



UNIVERSIDADE  
DO BRASIL  
UFRJ



instituto de **biologia**  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

**ATA - DEFESA DE MONOGRAFIA DE PROJETO FINAL**

|   |                                 |
|---|---------------------------------|
| <b>NOME DO GRADUANDO (A)</b><br>Vanessa Lira Ribeiro Cordeiro | <b>MATRÍCULA</b><br>12114020256 |
|---|---------------------------------|

**LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – IB – UFRJ – EAD – POLO CAMPO GRANDE**

**TÍTULO DA MONOGRAFIA**

**Revisão sobre os métodos alternativos ao teste de irritação ocular (teste de Draize)**

| <b>NOME DOS MEMBROS DA BANCA</b>            | <b>TÍTULO</b> | <b>ASSINATURAS</b>      |
|---|---------------|-------------------------|
| Orientador Octavio Augusto França Presgrave | Doutor        |                         |
| Daniela Guedes da Cruz                      | Doutora       |                         |
| Rita de Cássia Soares Alves                 | Doutora       |                         |
|   |               | <b>Data:</b> 19/09/2017 |

**APROVADO (A)**

**REPROVADO (A)**

**HAVENDO SUGESTÕES NA DEFESA, COLOCAR TÍTULO MODIFICADO DA MONOGRAFIA**

**Sr.(a) Coordenador (a):** encaminho, em anexo, a versão **revisada** do Trabalho Final de Curso nos formatos **impresso** e **digital**. Atesto que tal versão contempla as sugestões e/ou observações feitas pela banca durante a defesa.

**ASSINATURA DO ORIENTADOR:**

**LOCAL E DATA**

Rio de Janeiro, 17 de outubro de 2017.

**ASSINATURA DO COORDENADOR DO CURSO**

**LOCAL E DATA**



UNIVERSIDADE  
DO BRASIL

UFRJ

INSTITUTO DE BIOLOGIA – CEDERJ



Fundação

CECIERJ

Consórcio cederj

REVISÃO SOBRE OS MÉTODOS ALTERNATIVOS AO TESTE DE IRRITAÇÃO  
OCULAR (TESTE DE DRAIZE)

VANESSA LIRA R. CORDEIRO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
PÓLO UNIVERSITÁRIO DE CAMPO GRANDE

2017



UNIVERSIDADE  
DO BRASIL

UF RJ

INSTITUTO DE BIOLOGIA – CEDERJ



REVISÃO SOBRE OS MÉTODOS ALTERNATIVOS AO TESTE DE IRRITAÇÃO  
OCULAR (TESTE DE DRAIZE)

VANESSA LIRA R. CORDEIRO

Monografia apresentada como atividade obrigatória à integralização de créditos para conclusão do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas - Modalidade EAD.

Orientador (a): Octavio Augusto França Presgrave

ORIENTADOR: OCTAVIO AUGUSTO FRANÇA PRESGRAVE

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

PÓLO UNIVERSITÁRIO DE CAMPO GRANDE

ANO DA DEFESA 2017

**FICHA CATALOGRÁFICA**

Cordeiro, Vanessa Lira Ribeiro.

Revisão sobre os métodos alternativos ao teste de irritação ocular (teste de Draize). Campo Grande, 2017. 68 f. il: 31 cm

Orientadora: Octavio Augusto França Presgrave.

Monografia apresentada à Universidade Federal do Rio de Janeiro para obtenção do grau de Licenciado (a) no Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas – Modalidade EAD. 2017.

Referencias bibliográfica: f.58-68

1. Palavras Chaves: Coelhos, cosméticos, experimentação animal, irritação ocular, métodos alternativos, teste de Draize.

I. PRESGRAVE, Octavio Augusto França.

II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Licenciatura em Ciências Biológicas – Modalidade

EAD

III. Revisão sobre os métodos alternativos ao teste de irritação ocular (teste de draize).

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por ter me permitido chegar até aqui e continuar nessa caminhada, sei que tenho muito pela frente e Ele vai estar comigo sempre.

A minha linda e guerreira mãe, Maria da Guia, pelo seu amor e cuidados comigo, por sempre acreditar em mim, pelo constante incentivo, por simplesmente existir.

A meu pai, Antonio Gomes, e meus irmãos, Viviane Lira e Marcos Lira, por tornarem meus dias sempre alegres.

Agradeço a meu amado e querido esposo, que está comigo desde o ensino médio, me incentivando, me ouvindo e me apoiando nos bons e momentos difíceis.

Ao meu orientador Octavio Augusto, pela confiança, dedicação e acompanhamento.

As minhas amigas, Maristela, Monique, Ana, Karlheane, Karine, Marta, Gisele e Daniela, que estão comigo sempre e de alguma forma contribuíram para minha jornada acadêmica e realização deste trabalho .

Agradeço a toda equipe do INCQS, orientadores, amigos, que me receberam de braços abertos e me proporcionaram um conhecimento teórico e prático.

A todos familiares e amigos, que durante minha trajetória me orientaram, incentivaram e tiveram muita paciência para entender minhas ausências.

*In memoriam* do meu amigo Mario e minha querida dona Deize, que me incentivou e ajudou mesmo antes de me conhecer, o conhecimento que tenho sobre essa área de estudo ocorreu por causa dela.

## **SUMÁRIO**

|   |    |
|---|----|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....  | 10 |
| 1.1 JUSTIFICATIVA.....  | 11 |
| 1.2 TESTE DE IRRITABILIDADE OCULAR - TESTE DE DRAIZE.....                       | 12 |
| 1.3 ESTRUTURAS OCULARES ( HUMANA E DE UM COELHO).....                           | 15 |
| 1.4 O TESTE DE IRRITAÇÃO OCULAR.....  | 16 |
| 1.5 A SITUAÇÃO DOS COSMÉTICOS.....  | 18 |
| 1.6 ASPECTOS LEGAIS SOBRE A EXPERIMENTAÇÃO.....                                 | 21 |
| 1.7 AS ALTERNATIVAS AO TESTE DE IRRITAÇÃO OCULAR .....                          | 23 |
| 1.8 OS MÉTODOS ALTERNATIVOS AO TESTE DE IRRITAÇÃO OCULAR (TESTE DE DRAIZE)..... | 29 |
| 1.9 PROPOSTA ATUAL.....   | 31 |
| <b>2. OBJETIVO</b> .....  | 34 |
| <b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....  | 34 |
| <b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....  | 36 |
| <b>5. CONCLUSÃO</b> .....   | 58 |
| <b>6. REFERÊNCIAS</b> .....   | 57 |

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

**3T3** - Células de embrião de camundongo

**ANVISA** - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**BCOP** (*Bovine Cornea Opacity Permeability*) Teste de Opacidade Corneal Bovina

**BraCVAM** - Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos

**CAMVA**- Levantamento da capacidade de previsão de irritação ocular utilizando Membrana Corioalantóica Vascular Assay

**CAPES** -Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

**CAM-TBS** (*Chorionallantoic Membrane - Trypan Blue Stainin*) Teste de Coloração com Azul de Tripan da Membrana Córion-alantóide

**CEUAS**- Comissões de Ética no Uso de Animais)

**CFDA**- *China Food and Drug Administration* (Administração de Comida e Drogas da China)

**DCGI**- Drug Controller General of India

**ECVAM**- *European Centre for Validation of Alternative Methods*

**EEC** –Economic European Community

**e.g** – *exempli gratia* (por exemplo)

**EPA** -United States Environmental Protection Agency

**EUA**- Estados Unidos da América

**FDA** - *The Food and Drug Administration*

**Fiocruz**- Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz):

**FIG**: Figura

**FL** (Fluorescein Leakage) Teste de Extravasamento de Fluresceína;

**FRAME** - *The Fund of the Replacement of Animals in Medical Experiments*

**GHS** - Sistema Harmonizado Globalmente para a Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos

**HET-CAM** (*Hen's Egg Test Chorionallantoic Membrane*) Teste da Membrana Córion-Alantóide de Ovo Embrionado de Galinha

**HSI**- Humane Society International

**ICCVAM** - *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*

**ICE** (Isolated Chicken Eye) Teste Olho Isolado de Galinha

**IL**: Irritante Leve

**IM**: Irritante Moderado

**INCQS** - Instituto Nacional de Controle de Qualidade

**IRE** (Test in eye of rabbit), Teste em olho isolado de coelho

**IS:** Irritante Severo

**JaCVAM** - *Japanese Center for the Validation of Alternative Methods*

**LACENS-** laboratórios centrais de Saúde Pública

**MTT** - Tetrazolium dye uptake assay or Assay of mitochondrial metabolic activity

**NI-** Não irritante

**NRU** (Neutral Red Uptake), Células 3t3 com NRU ou ensaio de captação do vermelho neutro

**OECD** - Organização para a Cooperação Econômica e Desenvolvimento

**QPT** -Total protein quantification assay- ensaio de quantificação de proteínas totais

**QSARs-** Structure-activity relationships and quantitative structure-activity relationships -  
Relações estrutura-atividade e relações quantitativas estrutura-atividade

**RBC** (Red Blood Cell) ensaio de citotoxicidade como o teste de hemólise

**REBLAS-** Rede Brasileira de Laboratórios Analíticos em Saúde

**RhCE** (Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method ) Epitélio corneal humano reconstruído

**RN-** Resolução Normativa

**SIRC-** Statens Serum Institut Rabbit Cornea- linhagem celular proveniente de córnea de coelho

**STE-** Short Time Exposure In Vitro Test Method for Identifying - Teste in vitro de curta duração para danos oculares

**UFRJ-** Universidade Federal do Rio de Janeiro

**ZEBET-** National German Center for *Documentation and Evaluation of Alternatives to Animal Experiments*



## RESUMO

Até o século XX era comum à comercialização de produtos sem serem testados quanto sua eficácia, sem a devida avaliação toxicológica e possíveis danos que estes poderiam causar a saúde de seus consumidores, acarretando em sérios danos á saúde humana, conforme esta descrito na literatura, devido a essa situação foi necessário um controle da toxicidade e fiscalização do produto final e seus ingredientes para garantir a segurança e eficácia dos mesmo para a população.

Neste momento surge o teste de irritação ocular, teste de Draize, que utiliza coelhos para este fim, mas o uso de animais em experimentação têm sido severamente criticado e questionado por grupos defensores do bem estar dos animais, por levarem ao sacrifício e sofrimento injustificado de um número extraordinário de animais. Além de questões éticas, a busca por métodos alternativos, seguindo o princípio dos 3Rs, de Russel e Burch, é uma questão de grande relevância para os laboratórios oficiais de controle da qualidade.

O objetivo desse trabalho foi elaborar uma revisão bibliográfica sobre os métodos alternativos ao teste de irritação ocular, teste de Draize, demonstrando as metodologias alternativas existentes atualmente no mercado mundial utilizadas para avaliação toxicológica de segurança de produtos, demonstrando os métodos válidos e validados, assim como fomentar a reflexão acerca de valores éticos sobre a preservação da vida animal. Para o levantamento desses dados foi realizada uma revisão de literatura em artigos científicos e sites consagrados nacionais e internacionais que tratam do assunto, foram levantados dados bibliográficos sobre os principais métodos alternativos existentes atualmente que substituem o uso de animais vivos na pesquisa científica, buscando também desde as primeiras leis elaboradas a proteção ambiental/animal, a consolidação do teste de irritação ocular, teste de Draize a atualidade sobre este métodos e os testes alternativos a este.

Os métodos alternativos que são validados atualmente são: Teste in vitro de curta duração para danos oculares, Epitélio corneal humano reconstruído, BCOP, ICE e FL e os válidos: HET-CAM, CAM-TBS, IRE, RBC, NRU, QPT e MTT.

Apesar da grande quantidade de métodos existentes, a substituição completa de animais ainda não é possível em diversas áreas da experimentação, devido a isso esta sendo estudado uma bateria de testes, capazes de, a partir de uma avaliação conjunta, substituir o uso de coelhos, e através desta, desenvolver um sistema hierárquico onde animais sejam utilizados apenas para a confirmação da ausência de toxicidade, reduzindo ao máximo o risco.

**Palavras-chave: Coelhos, cosméticos, experimentação animal, irritação ocular, métodos alternativos, revisão, teste de Draize.**

## **1- INTRODUÇÃO**

Milhares de produtos de limpeza cosméticos, medicamentos e de higiene pessoal de uso tópico são lançados no mercado desde épocas remotas, e muitas das fontes de seus ingredientes são substâncias químicas sintéticas, que sem o devido controle de sua eficácia e toxicidade, podem acarretar sérios danos à saúde humana, logo é extremamente necessário garantir a segurança e eficácia dos mesmos, através do controle da toxicidade do produto final e dos seus ingredientes conforme vários autores relatam na literatura (ROMANOWSKI & SHUELLER, 1996; BRASIL, 2002).

Até o século XX era comum a comercialização de produtos sem serem testados quanto sua eficácia, sem a devida avaliação toxicológica e possíveis danos que estes poderiam causar a saúde de seus consumidores. Nesse contexto, vale citar um dos casos mais conhecidos da literatura, classificado como uma das maiores tragédias da toxicologia no que se refere a problemas ocasionados pelo uso de produtos que foram lançados sem testes prévios. A tragédia ocasionada pelo uso de um cosmético, corante para cílios e sobrancelhas, que tinha em sua composição parafenilenodiamina, da linha Lash Lure, nos EUA que deixou aproximadamente 12 indivíduos cegos e levou a óbito uma mulher ( WILHELMUS, 2001). O FDA (Food and Drug Administration) divulgou o caso, com cartazes como o ilustrado na Figura 1, alertando a população para o risco associado ao uso do produto.

Diante dessa situação a população necessitava de regulamentações que as protegessem do lançamento descontrolado de produtos, sem a devida avaliação toxicológica no mercado para consumo, portanto neste momento o FDA publicou a primeira lei Federal voltada para garantia toxicológica desses produtos, pois preconizava todas as medidas que deveriam seguir antes de serem lançados no mercado.



FIG 1: Ilustração divulgada pelo FDA no ano de 1933.

O cartaz descreve o mote da campanha da *Lash Lure*: “*Irradie personalidade*”, e afirma “esta é a versão do fabricante para os efeitos de seu produto” com a foto de uma das vítimas do *Lash Lure*, uma mulher de 38 anos de Ohio, EUA, horas antes fazer uso do produto). À direita: “*Totalmente cega: este foi o verdadeiro efeito de Lash Lure, em pelo menos um dos casos* ( com a foto da mesma mulher com severa alteração bilateral de córnea, semana após ter utilizado o produto).*Fonte: <http://www.fda.gov/oc/history/historyoffda/section2.html>*

### 1.1 JUSTIFICATIVA

A lista de princípios ativos tóxicos presentes em produtos para higiene pessoal e embelezamento era significativa. Há registros da comercialização de produtos como o *Berry's Freck*®, uma pomada a base de mercúrio, o *Anti-Mole*®, um creme anti-sinais contendo 5% de ácido nítrico acrescido a 25% de ácido acético glacial, tônicos capilares como *Dr. Denni's*® e *Dewsberry*® a base de cloreto de cobre e hidrato de cloro, ou ainda, xampus contendo em suas formulações substâncias hoje sabidamente carcinogênicas como o tetracloreto de carbono (ILAR, 2004; RIORDAN, 2004; COSTA, 2006).

Pode-se citar também a tragédia do elixir de sulfanilamida, o uso de terapias fortificantes à base de Ra-226 e/ou Ra-228, ou ainda, a tragédia da talidomida (WAX, 1995; MACKLIS, 1990; BOTTING, 2002).

No final da década de 1930 eram tantos os casos de agravos à saúde e óbitos induzidos por produtos de uso comum nos EUA, que coleções conhecidas como “*The American Chamber of Horrors: the truth about food and drugs*”, organizada pela FDA –

“*Food and Drug Administration*”, e o *best-seller* americano “*100.000.000 Guineapigs: dangers in everydayfoods, drugs, andcosmetics*” foram publicadas com a finalidade de alertar a opinião pública para tal fato (Calver, 1936).

E a partir dos registros publicados, autoridades americanas competentes publicaram a primeira Lei Federal, “The Federal Food, Drug, and Cosmetic Act” voltada para a garantia de segurança de Alimentos, Medicamentos e Cosméticos, que regulamentou os produtos cosméticos e trouxe inovações para o campo de medicamentos, como por exemplo, a exigência de comprovação de eficácia/segurança de novos produtos numa etapa prévia a comercialização.

Este Ato preconizava todas as medidas que os produtos cosméticos deveriam seguir antes de serem lançados no mercado, resultando no aumento da utilização de testes em animais, para que a partir destes fosse possível determinar as reações que garantissem a segurança e eficácia dos mesmos, através do controle da toxicidade do produto final e de seus ingredientes (ROMANOWSKI & SCHUELLER, 1996; BRASIL, 2002).

Portanto, no momento de crise do sistema de saúde pública americano, como fruto da necessidade detectada pelos órgãos regulatórios competentes de se controlar adequadamente aspectos relacionados à segurança de produtos cosméticos, antes mesmo, destes ganharem o mercado consumidor (KURIAN, 1998), foi desenvolvido o teste de irritação ocular, conhecido como teste de Draize, criado em 1944 pelo farmacologista John H. Draize do FDA e seus colaboradores, um teste biológico que utiliza coelhos para determinar a irritação ocular induzida por medicamentos, cosméticos e outras substâncias químicas, para avaliar o potencial toxicológico deste ao entrar em contato com o olho humano (DRAIZE *et al.*, 1944., KAY e KALANDRA, 1962).

## **1.2 TESTE DE IRRITABILIDADE OCULAR - TESTE DE DRAIZE**

Basicamente, o teste de irritabilidade ocular descrito por Draize, teve como objetivo avaliar os efeitos das substâncias na conjuntiva, na íris e na córnea de olhos de coelhos albinos. Para a realização do teste, foram utilizadas no mínimo 9 coelhos, os quais foram colocados em uma estrutura que mantém suas cabeças imobilizadas. Em seguida, 0,1 mL da substância foi instilada na conjuntiva do olho de cada animal. Os olhos não tratados serviram como controle e foram examinados nos tempos de uma hora, 24 horas (momento que se lava os olhos tratados com solução salina a 0,9%) 48, 72 horas e 7 dias após a instilação (DRAIZE *et al.*, 1944., KAY e KALANDRA, 1962). A avaliação dos efeitos adversos após a exposição

ao agente irritante é realizada através de parâmetros como opacidade para análise da córnea; congestão, reação à luz, hemorragia e para análise da íris; e vermelhidão, quimose e secreção para análise da conjuntiva (Figura 2). Após a observação e os dados serem plotados realiza-se a classificação do produto final, quanto sua toxicidade, classificando como Não Irritante (NI), Irritante Leve (IL), Irritante Moderado (IM), Irritante Severo (IS) e Irritante Máximo (IMÁX) ( Tabela 1). Os efeitos e os valores de graduação para lesão ocular estão representados na tabela 2 (AAVS, 2010; COSTA, 2006; CRUZ, 2003; PINHEIRO, 2007).

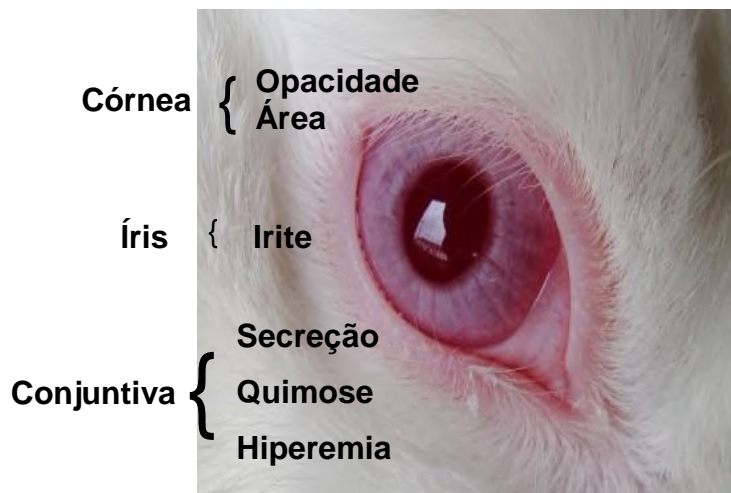


FIG 2: Possíveis reações nas estruturas oculares do coelho

| <b>FAIXA</b><br>(Graduação das lesões) | <b>CLASSIFICAÇÃO</b>      |
|--|---------------------------|
| <b>0,0 a 14,9</b>                      | <b>Não Irritante</b>      |
| <b>15,0 a 24,9</b>                     | <b>Irritante Leve</b>     |
| <b>25,0 a 49,9</b>                     | <b>Irritante Moderado</b> |
| <b>50,0 a 79,9</b>                     | <b>Irritante Severo</b>   |
| <b>80,0 a 110</b>                      | <b>Irritante Máximo</b>   |

Tabela 1- Classificação quanto à graduação das lesões (Kay & Kalandra, 1962).

Tabela 2- Teste de irritação ocular em coelhos: valores de graduação para lesões oculares.

| DESCRIÇÃO DAS LESÕES   | GRAU |
|--|------|
| <b>Córnea (opacidade)</b>  |      |
| Não ulceração ou opacidade   | 0    |
| Área dispersa de opacidade, íris totalmente visível.                                 | 1    |
| Áreas transluzentes facilmente discerníveis, detalhes da íris pouco obscuros.        | 2    |
| Áreas necróticas, detalhes da íris não visíveis, tamanho da pupila pouco discernível | 3    |
| Completa opacidade da córnea, íris não discernível.                                  | 4    |
| <b>Íris (irite)</b>  |      |
| Normal   | 0    |
| Dobras marcadamente profundas, congestão, inchaço, íris ainda reativa a luz.         | 1    |
| Não reação à luz, hemorragia, destruição grosseira.                                  | 2    |
| <b>Conjuntiva</b>  |      |
| <b>Hiperemia</b>   |      |
| Vasos normais  | 0    |
| Alguns vasos definitivamente injetados   | 1    |
| Vermelho carmim difuso, vasos individuais não facilmente discerníveis.               | 2    |
| Vermelho-carne difuso  | 3    |
| <b>Quemose</b>   |      |
| Não inchaço  | 0    |
| Algum inchaço acima do normal  | 1    |
| Obvio inchaço com parcial aversão das pálpebras                                      | 2    |
| Inchaço com pálpebras pouco fechadas   | 3    |
| Inchaço com pálpebras mais que metade fechadas                                       | 4    |

Fonte: Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, São Paulo, v.30, p.23, 2009.

### **1.3 ESTRUTURAS OCULARES (HUMANA E DE UM COELHO)**

A estrutura da córnea do olho de um coelho difere significativamente da córnea do olho do ser humano, como se demonstra nas figuras 3 e 4. Os coelhos também produzem um volume menor de lágrimas do que o homem, permitindo que os produtos aplicados nos olhos dos coelhos permaneçam por mais tempo e cause maior irritação. Essa variação não só faz do teste ocular de Draize incerto, como também contribui para o imenso sofrimento causado aos animais (AAVS, 2010).

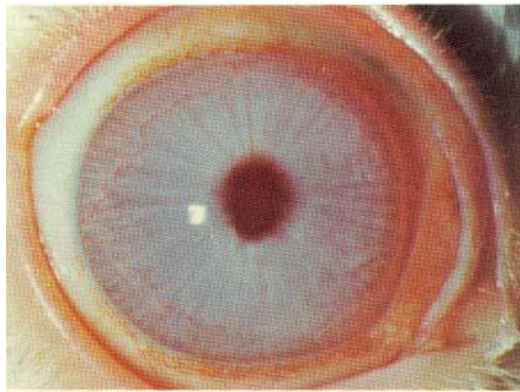


FIG 3: Estrutura ocular de um coelho, preservado em sua forma íntegra.

Fonte: <http://www.vetweb.com.br/album.php?IDAlbum=22>

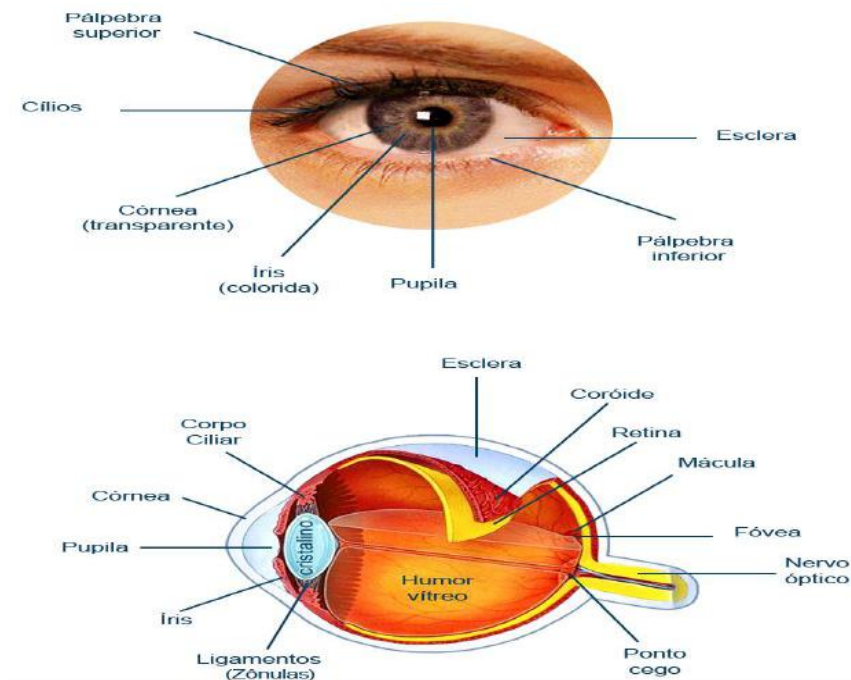


FIG 4 – Ilustração didática da estrutura ocular humana

Fonte: <https://www.optivista.com.br/pt/olho-humano/humana>



## 1.4 O TESTE DE IRRITAÇÃO OCULAR

Durante muito tempo este teste foi considerado um procedimento padrão universal para avaliação da irritação ocular e o potencial de risco de substâncias químicas manufaturadas em vários tipos de indústrias (*e.g.* cosméticos, fármacos, produtos de uso agrícola e domissanitários, entre outros).

Ao longo dos anos, desde sua criação, o teste sofreu diversas alterações (Tabela 3). Algumas versões modificadas do teste foram apresentadas pela comunidade científica (DRAIZE *et al.*, 1944; DRAIZE, 1959; KAY & CALANDRA, 1962; DASTON & FREEBERG, 1991; CHAMBERS *et al.*, 1993 e CHAN & HAYES, 1994) e diversos protocolos foram objeto de discussão em fóruns técnico-científicos no mundo todo (WILHELMUS, 2001).

Iniciando o processo de experimentação animal, que basicamente se refere ao estudo em animais, com o objetivo de obter maior conhecimento deles próprios, e possíveis aplicações na própria saúde e bem estar dos mesmos, tal como ocorre no campo da Medicina Veterinária. Porém, de forma mais frequente, os animais são utilizados como “modelos”, a fim de que se obtenham conhecimentos e possíveis benefícios inerentes à saúde humana (PAIXÃO, 2001).

De uma forma geral, qualquer animal pode ser utilizado em experimentos; porém, o modelo animal é escolhido de acordo com a especificidade da ação estudada (ANDRADE *et al.*, 2002).

Hoje, apesar das duras críticas e de existirem controvérsias quanto à validade de seus resultados, o teste de irritação ocular de Draize permanece preconizado em diretrizes internacionais para avaliação de segurança de substâncias químicas (OECD, 2002), ainda aceito pela entidade regulatória brasileira, *i.e.* ANVISA, para a avaliação do efeito irritante ocular de produtos sujeitos à ação da Vigilância Sanitária, assim como são aceitos os novos métodos que com o passar do tempo foram surgindo (Demonstrados nas tabela 3 e 4, RN's nº 18 e 31).

Como o teste de Draize ainda é adotado pelos órgãos oficiais para fins regulatórios, mas, constantemente, sofre com severas críticas seja pelos setores antivivissecionistas ou no próprio meio científico, onde muitos alegam que é um teste de extrema crueldade, que apresenta limitações, sobretudo, no que diz respeito às diferenças entre o olho do coelho e o olho humano e à subjetividade de sua resposta (NÓBREGA *et al.*, 2008).

Tabela 3 - Parâmetros dos métodos propostos para o teste de irritação ocular em coelhos.

| PARÂMETROS                          | MÉTODOS                                 |   |  |  |
|-------------------------------------|---|---|--|--|
|                                     | Draize et al. (1944)                    | CFR (1986)                              | Kay et al. (1962)                                    | INCQS (1997)   |
| Espécie de animal                   | Coelho albino                           | Coelho albino                           | Coelho albino  | Coelho albino  |
| Numero de animal                    | 9                                       | 6                                       | 5  | 5  |
| Irrigação                           | 2 s após<br>Aplicação                   | Depois da leitura<br>de 24h             | Depois da leitura<br>de 24h                          | Depois da leitura<br>de 24h                            |
| Lavagem                             | 20 mL com água destilada                | NaCl 0,9% por 5<br>minutos              | NaCl 0,9% por 5<br>Minutos                           | NaCl 0,9% por 5<br>Minutos                             |
| Leituras de testes                  | 24, 48, 72 h<br>4 e 7 dias              | 24, 48, 72 h.                           | 24, 48, 72 h<br>4 e 7 dias                           | 24, 48, 72 h<br>4 e 7 dias                             |
| Lesões observadas                   | Opacidade, irite,<br>hiperemia, quemose | Opacidade, hiperemia,<br>irite, quemose | Opacidade, irite,<br>hiperemia, quemose,<br>secreção | Opacidade,<br>irite, hiperemia,<br>quemose             |
| Classificação do produto<br>testado | Irritante ou não<br>Irritante           | Irritante ou não<br>irritante           | 7 classes de irritação                               | 5 classes de<br>irritação                              |
| Critério de<br>Classificação        | Nº de animais com reação<br>positiva    | Nº de animais<br>com reação             | Colocação das<br>médias em tabela<br>classificatória | Nº de animais<br>com reação<br>positiva igual a<br>Kay |

Fonte: Pinto et al, 2003

## 1.5 A SITUAÇÃO DOS COSMÉTICOS

Cosméticos, segundo a ANVISA, “são preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano, com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência, corrigir odores corporais e ou protegê-los ou mantê-los em bom estado” (ANVISA, 2005).

Apesar de pouco relacionados com sérios riscos à saúde, os produtos cosméticos podem causar efeitos adversos aos usuários. A longo prazo os aspectos de segurança devem ser criteriosamente analisados, uma vez que esses produtos são usados em larga escala por milhões de pessoas, incluindo os grupos mais vulneráveis como: crianças, idosos e gestantes (VINARDELL, 2015).

A segurança toxicológica dos produtos cosméticos é determinada por uma série de estudos de toxicidade, como por exemplo o teste de irritação ocular. Geralmente nos países que não há proibição, os testes são feitos com animais (testes *in vivo*), porém atualmente a maioria dos laboratórios vem se conscientizando e cada vez mais utilizando metodologias alternativas. Além disso, segundo regulamentações, caso exista um método científico já validado *in vitro*, ensaios com animais não devem ser realizados (CHORILLI, *et al.*, 2007).

Na Europa após a publicação da Diretiva 76/768/EEC (UNIÃO EUROPÉIA, 2003), que é à base da legislação técnica europeia em cosméticos, sofreu algumas prorrogações (Directive 2003/15/EC) nas datas que estipulam que os testes em animais para avaliação da segurança de produtos e cosméticos fossem banidos, sendo substituídos por modelos *in vitro*. Tendo em vista que a 6ª Emenda desta Diretiva foi substituída pela 7ª, a qual modificou os prazos para o banimento do uso de animais em produtos cosméticos, estudos *in vivo* para ingredientes isolados de cosméticos, *i.e.* a partir de 11 de março de 2009, embora para produtos acabados, esta proibição já estava em vigor desde de 2004 (CORRADO, 2007). Esta Diretiva proíbe também a importação e a comercialização de qualquer ingrediente ou produto de beleza oriundo dos testes realizado em animais.

Logo a União Europeia, através da 7ª Emenda à Diretiva que regulamenta os cosméticos, já havia fixado datas para que, gradativamente, fossem deixados de usar animais na fabricação de produtos cosméticos, desenvolvimento de matérias-primas, controle dos produtos etc. Esse cronograma foi publicado em um documento intitulado *Timetables for the phasing-out of animal testing in the framework of the 7th Amendment to the Cosmetics Directive (Council Directive 76/768/EEC)*. Neste documento fica explícito que diversos testes, inclusive o de irritação ocular, já teriam ensaios validados substituindo os animais,

antes da data limite, de março de 2009 (COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 2004).

A legislação brasileira que regulamenta o registro e o controle de produtos cosméticos, determina alguns testes em animais para que o produto acabado tenha a garantia da qualidade, eficácia e segurança (ANVISA, 2003). Este fato, invariavelmente, repercute quando uma indústria brasileira necessita exportar um produto para a Europa, em função da proibição do uso de animais em qualquer etapa do desenvolvimento de produtos cosméticos (PRESGRAVE, 2012). Da mesma forma, os estudos envolvendo produtos naturais da flora brasileira, que porventura venham a integrar a composição de um cosmético, necessitam ter asseguradas suas eficácia e segurança, uma vez que, em muitos casos, estudos anteriores são inexistentes. Assim sendo, um processo de validação de métodos alternativos, demonstrando sua aplicação nestes extratos naturais, bem como nos produtos com eles elaborados, é de fundamental importância para o Brasil e outros países (PRESGRAVE, 2012).

Vale ressaltar que antes mesmo desta data foi aprovada em **São Paulo** a lei (nº 15.316 de 23/01/2014) que proíbe totalmente o uso de animais em testes cosméticos, exceto no caso de novas substâncias que ainda não sejam de total conhecimento, os animais poderão ser usados por um período de 5 anos, a primeira do gênero em toda América Latina (BRASIL, 2014) seguida pela lei nº 4538 de 03/06/2014 do estado do **Mato Grosso do Sul**, que proíbe a utilização de animais para desenvolvimento, experimento e teste de produtos cosméticos e de higiene pessoal, perfumes e seus componentes e dá outras providências (BRASIL, 2014). No ano seguinte, no estado do **Amazonas** (14/07/2015) o Projeto de Lei 17/2014, de autoria do deputado estadual Luiz Castro, foi aprovado, na Assembleia Legislativa do Amazonas, alegando que a utilização de animais para desenvolvimento, experimentos e testes de produtos cosméticos, de higiene pessoal, perfumes e seus componentes é proibida em todo o Amazonas (BRASIL, 2015). E em **Porto Alegre**, foi aprovada a lei nº 11955 de 23/11/2015, que proíbe a utilização de animais para desenvolvimento, experimentos e testes de produtos cosméticos e de produtos de higiene pessoal, bem como de seus componentes (BRASIL, 2015), meses após, em 22/12/2015 a Lei 18.668 foi aprovada no Estado do **Paraná** (BRASIL, 2015). Em 11/05/2016, no **Pará**, um projeto de lei para proibir testes de ingrediente e cosméticos em animais tornou-se oficialmente a Lei Estadual 8.361 (BRASIL, 2016).

Atualmente foi votado pela Comissão de Ciência e Tecnologia do Senado Federal em favor de importantes alterações no projeto de lei que visa proibir os testes de cosméticos em animais no Brasil. As mudanças foram propostas pelo Senador Randolfe Rodrigues que

fecharão “lacunas” importantes no projeto de lei originado na Câmara de Deputados, o PLC 70/2014.

Cuja ementa esta descrita da seguinte forma:

**Ementa:**

Altera dispositivos dos arts. 14, 17 e 18 da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, para dispor sobre a vedação da utilização de animais em atividades de ensino, pesquisas e testes laboratoriais com substâncias para o desenvolvimento de produtos de uso cosmético em humanos e aumentar os valores de multa nos casos de violação de seus dispositivos.

**Explicação da Ementa:**

Altera a Lei nº 11.794/08 – que estabelece procedimentos para o uso científico de animais – para vedar a utilização de animais de qualquer espécie em atividades de ensino, pesquisa e testes laboratoriais que visem à produção e ao desenvolvimento de produtos cosméticos e de higiene pessoal e perfumes.

Em 2013, segundo O Drug Controller General of India (DCGI) , na Índia, tanto os testes em animais para cosméticos quanto a venda de produtos que foram testados em outro lugar estão banidos, neste ano a empresa japonesa Shisei também anunciou a suspensão dos testes de cosméticos.

A *China Food and Drug Administration* (Administração de Comida e Drogas da China) em 2014 anunciou que cosméticos considerados comuns como xampus, cremes para uso superficial, sabonetes e produtos semelhantes não terão mais a necessidade de serem testados em animais, a empresa pode escolher testar ou não em animais para vender estes produtos na China, desde que eles tenham sido fabricados no país (HUANG, 2014). A Nova Zelândia é o primeiro país da Oceania a proibir a experimentação animal em produtos cosméticos, a *Animal Welfare Bill*, (Lei de bem estar animal) que foi aprovada em fevereiro de 2016 vai processar pessoas por crueldade animal e banir testes e pesquisas com animais. E

segundo Humane Society International (2015) diz também que todos os tipos de caça e captura de animais selvagens serão ilegais (CHAVES, 2015).

## **1.6 ASPECTOS LEGAIS SOBRE A EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL**

Em relação à proteção jurídica dos animais, no dia 10 de julho de 1934, o Decreto 24.645, entrou em vigor com a implantação do Estado Novo e veio introduzir no Brasil, pela primeira vez, normas de proteção animal. Mas não trata do assunto experimentação animal – vivissecção. Afirmava, no seu primeiro artigo, que “todos os animais existentes no país são tutelados pelo Estado”. O decreto considerava como maus tratos aos animais “praticar ato de abuso ou crueldade em qualquer animal”; “manter animais em lugares anti-higiênicos ou que lhes impeçam a respiração, o movimento ou o descanso, ou os privem de ar ou luz”; “golpear, ferir ou mutilar voluntariamente, qualquer órgão ou tecido de economia, exceto a castração, só para animais domésticos, ou operações outras praticadas em benefício exclusivo do animal e as exigidas para defesa do homem, ou no interesse da ciência”; “não dar morte rápida, livre de sofrimentos prolongados, a todo animal cujo extermínio seja necessário para consumo ou não”; “ministrar ensino a animais com maus tratos físicos”. De forma abrangente o decreto tentava regulamentar o transporte, a caça, o trabalho, a contenção e exposições de animais de grande porte em vários tipos de atividades (CORDEIRO, 2008)

Em 1941, o Decreto-lei 3.688 Lei das Contravenções Penais, em seu artigo 64, parágrafo único proibiu, expressamente a realização de experimentos com animais, ainda que para fins didáticos, quando houvesse métodos alternativos. Todas essas vedações da lei só eram passíveis de punição no campo penal, como contravenção, não havendo uma regulamentação para sua autorização ou fiscalização.

Esta situação permaneceu mesmo após a promulgação da Lei 6.638, de 8 de maio de 1979, hoje revogada, que veio estabelecer normas para a prática da vivissecção, mas ela nunca foi regulamentada, e tinha poucos artigos auto-aplicáveis (Dias, 2008).

Vale ressaltar que no âmbito internacional a Declaração Universal dos Direitos dos Animais, Bruxelas, em 1978, levando em consideração que todos os animais têm direitos e que o desconhecimento ou o desprezo desses tem levado e continua a levar o homem a violentá-los, declara em seus artigos 1º e 2º que todos os animais nascem iguais diante da vida e têm o mesmo direito à existência; Cada animal tem direito ao respeito. O homem, enquanto espécie animal, não pode atribuir-se o direito de exterminar outros animais ou explorá-los, violando

este direito. Ele tem o dever de colocar sua consciência a serviço de outros animais. Cada animal tem o direito à consideração e à proteção do homem (UNESCO, 1978).

No Brasil, de uma forma geral, o artigo 225 da Constituição Federal de 1988, caracteriza o meio ambiente como um bem fundamental à existência humana, que deve ser assegurado e protegido para o uso de todos, demonstrando a necessidade de proteção.

Posteriormente a estas, surgiu uma importante lei, a **Lei n.º 9.605 de 12 de fevereiro de 1998 Lei de Crimes Ambientais**, que denota que é um crime ambiental todo e qualquer dano ou prejuízo causado aos elementos que compõem o ambiente (flora, fauna, recursos naturais e o patrimônio cultural) e determina as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente. De acordo com esta lei, os crimes ambientais são classificados em cinco tipos diferentes: **Contra a fauna** (arts. 29 a 37), **Contra a flora** (art. 38 a 53), **Poluição e outros crimes ambientais** (art. 54 a 61), **Contra o ordenamento urbano e o patrimônio cultural** (art. 62 a 65).

Destacando os artigos 29 a 37, desta lei, que descrevem os crimes contra a fauna e o meio ambiente, caracterizando como agressões cometidas contra animais silvestres, nativos ou em rota migratória, como a caça, pesca, transporte e a comercialização sem autorização; os maus-tratos; a realização experiências dolorosas ou cruéis com animais quando existe outro meio, independente do fim. Também estão incluídas as agressões aos habitats naturais dos animais, como a modificação, danificação ou destruição de seu ninho, abrigo ou criadouro natural. A introdução de espécimes animal estrangeiras no país sem a devida autorização também é considerado crime ambiental, assim como a morte de espécimes devido à poluição (BRASIL, 1998).

O seguinte artigo, trata especificamente da necessidade de proteção aos animais e possíveis penalidades para aqueles que venham transgredi-lo, este passou a considerar a vivisseção crime na seguinte hipótese:

**Art. 32. Praticar ato de abuso, maus-tratos, ferir ou mutilar animais silvestres, domésticos ou domesticados, nativos ou exóticos:**

Pena - detenção, de três meses a um ano, e multa.

**§ 1º Incorre nas mesmas penas quem realiza experiência dolorosa ou cruel em animal vivo, ainda que para fins didáticos ou científicos, quando existirem recursos alternativos.**

§ 2º A pena é aumentada de um sexto a um terço, se ocorre morte do animal.

E no ano de 2008, após 13 anos de tramitação no Congresso Nacional, houve a aprovação da Lei Arouca (Lei nº 11.794 de 08 de outubro de 2008), cujo nome homenageia o médico, sanitarista e ex-presidente da Fiocruz Sergio Arouca, autor do projeto de lei. Esta lei estabelece em seus 6 capítulos um conjunto de regras para a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa científica, em todo o território nacional, a criação do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e a constituição de Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUAS), nas quais as instituições devem ter seus protocolos de pesquisas aprovados. Além disso, lista as condições de criação e uso dos animais e as 14 penalidades administrativas às instituições e pesquisadores que transgredirem as suas disposições e seu regulamento (BRASIL, 2008). Em seu art. 5º, a Lei Arouca impõe ao CONCEA a competência de “formular e zelar pelo cumprimento das normas relativas à utilização humanitária de animais com finalidade de ensino e pesquisa científica”, isso é, sempre que possível, reduzir o número de animais e evitar seu sofrimento. Também é de responsabilidade do CONCEA credenciar as instituições que fazem uso de cobaias para ensaios científicos; e estabelecer e averiguar, técnicas alternativas que possam substituir o uso de animais na pesquisa (OLIVEIRA, 2013). A partir de uma parceria entre a FIOCRUZ e a ANVISA, surge o BraCVAM em setembro de 2012, com o propósito de validar e coordenar estudos de substituição, redução ou refinamento do uso de animais em ensaios de laboratório (LANG, 2014).

### **1.7 AS ALTERNATIVAS AO TESTE DE IRRITAÇÃO OCULAR**

Diante deste cenário a ideia da criação de metodologias alternativas ao uso de animais vem sendo desenvolvida. Em 1876, na Grã-Bretanha, foi criada a primeira legislação para regulamentar a utilização de animais em experimentos científicos (STEPHENS, *et al.*, 2001), porém foi só a partir de 1959 com a publicação do Princípio dos 3R's ( Refine, Reduce e Replace) no livro “Princípios das Técnicas Experimentais Humanitárias” (*The principles of Humane Experimental Technique*) do zoólogo W.M.S. Russell e do microbiologista R.L. Burch, que o tema passou a ser foco de atenção da comunidade científica (CAZARIN, *et al.*, 2004).

- **Refine (refinamento)**, no sentido de diminuir a severidade dos procedimentos aplicados. Indica que se deve procurar minimizar ao máximo o desconforto e/ou



sofrimento animal (RUSSEL E BURCH, 1992 *apud* PAIXÃO, 2001). Neste sentido, a utilização de drogas anestésicas ou analgésicas é relevante (PATON, 1993).

- **Reduce (reduzir)** o número de animais usados no experimento, sem prejudicar a confiabilidade dos resultados; Indica também que além de reduzir deve-se, sempre que possível, incentivar uma “escolha correta das estratégias” (RUSSEL & BURCH, 1992 *apud* PAIXÃO, 2001).
- **Replace (substituir)** os animais, lançar mão de métodos alternativos ao uso de animais (RUSSEL E BURCH, 1959).

Nos anos que seguiram a publicação diversos acontecimentos nessa área decorreram, como é o caso da criação do fundo de substituição de animais em experimentos médicos (*Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments*– FRAME) em 1969, no Reino Unido, para promover junto à comunidade científica a ideia de métodos alternativos.

No entanto, foi nos anos 80 que a causa tomou grandes proporções, esse interesse se consolidou, as legislações passaram a aderir ao conceito dos “3R’s”, e, as pesquisas acerca de métodos alternativos aumentaram (ROWAN & ANDRUTIS, 1990).

Reduzir, refinar e substituir tornaram-se obrigações legais e morais, houve a fundação de diversas instituições, crescentes encontros e seminários sobre o tema (LARANJEIRA, 2015). As campanhas dos grupos de proteção nesta década representaram um impulso fundamental para que as alternativas invadissem o campo dos testes toxicológicos e retirassem das indústrias mais financiamento para testes de toxicologia *in vitro* (SINGER, 2004).

O papel das instâncias reguladoras entraria em destaque nos anos 90, com uma maior evidência no debate para a questão da “validação dos métodos alternativos” (HILL & STOKES, 1999 *apud* PAIXÃO, 2001).

Em consonância com o desenvolvimento e validação das alternativas ao teste de irritação ocular, grandes centros como: ECVAM, em Ispra na Itália, ICCVAM nos EUA, o JaCVAM no Japão, FRAME na Inglaterra, o ZEBET na Alemanha e o BRACVAM no Brasil, entre outros, foram criados para justamente atuarem neste meio, desenvolvendo e estabelecendo base de dados sobre métodos alternativos ao uso de animais; o fomento de projetos de pesquisa relacionados aos métodos alternativos e a cooperações com outras agências de fomento nacionais e internacionais e centros de validação; a coordenação de estudos

interlaboratoriais de validação; e por fim, a promoção de fóruns de discussão sobre métodos alternativos ao uso de animais (ABREU, 2008).

Como resultado deste esforço mundial no desenvolvimento/validação de metodologias alternativas, existe hoje um número considerável de ensaios validados e aceitos para fins regulatórios, quando comparados aos ensaios *in vivo* que pretendem substituir, pode-se destacar inúmeras vantagens. Em relação aos métodos alternativos e o teste de Draize pode-se citar como vantagens os seguintes aspectos:

- Citar as questões éticas que são bem definidas, a respeito da crítica que as metodologias *in vivo* sofrem, sendo os mais adequados para aplicar os princípios dos 3R's;
- Maior rapidez de respostas visto que não necessitam de longas durações como o teste *in vivo*, promovendo grande quantidade de teste em um curto período de tempo, aumentando a reprodutibilidade;
- Menor custo, pois não há mais necessidade de investir em biotérios, manutenção de animais (frequência de trocas, limpeza de caixas e gaiolas...) e infraestrutura do local (controle de temperatura, umidade, luminosidade, troca de ar...), bem como, o treinamento e atualização dos técnicos que manipulam esses animais (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2003), o que eleva muito o custo destes ensaios;
- e outro ponto positivo a destacar é a maior facilidade de disseminação para outros laboratórios de saúde pública, laboratórios centrais de Saúde Pública (LACENS), Laboratórios da Rede Brasileira de Laboratórios Analíticos em Saúde (REBLAS) e universidades, pois eliminam a necessidade de infraestrutura para a criação e manutenção de animais de experimentação.

Atualmente foram publicadas duas Resoluções Normativas, discriminadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), que estão formalmente validadas por centros internacionais de validação, seguindo o Guia 34, da OECD e que possuem aceitação regulatória internacional:

A RN N°18 (25/09/2014), que reconhece 17 métodos alternativos e a resolução N ° 31 publicado no dia 18/08/16, que reconhece mais 7 métodos alternativos. Segundo o parágrafo

único destas RN's, fica-se estabelecido o prazo de até 05 (cinco) anos como limite para a substituição obrigatória do método original pelo método alternativo.

**TABELA 4 - RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº 18, DE 24 DE SETEMBRO 2014**

| <b>ESPECÍFICO PARA:</b>   | <b>MÉTODO</b>  |
|---|--|
| <b>I - Para avaliação do potencial de irritação e corrosão da pele:</b> | <p>a) Método OECD TG 430 - Corrosão dérmica <i>in vitro</i>: Teste de Resistência Elétrica Transcutânea;</p> <p>b) Método OECD TG 431 - Corrosão dérmica <i>in vitro</i>: Teste da Epiderme Humana Reconstituída;</p> <p>c) Método OECD TG 435 - Teste de Barreira de Membrana <i>in vitro</i>; e</p> <p>d) Método OECD TG 439 - Teste de irritação Cutânea <i>in vitro</i>.</p> |
| <b>II - Para avaliação do potencial de irritação e corrosão ocular:</b> | <p>a) Método OECD TG 437 - Teste de Permeabilidade e Opacidade de Córnea Bovina;</p> <p>b) Método OECD TG 438 - Teste de Olho Isolado de Galinha; e</p> <p>c) Método OECD TG 460 - Teste de Permeação de Fluoresceína.</p>   |

|   |   |
|---|---|
| <b>III - Para avaliação do potencial de Fototoxicidade:</b>       | a) Método OECD TG 432 - Teste de Fototoxicidade <i>in vitro</i> 3T3 NRU.  |
| <b>IV - Para avaliação da absorção cutânea:</b>                   | a) Método OECD TG 428 - Absorção Cutânea método <i>in vitro</i> .   |
| <b>V - Para avaliação do potencial de sensibilização cutânea:</b> | a) Método OECD TG 429 - Sensibilização Cutânea: Ensaio do Linfonodo Local;<br>e<br>b) Método OECD TG 442A e 442B - Versões não radioativas do Ensaio do Linfonodo Local.  |
| <b>VI - Para avaliação de toxicidade aguda:</b>                   | a) Método OECD TG 420 - Toxicidade Aguda Oral - Procedimento de Doses Fixas;<br>b) Método OECD TG 423 - Toxicidade Aguda Oral - Classe Tóxica Aguda;<br>c) Método OECD TG 425 - Toxicidade Aguda Oral - procedimento "Upand Down"; e<br>d) Método OECD TG 129 - estimativa da dose inicial para teste de toxicidade aguda oral sistêmica. |

|  |  |
|--|--|
| <b>VII - Para avaliação de genotoxicidade:</b> | a) Método OECD TG 487 - Teste do Micronúcleo em Célula de Mamífero <i>in vitro</i> . |
|--|--|

Nesta RN, o CONCEA reconhece os 17 métodos alternativos agrupados nos 07 (sete) desfechos apresentados.

Fonte: Diário Oficial da União- Seção 1- Nº 185, 25/09/14.

**TABELA 5- RESOLUÇÃO NORMATIVA CONCEA Nº 31 , DE 18/08/2016**

| <b>ESPECÍFICO PARA:</b>   | <b>MÉTODO</b>  |
|---|--|
| <b>I - Avaliação do potencial de irritação e corrosão ocular:</b> | a) Método OECD TG 491 - Teste <i>in vitro</i> de curta duração para danos oculares;<br>b) Método OECD TG 492 - Epitélio corneal humano reconstruído; |
| <b>II - Avaliação do potencial de sensibilização cutânea:</b>     | a) Método OECD TG 442C - Sensibilização cutânea <i>in chemico</i> ;<br>b) Método OECD TG 442D - Sensibilização cutânea <i>in vitro</i> ;             |

|   |   |
|---|---|
| <p><b>III - avaliação de toxicidade reprodutiva:</b></p>                        | <p>a) Método OECD TG 421 - Teste de triagem para toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento;</p> <p>b) Método OECD TG 422 - Estudo de toxicidade repetida combinado com teste de toxicidade reprodutiva; e</p> |
| <p><b>IV - Avaliação da contaminação pirogênica em produtos injetáveis:</b></p> | <p>a) Teste de Endotoxina Bacteriana (Farmacopeia Brasileira).</p>  |

Nesta RN, o CONCEA reconhece os 07 métodos alternativos agrupados nos 04 (quatro) desfechos apresentados.

Fonte: Diário Oficial da União- Seção 1- Nº 160, 19/08/16

### **1.8 OS MÉTODOS ALTERNATIVOS AO TESTE DE IRRITAÇÃO OCULAR (TESTE DE DRAIZE)**

Muitos métodos são considerados válidos, mas poucos são completamente validados (MITJANS *et al.*,2008). Os métodos válidos são aqueles que não passaram, necessariamente, por um processo completo de validação, mas existe uma quantidade suficiente de dados científicos para mostrar sua relevância e confiabilidade (PAUWELS & ROGIERS, 2004), como por exemplo: HET-CAM, CAM-TBS, IRE, RBC, NRU, QPT e MTT. Este não possui um reconhecimento oficial, isto é, não pode ser usado para fins regulatórios, entretanto, ele pode ser utilizado em pesquisas básicas. Pode ocorrer de um determinado país reconhecer internamente um método válido, com uma finalidade definida, por exemplo, como *screening* para estudos, mas, estes devem sempre ter seus resultados baseados em métodos validados . Isto significa dizer que são métodos ainda em estudo, entretanto, passíveis de serem usados, ou seja, com grande possibilidade de virem a ser validados (PRESGRAVE, 2012; 2009a). Enquanto que os métodos validados, como por exemplo: BCOP,ICE, FL, Teste in vitro de curta duração para danos oculares e Epitélio corneal humano reconstruído, são aqueles para os

quais a relevância e a confiabilidade estão estabelecidas para um propósito particular, de acordo com critérios estabelecidos (PAUWELS & ROGIERS, 2004). Dessa forma, um método validado é aquele que já passou por estudo colaborativo e tem sua metodologia e seus critérios bem definidos e prontos para serem aceitos oficialmente (PRESGRAVE,2009). Conforme Decreto 6.899/09, que regulamenta a Lei 11.794/2008, os métodos alternativos são “procedimentos validados e internacionalmente aceitos que garantam resultados semelhantes e com reprodutibilidade para atingir, sempre que possível, a mesma meta dos procedimentos substituídos por metodologias que: não utilizem animais; usem espécies de ordens inferiores; empreguem menor número de animais; utilizem sistemas orgânicos ex vivos; ou diminuam ou eliminem o desconforto”.

### **MÉTODOS ALTERNATIVOS**

- **Método OECD TG 437- BCOP** (*Bovine Cornea Opacity Permeability*) Teste de Opacidade Corneal Bovina;
- **Método OECD TG 438- ICE** (*Isolated Chiken Eye*) Teste Olho Isolado de Galinha;
- **Método OECD TG 460-FL** (*Fluorescein Leakage*) Teste de Extravasamento de Fluresceína;
- **Método OECD TG 491- STE** (*Short Time Exposure In Vitro Test Method for Identifying*) Teste *in vitro* de curta duração para danos oculares;
- **Método OECD TG 492 - RhCE** (*Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method*) Epitélio corneal humano reconstruído;
- **HET-CAM** (*Hen's Egg Test Chorionallantoic Membrane*) Teste da Membrana Córion-Alantóide de Ovo Embrionado de Galinha (LUPKE *et al.*,1985);
- **CAM-TBS** (*Chorionallantoic Membrane - Trypan Blue Stainin*) Teste de Coloração com Azul de Tripán da Membrana Córion-alantóide (HAGINO *et al.*, 1991; ITAKI *et al.*, 1996);
- **IRE** (*Test in eye of rabbit*), Teste em olho isolado de coelho ( DE TORRES *et al.*,1997);
- **RBC** (*Red Blood Cell*) ensaio de citotoxicidade como o teste de hemólise (PAPE *et al.*, 1999);
- **NRU** (*Neutral Red Uptake*), Células 3t3 com NRU ou ensaio de captação do vermelho neutro (VIAN *et al.*, 1995);

- **QPT** (Total protein quantification assay) ensaio de quantificação de proteínas totais e **MTT** (Tetrazolium dye uptake assay or Assay of mitochondrial metabolic activity) Ensaio de captação do corante Tetrazolium ou ensaio da atividade metabólica mitocondrial (CHIBA *et al.*, 1999).

## **1.9 PROPOSTA ATUAL**

A proposta das indústrias e do meio científico é justamente utilizar uma bateria de testes, com os métodos alternativos, que ofereçam subsídios para garantir a segurança do produto ao nível ocular, que apresentem respostas equivalentes ao uso animal. Que possa gerar dados relacionados à vascularização, opacidade/permeabilização e citotoxicidade, que possibilite a criação de um sistema hierárquico no qual os animais somente sejam utilizados para a confirmação da ausência de toxicidade, reduzindo ao máximo o risco desses animais sofrerem quaisquer efeitos tóxico. Sendo proposta inicialmente no ano de 2005, em que foi realizada uma reunião com mais de trinta cientistas, Academia, governo, organizações sem fins lucrativos, indústria privada (Incluindo laboratórios de teste contratados), bem como a validação internacional, Peritos e reguladores se reuniram em Ispra, na Itália, para compartilhar os métodos de teste de irritação ocular *in vitro* (SCOTT *et al.*, 2010). Os objetivos deste encontro também foram:

- Obter *in vitro* as indicações ao método de teste de irritação ocular, dados de suporte, para um domínio (s) de aplicabilidade específico;
- Esclarecer como cada método nomeado está sendo usado atualmente;
- Identificar parceiros para o progresso de métodos de teste promissores para validação;
- Identificar lacunas para focalizar futuras pesquisas e desenvolvimento de métodos;
- Propor estratégias ou abordagens de teste *in vitro* que possam ser desenvolvidas para validação pelo ECVAM no seu esforços para reduzir e, finalmente, substituir o uso de animais para irritação ocular...



Em 2009, Scott e colaboradores, publicaram uma possível abordagem da utilização da bateria, promovendo uma estratégia de teste que poderia ser desenvolvida e validada, conhecida como “Bottom–Up and Top–Down Approach” (FIG.5)

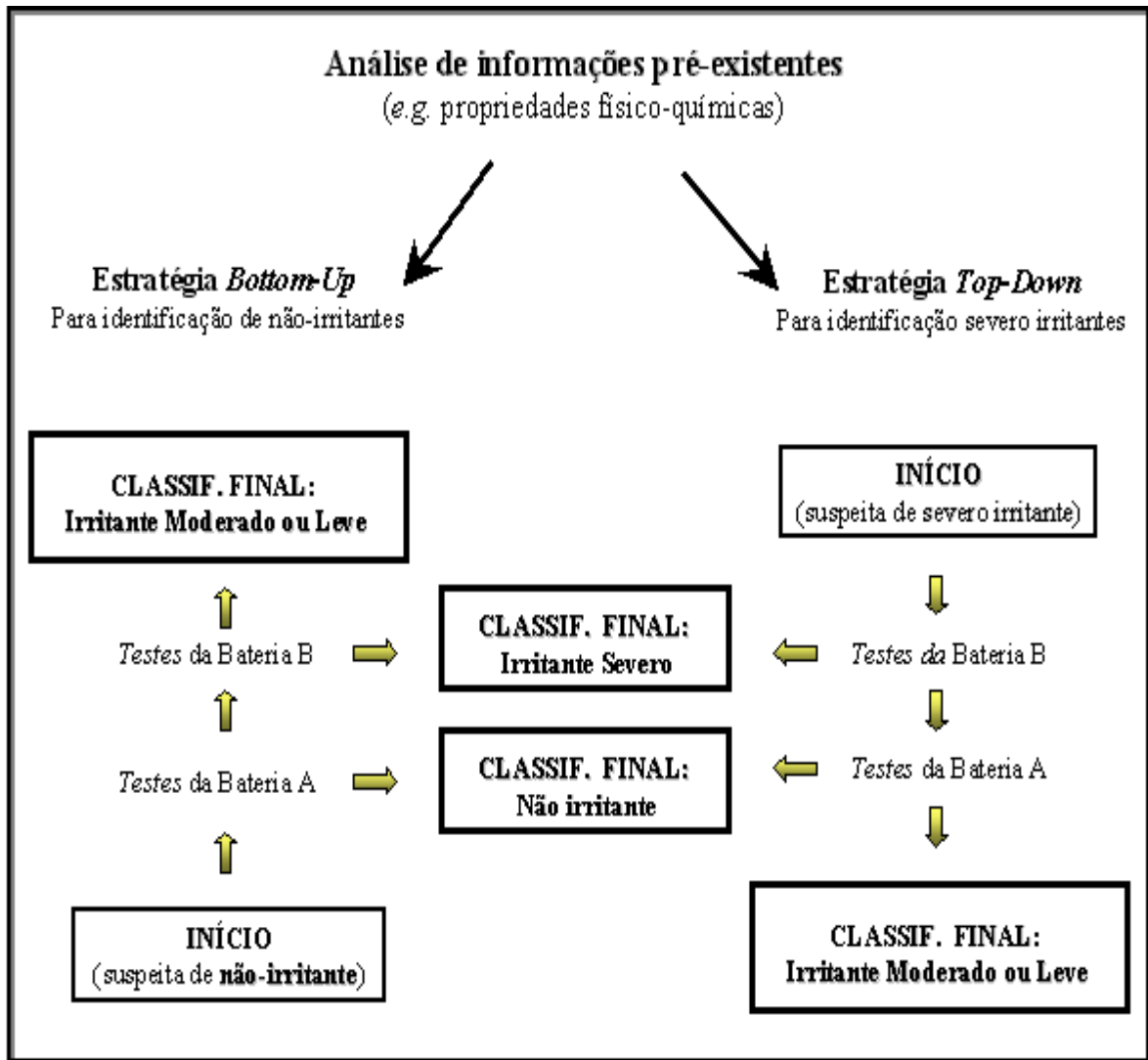


FIG 5 : Estratégia Bottom-Up e Top-Down, estratégia de teste in vitro de irritação ocular.

Esta é uma abordagem geral recomendada como uma estratégia de identificação e rotulagem dos perigos em conformidade com o anexo V da Directiva 67/548 / CEE. Neste, a aplicabilidade de um método de teste baseia-se na gama de gravidade da irritação para a qual resultados confiáveis e relevantes podem ser demonstrados.

Para utilizar a abordagem Bottom-Up, espera-se que o material de teste seja não irritante a baixo potencial irritante ocular, se o produto ou substancia testada resultar na avaliação esperada, logo na primeira bateria de teste, a classificaria como não irritante, caso apresente algum tipo de resposta, que denuncie uma possível irritação, esta seguiria para próxima bateria, onde a classificaria como irritante leve, moderado ou severo. Em contraste, os materiais de teste estimados para ter elevado potencial de irritação ocular iniciará a abordagem Top-Down, em que se o produto ou substancia testada resultar na avaliação esperada, logo na primeira bateria de teste, esta será classificada como Irritante Severo, todavia, caso não apresente algum tipo de resposta positiva para irritação, esta seguirá para próxima bateria para verificar se a amostra apresentará uma resposta como irritante leve, moderado ou não irritante (FIG 5).

Com base nesta estratégia os participantes também identificaram a colocação potencial mais adequada para cada método utilizado, de acordo com a profundidade da lesão da córnea. A colocação do método de ensaio proposto servirá de ponto de partida para orientar os esforços do ECVAM, em colaboração com o (s) patrocinador (es) de teste, para avaliar e, finalmente, validar métodos de ensaio *in vitro* viáveis e relevantes, úteis para o domínio de aplicabilidade proposto ou alternativo de acordo com a estratégia de teste proposta.

Para implementar esta abordagem, é importante ressaltar que as autoridades de regulamentação competentes devem aceitar a validade científica dos ensaios capazes de identificar o potencial irritantes das amostras a serem testadas. Ao aceitar que alguns ensaios são capazes de identificar os resultados negativos não se utilizará, desnecessariamente um animal para a confirmação dos resultados (Scott *et al* 2010).

## 2- OBJETIVO

- Elaborar uma revisão bibliográfica sobre os métodos alternativos ao teste de irritação ocular, teste de Draize, demonstrando as metodologias alternativas existentes atualmente no mercado mundial utilizadas para avaliação toxicológica de segurança de produtos;
- Demonstrar os métodos válidos e validados;
- Fomentar a reflexão acerca de valores éticos sobre a preservação da vida animal.

## 3- MATERIAL E MÉTODOS

Para o desenvolvimento deste trabalho, foi realizada uma revisão de literatura em artigos científicos e sites consagrados nacionais e internacionais que tratam do assunto. Foram levantados dados bibliográficos sobre os principais métodos alternativos existentes atualmente que substituem o uso de animais vivos na pesquisa científica.

A literatura consultada abrange desde as primeiras leis elaboradas a proteção ambiental/animal, a consolidação do teste de irritação ocular, teste de DRAIZE a atualidade sobre este métodos e os testes alternativos a este. As publicações analisadas se encontram na língua inglesa e/ou portuguesa. A busca foi realizada em bases de dados de Websites ,de Centros de 3Rs, de busca, redes de pesquisa, agencias reguladoras, instituições, guias de testes, portais...

Dentre eles:

- **PubMed** (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> );
- **Scielo** (<http://www.scielo.org/php/index.php>);
- **ECVAM** (<https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/>);
- **ICVAM** (<https://ntp.niehs.nih.gov/pubhealth/evalatm/iccvam/index.html> ) ;
- **JaCVAM** (<http://www.jacvam.jp/en/index.html>);
- **NC3Rs** (<https://www.nc3rs.org.uk/>);
- **BRACVAM**  
([https://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com\\_content&view=article&id=1188&Itemid=214](https://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=1188&Itemid=214));
- **Google acadêmico** (<https://scholar.google.com.br/>);

- **RENAME** (<http://renama.org.br/>);
- **OECD** (<http://www.oecd.org/>);
- **EPA** (<https://www.epa.gov/aboutepa>);
- **CAPES**- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (<http://www.capes.gov.br/>);
- **ANVISA** (<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home>);
- **FIOCRUZ** (<https://portal.fiocruz.br/pt-br>);
- **INCQS** (<https://www.incqs.fiocruz.br/>).
- **HSI (Humane Society International)**  
(<http://www.hsi.org/e> <http://www.hsi.org.au/> )

Os critérios de inclusão para os possíveis estudos encontrados foi Websites e a literatura publicada em âmbito nacional e internacional com as seguintes palavras-chave: teste de DRAIZE, métodos alternativos, testes em animais, Irritação ocular, 3Rs, Ensaio biológicos, avaliação de segurança, (BCOP) Teste de Opacidade Corneal Bovina, (ICE) Teste Olho Isolado de Galinha, (FL) Teste de Extravasamento de Fluresceína, Teste *in vitro* de curta duração para danos oculares, (RhCE) Epitélio corneal humano reconstruído, (HET-CAM) Teste da Membrana Córion-Alantóide de Ovo Embrionado de Galinha, (BCOP) Teste de Coloração com Azul de Tripán da Membrana Córion-alantóide, (IRE) Teste em olho isolado de coelho, (RBC) ensaio de citotoxicidade como o teste de hemólise, (NRU) Células 3t3 com NRU ou ensaio de captação do vermelho neutro, (QPT) ensaio de quantificação de proteínas totais e MTT, captação de MTT ou ensaio da atividade metabólica mitocondrial.

**Keywords:** Draize test, *alternative methods, animal testing, eye irritation, 3Rs*, Biological tests, Safety assessment, *Bovine Cornea Opacity Permeability*, Isolated Chicken Eye, Flurescein Leakage, Short Time Exposure In Vitro Test Method for Identifying, Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method, *Hen's Egg Test Chorionallantoic Membrane, Chorionallantoic Membrane - Trypan Blue Stainin*, Test in eye of rabbit, Red Blood Cell, Neutral Red Uptake, Total protein quantification assay and Tetrazolium dye uptake assay or Assay of mitochondrial metabolic activity.

#### 4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

René descartes afirmava que os animais não tinham alma, eram autômatas e, portanto, incapazes de sentir ou de sofrer. Entretanto, Fergusson já demonstrava preocupação com os métodos bárbaros utilizados em testes em animais e no século XIX Jeremy Bentham lançou a máxima “a questão não é se os animais raciocinam, ou se eles podem falar, mas se eles sofrem”.

Pensamentos contraditórios, todavia, muito importantes e cabíveis para iniciar esta discussão, visto que há tempos estamos vivendo neste embate.

Quando trata-se de avaliação da toxicidade de uma substância é necessário verificar os efeitos nocivos que a mesma pode desencadear aos homens, animais e ambiente após exposição, logo foi incontestável a necessidade de desenvolver testes que utilizasse animais para prever os graus de irritação dos produtos, devido a inúmeras tragédias que aconteciam pela falta destes teste. Neste cenário, o teste de irritação ocular, teste de Draize, surgiu, um teste que mesmo causando dor e desconforto nos coelhos, sendo fortemente criticado, continua sendo utilizado oficialmente por diversos órgãos oficiais, bem como pelas indústrias no desenvolvimento de novas fórmulas de avaliar a segurança de seus produtos. Diante desta situação, muitas leis, comitês, códigos de ética, princípios (3Rs), instituições nacionais e internacionais e a organização para cooperação e Desenvolvimento econômico, foram criadas para proteger, regular e desenvolver os métodos alternativos a experimentação investigativa e toxicológica em animais.

Assim como muitos pesquisadores e a comunidade científica nacional e internacional têm somado investimentos e esforços no desenvolvimento e validação de métodos alternativos ao uso de animais e com o passar dos anos, métodos foram surgindo e seus protocolos foram aprimorados, as técnicas se refinaram.

Vale destacar que mesmo os testes BCOP, ICE e IRE utilizarem córneas isoladas de animais, estes são adquiridos após serem abatidos para fins comerciais, evitando o uso de animais de laboratório.

Como os testes em animais não podem ser substituídos por um único método alternativo, acredita-se que o desenvolvimento de um esquema de avaliação que envolva uma bateria de testes deve ser levado em consideração, podendo também ser desenvolvido um sistema hierárquico no qual os animais somente sejam utilizados para a confirmação da ausência de toxicidade, reduzindo ao máximo o risco desses animais sofrerem quaisquer efeitos tóxicos. Estas condições implicam em um enorme desafio para as indústrias de

cosméticos e para a comunidade científica envolvida na questão (Pauwels & Rogiers, 2004; CORRADO, 2007)

O levantamento bibliográfico demonstra que os testes existentes atualmente validados são: Teste *in vitro* de curta duração para danos oculares, Epitélio corneal humano reconstruído, BCOP, ICE e FL e os que são válidos: HET-CAM, CAM-TBS, IRE, RBC, NRU, QPT e MTT. Entretanto, ainda há a necessidade de se estudar a aplicação de alguns métodos alternativos para comprovação de eficácia e segurança com caráter regulatório.

Muitas das diretrizes dos métodos validados, mencionam que atualmente, é aceito que, num futuro previsível, nenhum teste *in vitro* único de irritação ocular poderá substituir o teste ocular *in vivo* para prever a gama completa de irritação para diferentes classes químicas. No entanto, combinações estratégicas de vários métodos, alternativos dentro de uma estratégia de teste (uma bateria), podem ser capazes de substituir o teste de olho *in vivo*, como por exemplo a abordagem Top-Down e Bottom-up, visto que ambas utilizam como base as informações existentes sobre os ensaios e as possíveis reações de uma amostra, de acordo com seu potencial de irritação, para iniciar uma dessas abordagens.

Vale ressaltar que cada ensaio apresenta uma especificidade, sensível a detectar os possíveis danos às estruturas oculares, que ao reuni-los em uma bateria poderia reduzir e até mesmo substituir o uso do animal, esta consiste em um conjunto de métodos *in vitro*, os discutidos neste trabalho, agrupados de forma que ofereçam subsídios para garantir a segurança do produto a nível ocular. Como há mais de um mecanismo de irritação ocular apenas um ensaio *in vitro* não é suficiente para uma completa avaliação. O ideal é obtermos dados relacionados à vascularização (HET-CAM, CAM-TBS), opacidade / permeabilização (BCOP) e citotoxicidade (MTT, RBC). Destaca-se também que o ensaio de curta duração para danos oculares e o epitélio humano reconstituídos são testes promissores para ser incluídos na bateria, visto que caracterizam amostras líquidas, sólidas e aerossóis, que apresentam coloração e sua classificação é mais abrangente.

Verifica-se que mesmo que muitas alternativas não estejam validadas e sejam incapazes de substituir o uso de animais, certamente estas podem contribuir para reduzir os experimentos e também o sofrimento animal,

Esta proposta surgiu desde a década de 90 e a busca continua até nos dias atuais para alcançar os 3Rs tão almejados no meio científico e popular, desta forma todos ficam satisfeitos, os consumidores dos produtos que apresentam segurança toxicológica, o meio científico e

popular, que em um futuro próximo deixarão de usar animais em pesquisas, testes para irritação ocular.

É importante mencionar que não cabem discussões por parte de protectionistas e cientistas. É necessário que ambas as partes discutam seus pontos de vista e possibilidades de estudos. É preciso que cada um compreenda e respeite o prisma com que o outro olha e entende o tema. Essas discussões têm de ocorrer sob uma atmosfera técnica e científica, jamais em clima fundamentalista ou radical.

Os produtos que são lançados para utilização devem apresentar segurança toxicológica para todos e se há métodos que garantam esse objetivo pode-se utiliza-lo, caso contrário a utilização de animais ainda é válida e recomendada, é claro que dentro do princípio dos 3Rs.

Não devemos deixar de usar os animais somente porque assim queremos, sem que estejamos certos de que os ensaios utilizados nessa substituição refletem os efeitos que realmente estamos estudando (Presgrave, 2002). A busca continua e pesquisadores e o meio científico estão empenhados nesse embate, para isto deve-se conhecer os métodos e suas aplicabilidades, a seguir todos os métodos alternativos ao Teste de Draize, válidos e validados, estão dispostos em diversas tabelas.

---

## **TESTE DE DRAIZE**

---

### **Princípio do método:**

---

Utiliza-se 5 coelhos da raça nova Zelândia, machos ou fêmeas, hígidos e de peso corpóreo acima de 2Kg. O teste consiste na aplicação única de 100 uL ou 100 mg do produto no saco conjuntival de coelhos, com observações da evolução das lesões em 24, 48, 72 horas e 7 dias após a instilação, para avaliar as alterações que podem ocorrer nas estruturas do olho (córnea, íris e conjuntiva) e calcular a média dos escores máximos por substancia analisada. São graduadas as alterações de conjuntiva (secreção, hiperemia e quimose), íris (irite) e córnea (densidade e área de opacidade). Permite as seguintes classificações: não irritante (NI), irritante leve (IL), irritante moderado (IM), irritante severo (IS) e irritante máximo (IM) ( Draize et al 1944, Kay et al 1962)

---

### **Situação regulatória atual: (OECD 405/2012)**

---

Aceito pelas agências regulatórias mundiais (Vinardell & Mitians, 2008.,Nigan, 2009).

---

### **Vantagens:**

---

Procedimento padrão universal, aceito pelos órgãos oficiais para fins regulatórios, para avaliação da irritação ocular e o potencial de riscos de substancias químicas.

---

### **Desvantagens:**

---

Sofre diversas críticas devido à utilização animal na experimentação.

Muitos alegam que é um teste de extrema crueldade, que causa dor e desconforto para os coelhos.

Apresenta limitações (diferenças consideráveis do olho do coelho e do ser humano).

Subjetividade na sua resposta. Alto custo dos experimentos e da gestão dos biotérios (centros de criação de animais de experimentação), pois estes animais precisam de tratamento especial, como ser acondicionados, alimentados e mantidos nas melhores condições de saúde e higiene possível, caso contrário não podem ser usados para propósitos científicos (Office of Technology Assessment, 1986).

---



---

**BCOP**

---

**Princípio do método:**

---

O objetivo do ensaio é avaliar quantitativamente o potencial irritante de um produto ou de uma substância química após aplicação sobre a córnea isolada de boi. O ensaio é baseado na medida da opacidade e da permeabilidade da córnea após o contato com o produto-teste.

O teste é rápido, apresenta boa predição do grau de irritação ocular de uma grande variedade de substâncias e se mostra como uma alternativa confiável ao método *in vivo* (teste de irritação ocular de Draize) (PRICE & ANDREWS, 1985).

---

**Situação regulatória atual:**

---

Método Validado (OECD TG 437)

---

**Vantagens:**

---

Identifica substâncias ou produtos que apresente um alto potencial irritante, grave a corrosivo ocular (OECD TG 437).

---

**Desvantagens:**

---

O opacitômetro OP-KIT apresenta algumas limitações, não demonstra resultados satisfatórios quando o grau de intensidade de irritação da amostra é inferior ao irritante corrosivo.

Mas um novo opacitômetro baseado em luz laser (LLBO) para permitir a análise do Superfície corneana completa e avaliar suas características óticas foi desenvolvido, todavia não atinge essa limitação (Vertraelen et al 2013).

Fornecedores e tempo de transporte.

Não é tão sensível na distinção entre irritantes leves e moderados.

A distância dos abatedouros, que fornecem as córneas, dos laboratórios.

---

---

**ICE**

---

**Princípio do método:**

---

O método de teste de Olho de Galinha Isolado (ICE) é um método de teste *in vitro* que pode ser usado para classificar substâncias como "corrosivos oculares e irritantes graves". O método ICE utiliza os olhos coletados de galinhas obtidos de matadouros onde são mortos para consumo humano, eliminando assim, a necessidade de animais de laboratório.

Os efeitos tóxicos para a córnea são medidos por uma avaliação qualitativa da opacidade, uma avaliação qualitativa do dano ao epitélio com base na retenção de fluoresceína, uma medida quantitativa do aumento da espessura (inchaço) e uma avaliação qualitativa do dano morfológico macroscópico à superfície (OECD TG 438).

---

**Situação regulatória atual:**

---

Método Validado (OECD TG 438).

---

**Vantagens:**

---

O teste abrange amostras líquidas, pastas, géis, tensoativos e avalia o potencial de irritação e corrosivo ocular.

---

**Desvantagens:**

---

Limitação para sólidos e dificuldade de obter fornecedores, assim como a distância dos abatedouros dos laboratórios também é um fator a ser considerado .

---

---

**IRE**

---

**Princípio do método:**

---

Assim como o BCOP e ICE, que utilizam órgão isolados, este utiliza olhos de coelho isolados. Animais eutanasiados, utilizados para outros fins, tais como uma fonte de alimento. (Barile, 2010).

Neste método as substâncias candidatas são aplicadas na córnea de olhos de coelho enucleados, de uma maneira similar ao teste ICE, em seguida realiza uma análise quantitativa dos efeitos das substâncias de ensaio na córnea, verificando o aumento da espessura (inchaço), opacidade e penetração da fluoresceína, bem como alterações morfológicas do epitélio corneano.

---

**Situação regulatória atual:**

---

Método Válido

---

**Vantagens:**

---

Protocolo padronizado aceito para a detecção de corrosivos oculares e irritantes graves.

---

**Desvantagens:**

---

Apresenta limitações para amostras sólidas.

Mesmo sendo adequado para detectar amostras com potencial irritante ocular grave e corrosivo, devido apresentar taxas de precisão, falsas e negativas (35% a 40%), o ICCVAM não recomendou o método de rastreio e identificação de corrosivos oculares, irritantes graves ou para distinguir não irritantes de irritantes leves (ICCVAM, 2009; ICCVAM 06-4511, 2006).

---

---

## TESTE *IN VITRO* DE CURTA DURAÇÃO

---

### Princípio do método:

---

O método de ensaio de curta duração (STE) é um método *in vitro* que pode ser utilizado sob certas circunstâncias e com limitações específicas para a classificação e rotulagem de produtos químicos (substâncias e misturas) que induzem danos oculares graves, bem como aqueles que não requerem classificação para lesões oculares graves ou irritação ocular, conforme definido pelo Sistema Harmonizado Globalmente das Nações Unidas e Classificação e Rotulagem de Substâncias Químicas.

Um ensaio *in vitro* baseado em citotoxicidade que é realizado numa monocamada confluyente de células Statens Seruminstitut Cornea de Coelho (SIRC), cultivadas numa microplaca de policarbonato de 96 poços. Após cinco minutos de exposição a um produto químico de teste, a citotoxicidade é medida quantitativamente como a viabilidade relativa das células SIRC utilizando o ensaio de MTT.

A diminuição da viabilidade celular é utilizada para prever potenciais efeitos adversos que levam a lesões oculares, sendo avaliada pela medição quantitativa, após extração das células, do sal de formazano azul produzido pelas células vivas por conversão enzimática do corante vital MTT. A viabilidade celular obtida é comparada com o controle do solvente (viabilidade relativa) e utilizada para estimar o potencial risco ocular do produto químico de teste.

---

### Situação regulatória atual:

---

Método validado (OECD 491 /2015)

---

### Vantagens:

---

Na sua guia de diretriz este apresentou uma precisão global de 85% (110/130), uma falsa taxa negativa de 12% (9/73) e uma taxa de falso positivo de 19% (11/57) em comparação com o teste de Draize. Foi relatado que 80% de uma solução caída no olho de um coelho é excretada através do saco conjuntival dentro de três a quatro minutos, enquanto que mais de 80% de uma solução caiam. O olho humano é excretado dentro de um a dois minutos. O método de ensaio STE tenta aproximar estes tempo de exposição e faz uso da citotoxicidade como ponto

final para avaliar a extensão do dano às células SIRC Após uma exposição de cinco minutos ao produto químico de teste.

Este ensaio abrange amostras líquidas, sólidas e aerossóis, que apresentam coloração e possui uma classificação mais abrangente. (OECD 491 /2015)

---

**Desvantagens:**

---

Não é adequado para caracterizar amostras que apresente grau de irritação leve e para produtos químicos que são insolúveis ou não podem ser suspensos pelo menos 5 minutos em soro fisiológico

---

---

## RhCE

---

### Princípio do método

---

A diretriz deste teste baseia-se numa construção comercial de tecido RTCE tridimensional que é produzida utilizando queratinócitos epidérmicos humanos primários, isto é, EpiOcular™, SkinEthic™ (O método de teste SkinEthic™ HCE envolve dois procedimentos de tratamento do tempo de exposição- uma para exposição de curta duração (10 min - SE) e outra para exposição de longa duração (60 min - LE)

O epitélio corneano humano reconstruído (RhCE) imita de perto as propriedades histológicas, morfológicas, bioquímicas e fisiológicas do epitélio corneano humano. O teste avalia a capacidade de um produto químico de teste induzir citotoxicidade numa construção de tecido de RhCE, medida pelo ensaio de MTT. A amostragem de teste é aplicada topicamente a um mínimo de dois tecidos tridimensionais de RhCE e a viabilidade do tecido é determinada em comparação com os tecidos tratados com a substância de controle negativo e é então utilizada para prever o potencial de perigo ocular do produto químico de teste.

Construções e viabilidade do tecido é medida após a exposição e um período de incubação pós-tratamento. Os tecidos de RhCE são reconstruídos a partir de células humanas primárias, que foram cultivadas (OECD 492/ 2015).

---

### Situação regulatória atual:

---

Método Validado (OECD 492/ 2015)

---

### Vantagens:

---

É aplicável às substâncias e misturas, bem como aos líquidos (aquoso ou não aquoso), aos semi-sólidos, sólidos (solúveis ou insolúveis em água, que sempre que possível, devem ser triturados num pó fino antes da aplicação), cera e produtos que apresentem algum tipo de coloração e aerossóis.

Alta reprodutibilidade entre laboratórios (OECD 492).

---

### Desvantagens:

---

Dados não encontrados, apenas uma limitação que acontece no Brasil, pois os tecidos SkinEthic™ são propriedade da L'Oréal, que os desenvolve, limitando o fornecimento deste material para os laboratórios nacionais (OECD 492)

---

---

**FL**

---

**Princípio do método:**

---

É um método de ensaio *in vitro* que pode ser utilizado sob certas circunstâncias e com limitações específicas para classificar os produtos químicos (substâncias e misturas) como corrosivos oculares e irritantes graves, tal como definidos pela Organização das Nações Unidas Sistema Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Substâncias Químicas. A substância de ensaio é aplicada à camada confluenta de células cultivadas no lado apical do inserto. Uma exposição curta de 1 minuto é rotineiramente utilizada para reflectir a taxa de depuração normal em exposições humanas.

A substância de teste é então removida e o corante fluorescente de sódio não tóxico e altamente fluorescente é adicionado ao lado apical da monocamada durante 30 minutos. Neste método os efeitos tóxicos após um curto tempo de exposição à substância de teste são medidos por um aumento na permeabilidade da fluoresceína de sódio através da monocamada epitelial de células de rim canino Madin-Darby (MDCK) cultivadas em insertos permeáveis. A quantidade de fuga de fluoresceína que ocorre é proporcional aos danos induzidos por produtos químicos nas junções apertadas, junções desmosómicas e membranas celulares e pode ser usada para estimar o potencial de toxicidade ocular de uma substância de teste.

---

**Situação regulatória atual:**

---

Método Validado (OECD 460 /2012)

---

**Vantagens:**

---

Recomendado como um passo inicial dentro de uma abordagem Top-Down para identificar corrosivos oculares / irritantes graves, especificamente para tipos limitados de produtos químicos (ou seja, substâncias e misturas solúveis em água).

Devido ao curto período de exposição às substâncias à base de água e misturas podem ser testadas puras, se puderem ser facilmente removidas após o período de exposição, isso permite comparações mais diretas dos resultados com os efeitos químicos em seres humanos.

---

**Desvantagens:**

---

O método de ensaio FL não é recomendado para a identificação de produtos químicos que devem ser classificados como irritantes leves / moderados e não é adequado para previsão de substância de teste colorida e viscosa, pois ambos os tipos de produtos químicos são difíceis de remover da monocamada após o curto período de exposição e que a previsibilidade do método de ensaio poderia ser melhorada se fosse utilizado um número mais elevado de passos de lavagem.

---



---

## **RBC**

---

### **Princípio do método:**

---

É um teste simples, no qual utilizam-se hemácias de mamíferos, sendo caracterizado por “endpoints” definidos e objetivos (hemólise e desnaturação), usando como indicador desses fenômenos a oxiemoglobina. Desenvolvido por WOLFGANG et al., (1987) o ensaio avaliava somente o fenômeno de hemólise, frente a uma substância-teste. Em 1990, estes autores o padronizaram em termos de estimar o potencial de irritação de tensoativos e produtos que os contenham (xampus, sabonetes, produtos de limpeza, etc.) com modificação na metodologia, isto é, avaliando não só o dano causado na membrana celular dos eritrócitos (hemólise), mas também os danos causados nas proteínas celulares liberadas (desnaturação), que podem ser sensivelmente detectados pela mudança na absorbância da oxiemoglobina, indicador de ambos os processos ( WOLFGANG et al., 1990).

---

### **Situação regulatória atual:**

---

É um método válido.

---

### **Vantagens:**

---

O ensaio é rápido, barato, não requer equipamento especial e necessita somente de 1 hora por amostra (WOLFGANG et al., 1987, 1990);

Capaz de prever, com elevado nível de precisão (96%), a irritabilidade ocular de produtos cosméticos, cuja formulação contenha tensoativos, isto possibilita a seleção, e conseqüente exclusão de produtos de elevado poder tóxico, na eventualidade do emprego prévio do teste in vitro em associação ao Teste de Draize-Irritação Ocular;

Um teste com alta capacidade de prever o potencial de irritação oftálmica, podendo ser incluído na bateria dos testes alternativos usados associadamente ao ensaio in vivo, pois limita o emprego do Teste de Draize – Irritação Ocular para confirmar resultados negativos, excluindo-o frente a produtos irritantes.

Relativamente simples na execução e de alta reprodutibilidade.

---

---

**Desvantagens:**

---

Segundo OKAMOTO et al., (1999), algumas limitações em termos de avaliação de determinados ingredientes cosméticos, que envolvem: a presença de substâncias coloridas e/ou turvas, fatores que interferem com a medida da absorvância da hemoglobina;

O emprego de diferentes solventes que podem causar variações nas potências tóxicas das substâncias-teste;

A baixa preditibilidade do teste na presença de álcoois e a presença de meio ácido que pode interferir na medida da hemoglobina liberada devido à sua desnaturação.

---

---

## HET-CAM

---

### Princípio do método:

---

Segundo a metodologia descrita no *Journal Officiel de la Republique Française (1996)*, o teste qualitativo, consiste na utilização de ovos fertilizados de galinha da raça Leghorn, livres de patógenos específicos (SPF – *Specific Patogen Free*), incubados por 10 dias a temperatura de  $38^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  e umidade relativa de aproximadamente 70%. Para cada produto são utilizados 4 ovos. No décimo dia de incubação se retira a casca do ovo ao redor da câmara de ar, evidenciando a membrana da casca. Sendo removida para exposição da membrana córion-alantóide e aplica-se nesta última 300 $\mu\text{L}$  do produto, que se remove após 20 segundos de contato, lavando-se com solução salina isotônica a  $37^{\circ}\text{C}$ . A membrana córion-alantóide deve ser examinada por cinco minutos e graduada para os efeitos irritantes, baseando-se na alteração dos vasos da membrana córion-alantóide, por meio da observação do tempo do surgimento de congestão, hemorragia e coagulação, possibilitando uma classificação (NI,IL,IM e IS) de acordo com as faixas de graduação das lesões.

---

### Situação regulatória atual:

---

Método valido e está no processo de validação.

---

### Vantagens:

---

É um ensaio viável e de fácil realização quando comparados ao Teste de Draize. Tende a superestimar resultados obtidos *in vivo*, *apresenta alta sensibilidade*. Identifica com precisão todas as substâncias/produtos que são considerados não irritantes. Apresenta praticidade de execução, demonstra boa sensibilidade e não requer recursos financeiros altos (LUEPKE, 1985).

---

### Desvantagens:

---

Basicamente identifica substancias/produtos não irritantes. Mesmo não utilizando o animal, somente a MCA de um ovo embrionado, ainda há críticas, pois acreditam que se tratam de um organismo vivo;

Devido seu desfecho qualitativo e subjetivo, quanto a seus resultados, dificulta a reprodutibilidade interlaboratorial, impactando negativamente no seu potencial de difusão/transferência para um grande numero de laboratórios. (Lagarto et al. 2006). Não apresenta boa predição do potencial irritante ocular para produtos opacos ou coloridos, pois dificulta a visualização dos efeitos hemodinâmicos ocorridos na membrana córioalantóide (VINARDELL & MITJANS, 2006)

Apresenta resultados falso positivos, descritos na literatura e superestima os resultados;  
Possível limitação para sólidos.

---

---

## CAM-TBS

---

### Princípio do método:

---

Utiliza-se 4 ovos embrionados no seu décimo dia de incubação, ao expor a MCA coloca-se sobre ela um anel de silicone que delimita a área da aplicação do produto, e após aplicar 200 µL deixa-se agir por 20 segundos para posteriormente remover com solução salina ou água destilada. Após esta etapa aplica-se 500 µL do corante azul de tripan, deixando agir por 1 minuto, no término do tempo remove-o por 20 segundos com o auxílio de um pissete contendo água destilada, em seguida com uma tesoura recorta-se a área da MCA delimitada pelo anel de silicone, depositando em um tubo de ensaio contendo 3 ml de formamida, levando para centrifugar com velocidade de 3.200 rpm por 10 minutos. O sobrenadante é transferido para uma placa e faz a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm, a classificação é feita de acordo com a proposta elaborada por Lagarto, 2006, que apresenta faixas estipuladas para sua classificação (NI, IM e IS), uma avaliação quantitativa, diferentemente do ensaio HET-CAM, que leva em consideração apenas os dados qualitativos (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

---

### Situação regulatória atual:

---

Método Válido

---

### Vantagens:

---

É um ensaio quantitativo viável e de fácil realização quando comparados ao Teste de Draize; Apresenta uma maior especificidade nos resultados e precisão superior em relação ao modelo clássico (HET-CAM).

---

### Desvantagens:

---

Indicado apenas para caracterizar produtos com baixo potencial irritante.

---

---

## QPT

---

### Princípio do método:

---

O método avalia a taxa de crescimento celular através da determinação colorimétrica da quantificação de proteínas totais contidas em cultura celular (SHOPSIS & 25 ENG, 1985 E VIAN *et al.*, 1995). Assim, o ensaio tem como desfecho final a avaliação do efeito de uma determinada substância sobre o crescimento/proliferação celular, ou seja, o grau de inibição do crescimento celular provocado pela substância em questão fornece um indicativo de sua toxicidade (KNOX *et al.*, 1986; CLOTHIER, 1995).

A quantificação do teor de proteínas totais, é realizada após a lavagem das placas e a fixação das células que permaneceram vivas e aderidas após o contato com a substância-teste.

---

### Situação regulatória atual:

---

Método Válido

---

### Vantagens:

---

Este teste é considerado rápido, sensível, reprodutível, possui simplicidade de execução, custo relativamente baixo, requer reagentes com baixa toxicidade, é sujeito a automação e não é tão dependente das modificações fisiológicas celulares como os ensaios de viabilidade através da avaliação do metabolismo celular (SHOPSIS, 1985; KNOX *et al.*, 1986; MARGIS & BOROJEVICH, 1989).

Apresenta a possibilidade de se estocar as placas para um processamento posterior, além da realização de repetições do ensaio utilizando as mesmas microplacas.

Vale ressaltar que o método proposto requer reagentes de baixa toxicidade e o corante azul brilhante de comassie, que é sabidamente menos tóxico que os corantes NR e MTT.

---

### Desvantagens:

---

Apresenta certa dificuldade em correlacionar a metodologia *in vitro* com a Metodologia *in vivo*, assim como a baixa especificidade do método em questão, parece residir no fato de que o teste proposto demonstrou maior correlação com o efeito tóxico

ocorrido na conjuntiva, que por sua vez, é a estrutura ocular que recebe o menor peso durante a análise do teste de irritação ocular *in vivo*.

Apesar de apresenta algumas limitações, pois quantifica as células indiretamente, ou seja, de forma relativa à quantidade de proteínas totais e os resultados obtidos são dependentes do tipo celular utilizado (EUN & SUH, 2000).

---

---

## Citotoxicidade pelo método NRU

---

### Princípio do método:

---

Assim como no método de citotoxicidade com MTT, neste ensaio utiliza-se cultura de células adicionada de um corante vital, *i.e.*, o NR (ou seja, o corante vermelho neutro). O método mede a atividade de retenção do corante pelos lisossomas das células viáveis. A captação do NR pelas células viáveis é quantificada por espectrofotometria, através de um leitor automático de microplacas. O parâmetro final de avaliação também é o estabelecimento da IC50, concentração da substância-teste que inibe 50% do crescimento celular (ABREU 2008) .

---

### Situação regulatória atual:

---

Método Válido

---

### Vantagens:

---

Este método é empregado para todo tipo de formulação

---

### Desvantagens:

---

A única exceção para aplicar este método e que não deve utiliza-lo nas formulações que possuam propriedades fixadoras, como as formulações alcoólicas (ANVISA, 2003), pois a avaliação da acurácia de álcoois, ácidos fortes e substâncias alcalinas fica dificultada (TANI *et al.*, 1999).

Utiliza reagentes de alta toxicidade.

---



---

**Citotoxicidade pelo método MTT**

---

**Princípio do método:**

---

Utiliza-se cultura de células, como a SIRC (linhagem celular derivada da córnea do coelho) ou outras, adicionadas do corante vital MTT [ou 3-(4,5 dimethyl thiazole-2yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide]. Este método mede a atividade mitocondrial das células viáveis em metabolizar sais de tetrazolium. O parâmetro final de avaliação é o estabelecimento da IC50 ( a concentração da substância-teste que inibe 50% do crescimento celular (ABREU, 2008).

---

**Situação regulatória atual:**

---

Método Válido

---

**Vantagens:**

---

Fácil reprodutibilidade e utiliza cultura de células.

---

**Desvantagens:**

---

Não aplicável a produtos insolúveis em água (ANVISA,2003).

Utiliza reagentes de alta toxicidade.

---

## 5. CONCLUSÃO

Este trabalho permite concluir que:

- ✓ Existem métodos alternativos para irritação ocular;
- ✓ Poucos são validados;
- ✓ Os métodos validados são: Teste in vitro de curta duração para danos oculares, Epitélio corneal humano reconstruído, BCOP, ICE e FL;
- ✓ Os métodos válidos são: HET-CAM, CAM-TBS, IRE, RBC, NRU, QPT e MTT;
- ✓ A diversidade das estruturas oculares não permitem a substituição por somente um método;
- ✓ Estuda-se a aplicação de uma bateria de testes capazes de, a partir de uma avaliação conjunta, substituir o uso de coelhos;
- ✓ Através da utilização da bateria permite desenvolver um sistema hierárquico onde os animais sejam utilizados apenas para a confirmação da ausência de toxicidade, reduzindo ao máximo o risco;
- ✓ Atualmente ainda há muitas discussões por parte de protectionistas e cientistas em relação à utilização de animais em testes de irritação ocular, assim como nos demais testes.

## **6. REFERÊNCIAS**

ABREU, C.L.C. Avaliação da citotoxicidade induzida por produtos cosméticos pelo método de Quantificação de Proteínas Totais em células 3T3/Clarice Lima do Canto Abreu. Rio de Janeiro: xiii, 104 p., il., tab Dissertação (Mestrado). INCQS/FIOCRUZ, 2008.

AMERICAN ANTI-VIVISECTION SOCIETY - AAVS. Types of Animal Testing. Pennsylvania/EUA, 2010. Disponível em: <[http://www.aavs.org/site/c.bkLTKfOSLhK6E/b.6457299/k.82D0/Types\\_of\\_Animal\\_Testing.htm](http://www.aavs.org/site/c.bkLTKfOSLhK6E/b.6457299/k.82D0/Types_of_Animal_Testing.htm)>. Acesso em: 21 Out. 2010.

ANDRADE, A.; PINTO, S.C; OLIVEIRA, R.S. (orgs). Animais de Laboratório: Criação e Experimentação. Rio de Janeiro: 385 p.FIOCRUZ, 2002.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Guia para a avaliação de segurança de produtos cosméticos*. Disponível em: <[www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)> Acesso em 31 Ago.2003, Brasília, DF.2003.

BARILE, F.A Validating and troubleshooting ocular in vitro toxicology tests Journal of Pharmacological and Toxicological Methods 61 (2010) 136–145. Elsevier. January 2010.

BOTTING, J. The history of thalidomide. Drug News Perspectives, [S.l.], v. 15, n. 9, p. 604-611, 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos. 2002.

BRASIL. Lei n. 11.794 (lei Arouca), Disponível em <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2007-2010/2008/lei/111794.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/111794.htm)> de out. 2008.

BRASIL. Lei nº 15.316 de Janeiro de 2014. Diário Oficial do Estado de São Paulo.

BRASIL. Lei nº 4.538 de Junho de 2014. Diário Oficial do Estado do Mato Grosso do Sul.

BRASIL. Projeto de lei nº 17/2014, em 2015. Aprovada pela Assembleia Legislativa do Estado do Amazonas (Aliam).

BRASIL. Lei municipal nº 11.955 de novembro de 2015. Sistema Integrado de Referência Legislativa- SIRIEL. Porto Alegre.

BRASIL. Lei nº 18.668 de Dezembro de 2015. Diário Oficial do Estado do Paraná, nº 9.603.

BRASIL. Lei nº 8.361 de maio de 2016. Diário Oficial, proposta Estadual do Pará. BRASIL.

CALVER, H.N. (1936) American chamber of horrors. American Journal of public health.,n.650, 1963.

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*, v.40, p.290-296, 2004.

CHAMBERS, W.A.; GREEN, S.; GUPTA, K.C: Scoring for eye irritation tests. *Food and Chemical Toxicology*, v.31, p.111-115, 1993.

CHAN, P.K.; HAYES, A.W: Acute toxicity and eye irritation, in Heyes AW (ed): *Principles and Methods of Toxicology*. New York, Raven Press. 579-647, 1994.

CHAVES. FÁBIO. Nova Zelândia proíbe testes em animais para produtos cosméticos e seus ingredientes. Publicado em 31/03/2015. Acesso em 03/04/2017, Disponível em: <https://www.vista-se.com.br/nova-zelandia-proibe-testes-em-animais-para-produtos-cosmeticos-e-seus-ingredientes/>

CHIBA, K.; MAKITO, I.; OHUCHI, J.; KASAI, Y.; KAKISHIMA, H.; TSUKUMO, K. Interlaboratory validation of the in vitro eye irritation test for cosmetic ingredients. Evaluation of cytotoxicity test on HeLa cells. *Toxicology in Vitro*, v.13, p.189-198, 1999.

CHORILLI, M.; SCARPA, M. V.; LEONARDI, G. R.; FRANCO, Y. O. (2007). Toxicologia dos Cosméticos. *Latin American Journal of Pharmacy*, São Paulo, v.26, p. 144-154, 2007.

CHORILLI, M.; TAMASCIA, P.; ROSSIM, C; SALGADO, H.R.N. Ensaio Biológicos para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, Araraquara, SP, v.30, n.1, p.19-30, 2009. Disponível em: < [http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/Cien\\_Farm/article/viewFile/869/768](http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/Cien_Farm/article/viewFile/869/768) >. Acesso em: 28 Ago. 2010.

CLOTHIER, R.H. The FRAME cytotoxicity test (Kenacid Blue). In: *In Vitro Toxicity Testing Protocols. Methods in Molecular Biology*, Ed. S.O Hare and C Attervill, p. 109-118. Londres. U.K: Chapman and Hall, 1995.

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. Timetables for the phasing-out of animal testing in the framework of the 7th Amendment to the Cosmetics Directive (Council Directive 76/768/EEC). 2004. Brussels, 1.10.2004, SEC(2004) 1210

CORDEIRO, R. S. B. *LEGALIZAÇÃO DO USO DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO: PRESENTE, PASSADO E FUTURO*. *Ciência e Cultura*. On-line version ISSN 2317-6660. Vol.60 no.2 São Paulo 2008

CORRADO, M. C. Uso do método HET-CAM como modelo alternativo ao teste de irritação da mucosa oral em hamsters na avaliação do potencial tóxico de dentifrícios. Rio de Janeiro: Xv, 68 p., il., tab. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, INCQS/ FIOCRUZ, 2007.

CRUZ, A.S. Teste de Citotoxicidade In Vitro Como Alternativa ao Teste ‘In Vivo’ de Draize na Avaliação de Produtos Cosméticos. 2003. 107p. Tese (Doutorado em Produção e Controle Farmacêuticos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo-USP, São Paulo, SP, 2003.

COSMETIC INGREDIENT - CI. Como substituir os animais nos testes de segurança de produtos cosméticos. Disponível em: <[http://www.revistadecosmetologia.com/infoco\\_4.php](http://www.revistadecosmetologia.com/infoco_4.php)>. Acesso em: 5 nov. 2010.(AAVS, 2010).

COSTA, R.N. Estudo da aplicabilidade do método de quantificação de proteínas totais em células SIRC na avaliação do potencial de irritação ocular de xampus e tensoativos. Rio de Janeiro: 104 p il. Dissertação (Mestrado) – Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca – ENSP. Fiocruz, 2006.

DASTON, G.P.; FREEBERG, F.E. Ocular irritation testing, in Hobson DW (ed): Dermal and Ocular Toxicology. Fundamental and Methods. Boca Raton, FL, CRC Press, p.509-539, 1991.

Declaração Universal dos Direitos dos Animais. Disponível em:<http://portal.cfmv.gov.br/portal/uploads/direitos.pdf>. Acesso em 23 de jan de 2017.

DE TORRES, E.P, Larrauri AG, Kunh GR. Ensayos alternativos a la experimentacion animal. Animales de Experimentación, v.3, n.2, p. 30-36, 1997.

*DIAS, E.C. Abolicionismo e experimentação animal. Disponível em < <https://livros-e-revistas.vlex.com.br/vid/abolicionismo-animal-426694162>> p 133-150. Acesso em 16 de agosto de 2017.*

DRAIZE, J. H.; WOODARD, G.; CALVERY, H.O. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. J. Pharmacol. Exp. Ther., 1944, 83:377-390.

DRAIZE, J. H. Dermal Toxicity. Appraisal of the safety chemicals in foods, drugs and cosmetics. Association of Food and Drug Officials of the United States, 1959: 46-59.

DRAIZE, J.H.; KELLEY, E.A. The urinary excretion of Boric Acid preparations following oral administration and topical applications to intact and damaged skin of rabbits. Toxicology and Applied Pharmacology, v.1, n.3, p.267-276, 1959.

EUN, H.C.; SUH, D.H. Comprehensive outlook of *in vitro* tests for assaying skin irritation as alternatives to Draize test. *Journal of Dermatological Science*, v.24, p. 77-91, 2000.

FOOD AND DRUG COSMETIC. ACT, 1938, Disponível em <https://www.fda.gov/aboutfda/whatwedo/history/productregulation/ucm132818.htm> Acesso em 03 jun. 2017.

HAGINO, S.; ITAGAKI, H.; KATO, S.; KOBAYASHI, T.; TANAKA, M. Quantitative evaluation to predict the eye irritancy of chemicals: modification of chorioallantoic membrane test by using tripan blue. *Toxicology in Vitro*, 1991, 5(4):301-304.

HUANG, S. China Ends Animal Testing Rule for Some Cosmetics. Disponível em: <[https://sinosphere.blogs.nytimes.com/2014/06/30/china-ends-animal-testing-rule-for-some-cosmetics/?\\_php=true&\\_type=blogs&\\_php=true&\\_type=blogs&partner=rss&emc=rss&\\_r=1](https://sinosphere.blogs.nytimes.com/2014/06/30/china-ends-animal-testing-rule-for-some-cosmetics/?_php=true&_type=blogs&_php=true&_type=blogs&partner=rss&emc=rss&_r=1)>. Acesso 26 de julho, 2017.

ICCVAM, Background review document: Current status of *in vitro* test methods for identifying ocular corrosives and severe irritants: Hen's egg test–chorioallantoic membrane test method. (2006). NIH Publication No.: 06-4515, National Toxicology Program (NTP), NICEATM, NIEHS, NIH, U.S. Public Health Service, Department of Health and Human Services.

ICCVAM. (2009). Draft proposed ICCVAM test method recommendations: Evaluation of the validation status of alternative ocular safety testing methods and approaches. National Toxicology Program (NTP), NICEATM, NI.

INSTITUTE FOR LABORATORY ANIMAL RESEARCH (ILAR). *Science, medicine and Animals*. The National Academies Press; 2004.

ITAGAKI, H.; HAGINO, S.; KATO, S.; SHINOBU, K. Protocolo 108, CAM-TBS Test. INVITOX, 1996.

JOURNAL OFFICIEL DE LA REPUBLIQUE FRANÇAISE. Aretê du 27 decêmbre 1996 relatif aux méthodes d'analyse nécessaires au controle de la composition dès produits cosmétiques. Annexe IV: méthode officielle d'évaluation du potencial irritant par application sur la membrane chorioallantoidienne del'oeuf de poule, 1996: 19137-19138.

KAY, J.H.; CALANDRA, J.C. Interpretation of eye irritation tests. *Journal of Soc Cosmt Chem*, v.13, p.281-289, 1962 .

KNOX P.; UPHIL, P.F.; FRY, J.R.; BENFORD, J.; BALLS, M. The FRAME Multicentre on in vitro Cytotoxicology, *Food and Chemical Toxicology*, v. 24, n. 6/7, p. 457-463, 1986.

KURIAN, G. *The Historical Guide to American Government*. New York: Oxford University Press; 1998.

LAGARTO, A.; VEGA, R.; GUERRA, I.; GONZÁLEZ, R. In vitro quantitative determination of ophtalmic irritancy by the chorioallantoic membrane test with trypan blue staining as alternative to eye irritation test. *Toxicology in Vitro*, 2006, 20: 699-702.

LANG, P. Métodos inovadores. *Revista de Manguinhos*. Instituto Oswaldo Cruz. p. 25-31, dez. 2014.

LARANJEIRA, J.A.V. O uso de métodos alternativos à experimentação animal no desenvolvimento de produtos cosméticos. Universidade Federal do Paraná. Curitiba: 41 p (Monografia). 2015.

LUEPKE, N. P. Hen's Egg Chorioallantoic Membrane Test for irritation potential. *Food and Chemical Toxicology*, 1985, 23: 287-291.

MACKLIS, R. M. Radithor and the era of mild radium therapy. *JAMA*, v. 264, n. 22, p. 2870, 1990.

MARGIS, R.; BOROJEVICH, R. Quantification of attached cells in tissue cultures plates and microcarries. *Analytical Biochemistry*, v.181, p.209-211, 1989.

MITJANS, M.; INFANTE, M.R.; VIANRDELL, M.P. Human hemoglobin denaturation as an alternative to the Draize test for predicting eye irritancy of surfactants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 52(2): 89-93.2008.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. GUIDELINES FOR THE CARE AND USE OF



MAMMALS IN NEUROSCIENCES AND BEHAVIORAL RESEARCHES. Washington DC. National Academy Press. 2003.

Nigan P.K. Adverse reactions to cosmetics and methods of testing. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2009; 75(1):10-18.

NOBREGA, A. M; ALVES, E. N; PRESGRAVE, E. N; DELGADO, I. F. Avaliação da irritabilidade ocular induzida por ingredientes de cosméticos através do teste de Draize e dos Métodos HET-CAM e RBC. *Universitas: Ciências da Saúde.*, Brasília, v. 6, n. 2, p. 103-120, jul./dez. 2008

OECD (2002). Test Guideline 405. Acute eye irritation/corrosion, in: *Guidelines for testing of Chemicals.* April 2002.

OECD (2009). Guidance Document on “Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage. N° 437. OECD- Sep. Pages:18.

OECD (2009). Guidance Document on “Isolated Chicken Eye Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritant “ N° 438 . OECD sep. Pages 18

OECD (2012) Guidance Document on “ Fluorescein Leakage Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants” N° 460 . Oct. Pages 16.

OECD (2015) Guidance Document on “Short Time Exposure In Vitro Test Method for Identifying“ N°. 491. July. Pages 14.

OECD (2015). Guidance Document on “Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage “ N° 492 . July. Pages 27.

OFFICE OF TECHNOLOGY ASSESSMENT. OTA. *Alternatives to Animal Use in Research, Testing, and Education.* U.S. Congress, Washington, DC: U.S. Government Printing Office, OTA-BA-273, feb. 1986.

OLIVEIRA, L.N., *et al.* A Lei Arouca e o uso de animais em ensino e pesquisa na visão de um grupo de docentes. *Revista Bioethikos*, São Camilo, v.7, p 139-149, 2013.

PAIXÃO, R.L. *Experimentação Animal: razões e emoções para uma ética*. Rio de Janeiro, 2001. 189 p. Dissertação (Doutorado em Saúde Pública) – Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública, 2001.

PAPE, W.J, *et al.* COLIPA validation project on in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients and finished products (phase I): the red blood cell test for the estimation of acute eye irritation potentials. *Present status, Toxicology in Vitro*, v.13, p.343–354, 1999.

PATON, W. *Man and Mouse. Animals in Medical Research*. Oxford: Oxford University Press, 1993

PAUWELS, M., ROGIERS, V. Safety evaluation of cosmetics in the EU: Reality and changes for the toxicologist. *Toxicol. Letters*, v. 151, p. 7-17, 2004.

PINHEIRO, L.M.; ACRA, L.A. O conhecimento de Recursos Alternativos em Pesquisa com Animais de Laboratório. *Rev. Estudos de Biologia*, Curitiba, PR, p. 157-163, Abr/ Jun, 2007.

PINTO, T.J.A, Kaneko TM, Ohara MT. *Controle biológico de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos*. São Paulo: Ateneu; 2003

PRESGRAVE, O. A.F. ANIMAIS DE LABORATÓRIO. Alternativas para Animais de Laboratório:do animal ao computador. Disponível em: <<https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/12296>> Cap 42. p 361- 367, 2002.

PRESGRAVE, O. A. F. The need of the establishment of a Brazilian Centre for the Validation of Alternative Methods (BraCVAM). *ATLA*, v. 36, p. 705-708, 2008.

PRESGRAVE, O. A. F. Métodos alternativos. In: Lapchik, V. B. V.; Mattaraia, V. G. M.; Ko, G. M. (Org.). *Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório*. São Paulo: Atheneu Editora, 2009.

PRESGRAVE, O,A,F. Proposta de criação do Centro Brasileiro para Validação de Métodos Alternativos: formação, estrutura e funcionamento. Rio de Janeiro: 136 f.: il., tab. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária; Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, 2012.

PRICE, J.B.; ANDREWS, .LJ. The in vitro assessment of eye irritancy using isolated eyes. *Food and Chemical Toxicology*, v.23, n. 2, p.313-315, 1985.

RIORDAN, T. *Inventing beauty: a history of innovations that have made us beautiful*, Ed.Brodway Books. 2004.

ROMANOWSKI, P, Schueller R. Fundamentals of cosmetic product safety testing. *Cosmet Toilet*. 1996; 111:79-86.

ROWAN, A.N. Section IV. Ethical Review and the Animal Care and Use Committee. In: *A Special Supplement: Animals, Science and Ethics* (S. Donnelley & K. Nolan, eds.), *Hastings Center Report*, v.20, p.19-24, 1990.

RUSSEL, W. M. S. & BURCH, R. L., *The Principles of Humane Experimental Technique*. England: Universities Federation for Animal Welfare. 1992.

SCOOT, L. ESKES, C. A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace in vivo studies using Bottom–Up and Top–Down approaches. *Toxicology in Vitro* 24 (2010) 1–9 Elsevier 2010.

SHOPSIS, C.; ENG, B. Rapid cytotoxicity test using a semi-automated protein determination on cultured cells. *Toxicology Letters*, v.26, n.1, p.1-18, 1985.

SINGER, P. *Libertação Animal*. Ed.revista. Porto Alegre: Lugano. 357 p. , 2004.

STEPHENS, M. L. *et al*. The first forty years of the alternatives approach: refining, reducing, and repalcing the use of laboratory animals. Disponível em: <[http://files.hsus.org/web-files/PDF/MARK\\_State\\_of\\_Animals\\_Ch\\_08.pdf](http://files.hsus.org/web-files/PDF/MARK_State_of_Animals_Ch_08.pdf)>. Acesso em: 15 abr. 2015.

TANI, N.; KINOSHITA, S.; OKAMOTO, Y.; KOTANI, M.; ITAGAKI, H.; Interlaboratory validation of the in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients. (8) Evaluation of cytotoxicity tests on SIRC cells. Elsevier. *Toxicology in Vitro* Volume 13, Issue 1, February 1999, Pages 175-187.

UNIÃO EUROPÉIA, 2003. Directive 2003/15/EC of European Parliament and of the Council of 27 February 2003. Amending Council Directive 76/68/EEC on approximation of the laws of the Member States Relating to Cosmetic Products, 2003.

VERTRAELEN, S. *et al* 2013 Improvement of the Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) assay as in vitro alternative to the Draize rabbit eye irritation test. Elsevier. *Toxicology in Vitro*. < <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.02.018>> Volume 27, Issue 4, June 2013, Pages 1298-1311

VIAN, L.; VINCENT, J.; MAURIN, J.; FABRE, I.; GIROUX, J.; CANO, J.P. Comparison of three in vitro cytotoxicity assays for estimating surfactants ocular irritation. *Toxicology in Vitro*, v.9, p.185-190, 1995.

VINARDELL, M. P, MITJANS M. Alternative methods for eye and skin irritation tests: an overview. *J Pharm Sci*. 2008; 97(1):46-59.

VINARDELL, M.P.; MITJANS M. The chorioallantoic membrane test as a model to predict the potential human eye irritation induced by commonly used laboratory solvents, *Toxicology in Vitro*, v. 20, n.6, p.1066-1070, 2006.

VINARDELL, M.P. The use of non-animal alternatives in the safety evaluations of cosmetics ingredients by the Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS). Elsevier, Barcelona, v. 71, p. 198-420, 2015.

WAX P. M. Elixirs, diluents, and the passage of the 1938 Federal Food, Drug and Cosmetic Act. *Annals of Internal Medicine*, [S.l.], v. 122, n. 6, p. 456-461, 1995.

WILHELMUS, K. R. Therapeutic Reviews: the Draize Eye Test. Survey of Ophthalmology, v.45, n.6, p.393-397, 2001.

WOLFGANG, J. W. P.; PFANNENBECKER, U.; HOPPE, U. Validation of Red Blood Cell Test System as in Vitro Assay for the Rapid Screening of Irritation Potential of Surfactants. Molecular Toxicology, v. 1, p. 525-536, 1987.

WOLFGANG, J.W.P et al. Standardization of in vitro Red Blood Cell Test for evaluation the acute cytotoxic potential of tensides. Arzneimittel-Forschung/Drug Research, v. 40(I), n. 4, p. 498-502, 1990.

Yan, X, Piterski C, Nitka S. Evaluation of the hen's egg test chorioallantoic membrane (CAM) method in prediction of the eye irritation potential formulated personal wash products. Cutan Ocul Toxicol. 2007; 26(1):25-36.