais requerido e do sofrimento causado neles durante alguns tipos de experimentos, por isso, tem-se realizado o teste alternativo ou teste *in vitro* com a finalidade de substituir os testes com animais.

Os testes *in vitro* são essenciais para detectar a toxicidade de substâncias que serão utilizadas em seres humanos. E utiliza organismos como, bactérias, fungos, algas e crustáceos na realização dos testes.

Além disso, utiliza-se também o programa 3R's, redução (Reduction), refinamento (Refinement) e substituição (Replacement), que consiste na redução do número de animais utilizados nas pesquisas, reduzir, ao mínimo possível, o sofrimento dos animais.

É possível analisar os ensaios toxicológicos que são feitos para determinar os níveis de ingestão das substâncias que não causam nenhum dano ao ser humano. Os principais ensaios são ingestão diária aceitável (IDA), nível de ingestão abaixo do qual o efeito toxicológico não é observado (NOAEL) e dose letal (LD₅₀). Além do mais, foram estudados também a toxicidade aguda, que ocorre em um único contato (dose única) ou múltiplos contatos com o agente tóxico, num intervalo de tempo aproximado de 24 horas, e, os testes de toxicidade crônica e sub-crônica, que decorrem do efeito tóxico após exposição prolongada a doses acumulativas de agente tóxico, num período prolongado, maior que três meses a alguns anos.

Ainda é possível concluir que os aditivos alimentares são substâncias intencionalmente adicionadas ao alimento com a finalidade de conservar, intensificar ou modificar suas propriedades, desde que não prejudique seu valor nutritivo. E podem ser classificados como Geralmente Reconhecidos como Seguros – GRAS e os Geralmente Não Reconhecidos como Seguros – Não-GRAS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, C. L. C. **Avaliação da citotoxicidade induzida por produtos cosméticos pelo método de quantificação de proteínas totais em células 3T3**. Tese (Dissertação de Mestrado - Fundação Oswaldo Cruz – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde). Rio de Janeiro. p.122. 2008.

AMARAL, E. A.; SILVA, R. M. G. Avaliação da toxicidade aguda de angico (*Anadenanthera falcata*), pau-santo (*Kilmeyera coreacea*), aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) e cipó-de-são-joão (*Pyrostegia venusta*), por meio do bioensaio com artemia salina. **Revista Eletrônica da Pesquisa**. 2007. Disponível em: <http://www.unipam.edu.br/perquirere/file/file/2008_cb/artigo_eni.pdf>. Acesso em: 29 de maio de 2012.

ANTUNES, L. M. G.; ARAUJO, M. C. P. Mutagenicidade e antimutagenicidade dos principais corantes para alimentos. **Rev. Nutr.**, Campinas, v.13 n.2, p.81-88, 2000.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Informe Técnico nº 17**, de 19 de janeiro de 2006. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/17_190106.htm>. Acesso em: 28 de maio de 2012.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria nº 116/MS/SNVS**, de 8 de agosto de 1996. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/116_96.htm>. Acesso em: 01 de junho de 2012.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria nº 540 - SVS/MS**, de 27 de outubro de 1997. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/540_97.htm>. Acesso em: 04 de setembro de 2012.

AUN, M. V.; MAFRA, C.; PHILIPPI, J. C.; KALIL, J.; AGONDI, R. C.; MOTTA, A. A. Aditivos em alimentos. **Revista Brasileira de Alergia Imunopatologia**. v. 34, n.5, 2011.

AZEVEDO, F. A. A toxicologia e o futuro. **Revista Intertox de Toxicologia**, Risco Ambiental e Sociedade, Salvador, v.3, n.3, outubro, 2010.

BEDNARCZUK, V. O.; VERDAM, M. C. S.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Testes *in vitro* e *in vivo* utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.11, n.2. 2010.

BRASIL. Lei 9.605, 12 de fevereiro de 1998. Dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 13 fev. 1998.

BURDOCK, G. A.; CARABIN, I. G.; GRIFFITHS, J. C. The importance of GRAS to the functional food and nutraceutical industries. **Toxicology**, 221, p.17-27. 2006.

CAZARIN, K. C. C.; CORRÊA, C. L.; ZAMBRONE, F. A. D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 40, n.3, Julho-Setembro. 2004.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Quím. Nova**, v.31, n.7, São Paulo. 2008.

CRUZ, A. S. **Teste de Citotoxicidade *in vitro* como alternativa ao teste *in vivo* de draize na avaliação de produtos cosméticos**. Tese (Doutorado Produção e Controles Farmacêuticos). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

CRUZ, S. M. da; ANGELIS, L. H. **Alternativas aos testes de segurança de cosméticos em animais**. 2010. Disponível em: <http://blog.newtonpaiva.br/seer_3/index.php/RevistaPos/article/viewFile/261/250> . Acesso em: 28 de maio de 2012.

FAO – Food and Agriculture Organization. **Combined Compendium of Food Additive Specifications**. 2012. Disponível em: <<http://www.fao.org/food/food-safety-quality/scientific-advice/jecfa/jecfa-additives/en/>>. Acesso em: 04 de setembro de 2012.

FDA. **Generally Recognized as Safe (GRAS)**. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/GenerallyRecognizedasSafeGRAS/default.htm>>. Acesso em: 05 de setembro de 2012.

FDA.IV.C.3.a. Short-Therm Toxicity Sutudies with Rodents. In: Toxicological Principles for the Safety Assessment of Food Ingredients. **Redbook 2000**. November, 2003 a.

FDA.IV.C.4.a. Subchronic Toxicity Studies with Rodents. In: Toxicological Principles for the Safety Assessment of Food Ingredients. **Redbook 2000**. November, 2003 b.

FDA.IV.C.4.b. Subchronic Toxicity Studies with Non - Rodents. In: Toxicological Principles for the Safety Assessment of Food Ingredients. **Redbook 2000**. November, 2003 c.

FDA.IV.C.5. One – Year Toxicity Studies with Non - Rodents. In: Toxicological Principles for the Safety Assessment of Food Ingredients. **Redbook 2000**. November, 2003 d.

FRAZIER, J. M. ***In vitro* Toxicity testing**. Applications to safety evaluation. New York, Marcel Dekker, Inc., 1992. p.300.1992.

GOLDSTEIN, B. D.; HENIFIN, M. S. Reference Guide on Toxicology. In: Federal Judicial Center. **Reference Manual on Scientific Evidence**. 2 ed. 2000.

JARDIM, A. N. O; CALDAS, E. D. Exposição humana a substâncias químicas potencialmente tóxicas na dieta e os riscos para saúde. **Quim. Nova**, v.32, n.7, p.1898-1909, 2009.

LIMA, I. R. **Efeito do zinco na biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo* de grânulos de zinco-apatita 5% em comparação com a hidroxiapatita**. Tese (Dissertação de mestrado na área de Engenharia Metalúrgica e de Materiais) Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ. 2006.

MIDIO, A; MARTINS, I. **Toxicologia de alimentos**. 1 ed. São Paulo: Varela, 2000.

MÖRSCHBÄCHER, A. P.; SOUZA, C. F. V. Determinação do teor de aditivos em preparados sólidos para refresco sabor abacaxi comercializados na região do Vale do Taquari, RS. **Revista Destaques Acadêmicos**, n.4, CETEC/UNIVATES. 2011.

OLIVEIRA, C. C. **Estudos toxicológico pré-clínico do extrato aquoso e do óleo essencial das folhas de *Alpinia zerumbet* (pers.) Burt & Smith**. Tese (Dissertação de Mestrado em Farmacologia na área de Fisiologia e Farmacologia). Universidade Federal do Ceará, CE. 2008.

OMS – Organização Mundial da Saúde. **Norma general para los aditivos alimentarios**. CODEX STAN 1995.

PETROIANU, A. **Aspectos Éticos na Pesquisa em Animais**. Belo Horizonte, 1996. Disponível em: <<http://www.medicina.ufmg.br/cememor/arquivos/aspectosEticosAnimais.pdf>>. Acesso em: 28 de maio de 2012.

PIMENTEL, L. C. F.; CHAVES, C. R.; FREIRE, L. A.; AFONSO, J. C. O inacreditável emprego de produtos químicos perigosos no passado. **Química Nova**, v.29, n.5, p.1138-1149, 2006.

POLÔNIO, M. L. T.; PERES, F. Consumo de aditivos alimentares e efeitos à saúde:

desafios para a saúde pública brasileira. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.25, n.8, p.1653-1666, ago, 2009.

PRADO, P. A. F. **Avaliação do possível efeito dual (antioxidante e/ou pró-oxidante) e ação neuroprotetora do ebselen, ácido caféico e memantina em células neurais (Neuro-2a) *in vitro***. Tese (Dissertação de Mestrado em Neurociências do Instituto de Ciências Biológicas). Universidade Federal de Minas Gerais. 112 p. 2012.

ROGERO, S. O.; HIGA, O. Z.; SAIKI, M.; CORREA, O. V.; COSTA, I. **Toxicology *in vitro***. v. 14, n. 6, p. 497-504, 2000.

ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, A. S. Testes *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Reserach**, Vol.6, N.3, p.317-320, 2003.

ROMANELLI, M. F. **Avaliação da toxicidade aguda e crônica dos surfactantes dss e las submetidos à irradiação com feixes de elétrons**. Tese (Dissertação de Mestrado - Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. Autarquia associada à Universidade de São Paulo. São Paulo. 2004.

TONETTO, A.; HUANG, A.; YOKO, J.; GONÇALVES, R. **O uso de aditivos de cor e sabor em produtos alimentícios**. Universidade de São Paulo – Faculdade de Ciências Farmacêutica. Tecnologia de alimentos. São Paulo. 2008.

VALADARES, M. C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “Era do Teste DL50”. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Vol. 3, N.2, p.93-98, 2006.

VIDAL, K. A. L. **Estudo da Citotoxicidade de três cimentos obturadores endodônticos à base de óxido de zinco e eugenol em cultura de células L929**. Tese Mestrado (Escola de Odontologia). Universidade do Grande Rio José de Souza Herdy – Duque de Caxias. p.99. 2007.

WATANABE, E.; NUTTI, M. R. Alimentos geneticamente modificados: avaliação de segurança e melhorias de qualidade em desenvolvimento. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Vol.1, n.1, p.1-14, 2002.