

Fundação Oswaldo Cruz  
Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca  
Mestrado em Saúde Pública  
Área de Concentração Toxicologia

Estudo da aplicabilidade do ensaio de quantificação de  
proteínas totais em células SIRC na avaliação do potencial  
de irritação ocular de xampus e tensoativos

Rodrigo Netto Costa

Rio de Janeiro  
2006

Fundação Oswaldo Cruz  
Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca  
Mestrado em Saúde Pública  
Área de Concentração Toxicologia

Estudo da aplicabilidade do ensaio de quantificação de  
proteínas totais em células SIRC na avaliação do potencial  
de irritação ocular de xampus e tensoativos

Rodrigo Netto Costa

Dissertação apresentada à Escola  
Nacional de Saúde Pública Sérgio  
Arouca – Fundação Oswaldo Cruz – para  
obtenção do grau de Mestre em Saúde  
Pública – área de concentração em  
Toxicologia Ocupacional/Ambiental

Rio de Janeiro  
2006

**Catálogo na fonte**  
**Centro de Informação Científica e Tecnológica**  
**Biblioteca da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca**

C837e Costa, Rodrigo Netto  
Estudo da aplicabilidade do ensaio de quantificação de proteínas totais em células SIRC na avaliação do potencial de irritação ocular de xampus e tensoativos. / Rodrigo Netto Costa. Rio de Janeiro: s.n., 2006.  
xviii, 60 p., il., tab.

Orientador: Delgado, Isabella Fernandes  
Dissertação de Mestrado apresentada à Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

1.Cosméticos-toxicidade. 2.Traumatismos oculares-induzido quimicamente. 3.Linhagem celular.  
4.Alternativas de testes com animais - métodos.

CDD - 20.ed. – 615.19

Fundação Oswaldo Cruz  
Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca  
Mestrado em Saúde Pública  
Área de Concentração Toxicologia

Estudo da aplicabilidade do ensaio de quantificação de  
proteínas totais em células SIRC na avaliação do potencial  
de irritação ocular de xampus e tensoativos

Rodrigo Netto Costa

**Orientadora: Isabella Fernandes Delgado**

Aprovado em \_\_\_\_\_ pela banca examinadora:

Prof. Dr<sup>a</sup>. \_\_\_\_\_  
Ana Cristina Martins de A. Nogueira (externo)

Prof. Dr<sup>a</sup>. \_\_\_\_\_  
Rita de Cássia Oliveira da Costa Mattos (interno)

Prof. Dr<sup>a</sup>. \_\_\_\_\_  
Isabella Fernandes Delgado (orientadora)

Prof. Dr<sup>a</sup>. \_\_\_\_\_  
Nancy dos Santos Barbi (suplente externo)

Prof. Dr<sup>a</sup>. \_\_\_\_\_  
Manuela da Silva (suplente interno)

Rio de Janeiro  
2006

*“É melhor tentar e falhar, que preocupar-se em ver a vida passar.  
É melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final.  
Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder.  
Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver.”*

*(Martin Luther King)*

**Dedico este trabalho a Deus, pois Ele é a razão de tudo em minha vida. É Ele que em seus planos me faz caminhar e realizar tudo o que de antemão Ele mesmo já preparou para mim.**

## AGRADECIMENTOS

A minha esposa Tatiana, pois sempre está comigo. Ela é minha companheira de lutas e de vitórias. Enfim, meu grande presente da parte de Deus!

Aos meus pais que me educaram com todo o amor e me sustentaram com total diligência, dando-me todo o exemplo e apoio necessários para que eu alcançasse mais esta realização.

A minha orientadora Isabella Fernandes Delgado, por sempre acreditar em mim desde a minha graduação e por realmente me ajudar e orientar na elaboração deste trabalho.

A Alessandra de Melo Aguiar, por ser a idealizadora deste trabalho. O que posso dizer: muito obrigado por todo seu apoio e dedicação tanto na área prática como teórica! Você me ajudou muito!

A Anna Christina Guimarães e Cynara Pinheiro; pela grande ajuda prática e pela compreensão em todos os momentos do trabalho.

A Lúcia Wernek e Jarbas dos Santos por me darem a oportunidade de conseguir finalizar o meu Mestrado.

A Eloísa Alves, Rosaura e Octavio Presgrave; muito obrigado pela ajuda teórica e por gentilmente compartilharem os resultados do teste *in vivo*.

A Fernanda Sabagh, Daniel Machado e toda equipe do Laboratório de Irritação do Departamento de Farmacologia e Toxicologia do INCQS. Obrigado pela força!

A toda a equipe do Departamento de Imunologia do INCQS que de um jeito ou de outro me ajudaram em meio à correria dos experimentos *in vitro*.

A FIOCRUZ, que é simplesmente a maior instituição biomédica da América Latina e uma das mais respeitadas do mundo, exercendo um papel social de grande relevância para o país.

Por fim, aos colegas, aos professores e toda a coordenação da subárea de Toxicologia Ocupacional/Ambiental do Mestrado em Saúde Pública da ENSP.

# ÍNDICE

Lista de abreviaturas	xi
Lista de figuras	xiii
Lista de tabelas	xiv
Lista de quadros	xvi
Resumo	xvii
Abstract	xviii
I. Introdução	01
I.1. Considerações Gerais	01
I.2. Métodos Alternativos ao Uso de Animais	02
I.3. A Origem da Regulamentação de Produtos Cosméticos	05
I.4. Teste de Draize	07
I.5. Produtos Cosméticos	10
I.6. Alternativas ao Teste de Draize	12
I.7. Ensaio de Citotoxicidade	13
I.8. SIRC – Linhagem Celular Derivada de Córnea de Coelho	15
I.9. Relevância do Estudo	16
II. Objetivos	18
II.1. Objetivo Geral	18
II.2. Objetivos Específicos	18
III. Material e Métodos	19
III.1. Soluções Empregadas	19
III.2. Equipamentos Utilizados	22
III.3. Materiais e Reagentes de Uso Geral	23
III.4. Amostras e Substâncias-teste	23
III.5. Linhagem Celular	25
III.5.1. Descongelamento Celular	25
III.5.2. Manutenção de Células SIRC	25
III.6. Ensaio <i>in vitro</i>	26
III.7. Ensaio <i>in vivo</i>	28

III.8. Análise Estatística	28
IV. Resultados	29
IV.1. Resultados <i>in vivo</i>	29
IV.2. Resultados <i>in vitro</i>	30
IV.3. Comparação entre os Testes <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	32
IV.4. Preditibilidade do Teste <i>in vitro</i>	35
V. Discussão	37
V.1. Avaliação da Qualidade dos Produtos Estudados	37
V.2. Limitações do Teste de Draize	37
V.3. Principais Testes <i>in vitro</i> para a Avaliação do Potencial Irritante Ocular de Produtos	39
V.4. Estratégias de Avaliação do Potencial Irritante Ocular de Produtos	41
V.5. Confronto com Dados da Literatura	41
V.6. Considerações Finais	47
VI. Conclusões	48
VII. Referências Bibliográficas	50
VIII. Anexo	57

## LISTA DE ABREVIATURAS

3T3 – Células de embrião de camundongo

*ad libidum* – a vontade

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATLA – *Alternatives to Laboratory Animals*

BCOP – Opacidade e Permeabilidade de Córnea Bovina

BSS.CMF – Solução salina balanceada livre de cálcio e magnésio

CBB-R250 – Corante Azul Brilhante de Coomassie R-250

DFT – Departamento de Farmacologia e Toxicologia

D.O. – Densidade óptica

ECVAM – *European Committee for Validation of Alternative Methods*

EEC – Comunidade Econômica Européia

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

FDA – *Food and Drug Administration*

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

FRAME – *Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments*

HET-CAM – Teste em Membrana Corion-Alantóide de Ovo Embrionado de Galinha

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

IC<sub>50</sub> – Concentração inibitória 50%

*i.e.* – isto é

IL – Produto levemente irritante

IM – Produto irritante moderado

IMax – Produto irritante máximo

INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

IS – Produto irritante severo

ISO – *International Standardization Organization*

L929 – Células de tecido conjuntivo de camundongo

LACENS – Laboratórios Centrais de Saúde Pública

MDCK – *Mardin-Darby canine kidney*

MTT – Ensaio da Atividade Metabólica Mitocondrial

NI – Produto não-irritante

NRU – Ensaio de Captação do Vermelho Neutro

OECD – *Organization for Economic Cooperation and Development*

ONGs – Organizações Não-Governamentais

POP – Procedimento Operacional Padrão

QPT – Ensaio de Quantificação de Proteínas Totais

RBC – *Red Blood Cell* (Teste de Hemólise)

SDS – Dodecilsulfato de Sódio

SFB – Soro fetal bovino

SIRC – Linhagem Celular Derivada de Córnea de Coelho

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Coelhos no Teste de Draize.	03
<b>Figura 2</b> – Cartazes de protesto contra o Teste de Draize.	04
<b>Figura 3</b> – Ilustração divulgada pelo FDA no ano de 1933.	07
<b>Figura 4</b> – Esquema didático do globo ocular.	09
<b>Figura 5</b> – Microscopia de fluorescência da linhagem celular SIRC.	15
<b>Figura 6</b> – Esquema de diluição e distribuição dos xampus/tensoativos em microplaca de 96 cavidades.	27
<b>Figura 7</b> – Representação esquemática do método <i>in vitro</i> .	27
<b>Figura 8</b> – Regressão linear entre os valores de IC50 e a classificação dos produtos no ensaio <i>in vivo</i> .	34
<b>Figura 9</b> – Tabela de Contingência.	35

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Listagem dos xampus e tensoativos testados.	24
<b>Tabela 2</b> – Classificação prévia do potencial de irritabilidade de um produto.	60
<b>Tabela 3</b> – Classificação final do potencial de irritabilidade de um produto.	60
<b>Tabela 4</b> – Classificação dos produtos/tensoativos obtida no ensaio <i>in vivo</i> .	29
<b>Tabela 5</b> – Resultados gerais dos testes <i>in vitro</i> .	31
<b>Tabela 6</b> – Comparação entre as classificações obtidas no ensaio <i>in vivo</i> e o valor médio de IC <sub>50</sub> <i>in vitro</i> .	32
<b>Tabela 7</b> – Coeficiente de correlação (Pearson e Spearman) relacionando os valores de IC <sub>50</sub> com os escores das estruturas oculares dos ensaios <i>in vivo</i> .	33
<b>Tabela 8</b> – Comparação dos resultados obtidos nos ensaios <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> com base nos valores de <i>cut-off</i> .	36
<b>Tabela 9</b> – Principais vantagens e desvantagens do Teste de Draize.	41
<b>Tabela 10</b> – Principais vantagens e desvantagens dos testes <i>in vitro</i> .	42

**Tabela 11** – Comparação entre valores médios de  $IC_{50}$  obtidos na avaliação de tensoativos: confronto com dados da literatura. 46

**Tabela 12** – Comparação entre os coeficientes de Spearman/Pearson entre os métodos *in vitro* NRU, MTT e QPT e o teste de Draize: confronto com dados da literatura. 47

## LISTA DE QUADROS

**Quadro 1** – Graduação das alterações e lesões do globo ocular de coelhos após instilação no saco conjuntival inferior de 0,1mL de amostra/substância-teste. 59

**Quadro 2** – Principais testes *in vitro* usados para avaliação da toxicidade ocular. 40

## RESUMO

A crescente tendência mundial pela substituição do uso de animais em experimentação promoveu a busca por métodos alternativos. Particular ênfase é dada ao desenvolvimento de métodos para substituir o tradicional Teste de Draize, utilizado para acessar a irritação ocular. Este teste tem sido um dos mais criticados pela comunidade científica, principalmente devido à subjetividade de avaliação das lesões oculares e variabilidade dos resultados obtidos em diferentes laboratórios, além das questões éticas com relação ao bem-estar animal. No presente estudo, o ensaio de quantificação de proteínas totais utilizando o corante Azul Brilhante de Coomassie R-250 foi avaliado quanto ao seu valor em prever o potencial de irritação ocular de vinte xampus e cinco tensoativos. Para este ensaio de citotoxicidade, utilizou-se a linhagem celular derivada de córnea de coelho (SIRC). A concentração que induziu 50% de inibição do crescimento celular relativa aos controles ( $IC_{50}$ ) foi calculada para cada substância-teste. Os resultados obtidos no teste *in vitro* foram comparados àqueles obtidos *in vivo*. A correlação entre os valores de  $IC_{50}$  obtidos *in vitro* e os escores máximos do teste *in vivo* foi de 0,617 ( $p=0,003$ ) pelo coeficiente de *Pearson* e de 0,738 ( $p=0,000$ ) pelo coeficiente de *Spearman*. Para avaliar o grau de preditibilidade do teste *in vitro* em relação ao teste de Draize estabeleceu-se um ponto de corte (*cut-off*) para diferenciação de substâncias irritantes ( $IC_{50}<0,700\text{mg/mL}$ ) daquelas não-irritantes ( $IC_{50}>0,700\text{mg/mL}$ ) no teste *in vitro*. Parâmetros como precisão (96%), sensibilidade (100%) e especificidade (83%) foram então determinados. Somente um produto apresentou resultado falso-positivo (irritante *in vitro* e não-irritante *in vivo*). Apesar de haver a necessidade de se testar um maior número de produtos e da realização de estudos inter-laboratoriais para se acessar a reprodutibilidade desta metodologia; com os resultados obtidos no presente estudo pode-se dizer que o ensaio de quantificação de proteínas totais utilizando o corante Azul Brilhante de Coomassie R-250, além de ser um método com características importantes como rapidez, sensibilidade, simplicidade de execução, baixo custo e alto grau de automação, foi capaz de prever o potencial de irritação ocular de xampus e tensoativos.

## ABSTRACT

The growing world tendency for the animal replacement in experimentation promoted the search for alternative methods. Particular emphasis is given to the development of methods to replace the traditional Draize Test used to assess the ocular irritation. This test has been one of the animal test methods most criticized by the scientific community, based on the subjectivity of the ocular lesions evaluation, on the variability of the animal test results in different laboratories and on the ethical questions about the animal well-being. In this study, the total protein assay using the Coomassie Brilliant Blue R-250 dye was evaluated for its value to predict the ocular irritant potential of twenty shampoos and five surfactants. The established cell-line derived from the cornea of rabbit eyes (SIRC) was used for this cytotoxicity assay. The concentration that induced the inhibition of 50% cellular growing comparing with the controls ( $IC_{50}$ ) was calculated for each test-substance. The results obtained from the *in vitro* test were compared with those obtained from the *in vivo* test. The correlations between the  $IC_{50}$  values and the maximum scores from the *in vivo* test were 0.617 ( $p=0.003$ ) by Pearson's coefficient and 0.738 ( $p=0.000$ ) by Spearman's coefficient. To evaluate the predictable degree of the *in vitro* test related to Draize Test, a cut-off was established for the differentiation of irritant ( $IC_{50}<0.700\text{mg/mL}$ ) from non-irritant ( $IC_{50}>0.700\text{mg/mL}$ ) products/surfactants. The *in vitro* test showed a precision of 96%, a sensibility of 100% and a specificity of 83%. Only one product presented a false-positive result (*in vitro* irritant and *in vivo* non-irritant). In spite of the need to test an increasing number of products and to carry out inter-laboratory studies to assess the reproducibility of this methodology; with the results showed in this study we may say that the total protein assay using the Coomassie Brilliant Blue R-250 dye, an already knowing test that has important characteristics like speed, sensibility, simplicity of execution, low cost and a high degree of automation, it was able to predict the ocular irritant potential of shampoos and surfactants.

# I. INTRODUÇÃO

## *1.1. Considerações Gerais*

Os grupos de defesa ambiental e aqueles que argumentam a favor da abolição da experimentação animal têm encontrado um suporte significativo na Europa e Estados Unidos, e suas idéias têm se expandido por todo mundo. A necessidade da realização de ensaios utilizando animais tem sido seriamente questionada por camadas poderosas da sociedade, seja no âmbito político, social, ético ou científico. Neste quadro, pode-se dizer que a indústria química, ou mesmo os órgãos governamentais de regulamentação e controle da qualidade estão sob crescente pressão para substituir a experimentação animal por métodos que não utilizem animais na avaliação toxicológica de novos produtos (Eun & Suh <sup>1</sup>).

No caso específico de produtos cosméticos, é bastante evidente a pressão por parte dos grupos antiviviseccionistas no sentido de proibir a utilização de animais nos testes de segurança e eficácia de produtos. A Diretiva 76/768/EEC, que é atualmente a base da legislação técnica europeia em cosméticos, estabeleceu no artigo 4 da sua 6ª Emenda a proibição da comercialização em todos os países comunitários de produtos cosméticos, cujos ingredientes tenham sido testados em animais (Concil Directive 93/35/EEC <sup>2</sup>). Porém, mediante as dificuldades encontradas pela Comunidade Econômica Européia (EEC) no processo de substituição de modelos animais por modelos *in vitro*, alguns prazos foram prorrogados (Directive 2003/15/EC <sup>3</sup>). A 6ª Emenda à Diretiva 76/768/EEC foi então substituída por cláusulas da 7ª Emenda que estabeleceu um novo prazo para a proibição de 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 esteja em vigor desde 2004.

Para os testes de toxicidade sistêmica, toxicocinética e toxicologia reprodutiva, os prazos para a substituição de modelos animais são maiores, devido à falta de alternativas consistentes para estes desfechos. Assim, estes testes deverão ser proibidos somente a partir de 11 de março de 2013 (Pauwels & Rogiers <sup>4</sup>).

Em suma, podemos dizer que estas cláusulas têm implicações importantes e que a partir de 2009 para garantir a segurança de um novo ingrediente cosmético deverão estar disponíveis métodos alternativos para a substituição de uma considerável bateria de testes toxicológicos em animais. Estes métodos alternativos não apenas deverão estar validados a tempo, mas também, deverão possibilitar o mesmo grau de segurança aos consumidores que os testes *in vivo*. Outro ponto relevante é o fato de que somente dados pré-clínicos consistentes garantem a segurança no processo de avaliação clínica destes ingredientes e que a bateria de métodos alternativos substitutiva dos modelos animais deverá possibilitar o mesmo grau de proteção aos voluntários dos estudos clínicos. Estas condições implicam em um enorme desafio para as indústrias de cosméticos e para a comunidade científica envolvida nesta questão (Pauwels & Rogiers <sup>4</sup>).

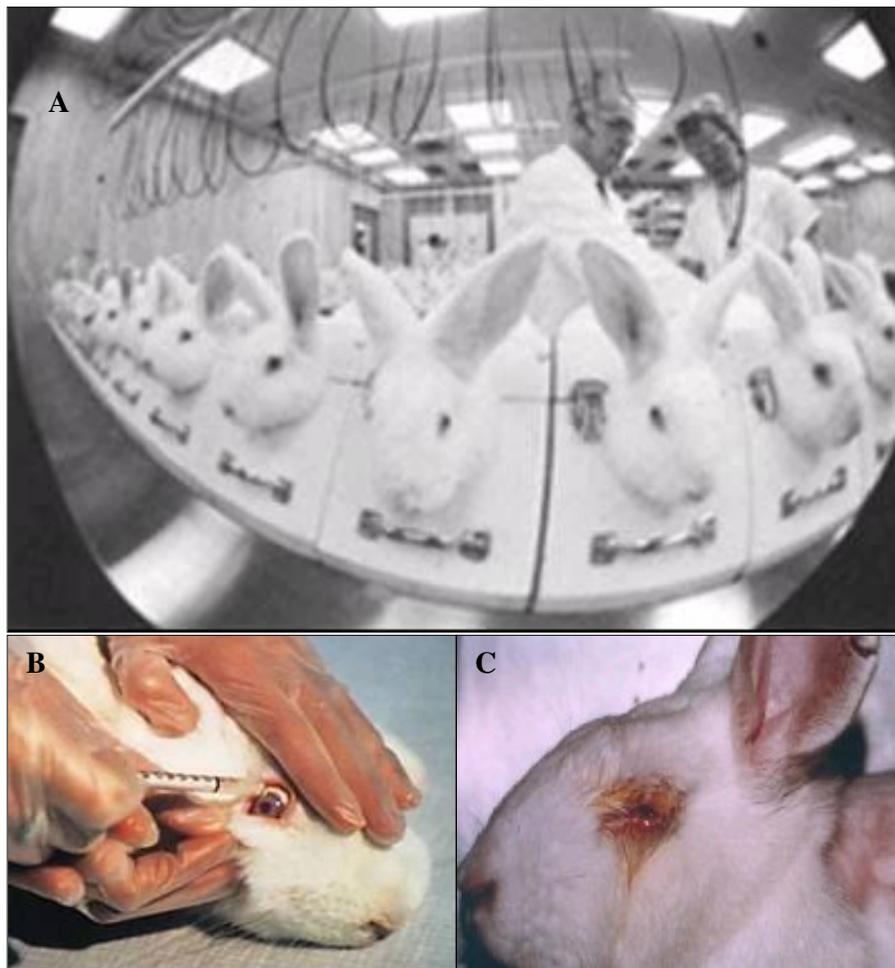
## ***1.2. Métodos Alternativos ao Uso de Animais***

No século XIX, Jeremy Bentham demonstrou seu interesse em proteger os animais lançando a seguinte reflexão: “*a questão não é se os animais raciocinam ou se eles podem falar, mas se eles sofrem*”. Ainda no mesmo século, Marchall Hall propôs o primeiro Código de Ética na experimentação animal, que sugeria a substituição de grandes animais por animais inferiores na escala zoológica, a redução de repetições desnecessárias de ensaios com animais e a preocupação com a diminuição da dor imposta aos animais. No ano de 1842, foi inaugurada a primeira sociedade protetora dos animais, a “*British Society for the Prevention of Cruelty to Animals*”, posteriormente denominada “*Royal Society for the Preventions of Cruelty to Animals*” (Hendriksen <sup>5</sup>; Presgrave <sup>6</sup>).

Leis contra a crueldade aos animais nos Estados Unidos e Reino Unido foram os primeiros estatutos reconhecendo os direitos dos animais, e surgiram no relativo período de paz seguido do fim da Segunda Guerra Mundial (Wilhelmus <sup>7</sup>). Em 1959, William Russel e Rex Burch apresentaram à comunidade científica o livro “*The Principles of Humane Experimental Technique*”, definindo o princípio dos 3R’s, cuja sigla significa “*refinement*”, “*reduction*” e “*replacement*”; o que significa, respectivamente: (1) refino, ou seja, qualquer desenvolvimento tecnológico direcionado a minimizar a incidência e/ou severidade de procedimentos não éticos em experimentação animal, objetivando minimizar a dor e o estresse conferidos aos animais; (2) redução, como

alternativa estratégica resultando em menor número de animais sendo utilizados para obter a mesma informação, ou maximização da informação obtida por animal; e (3) substituição dos testes *in vivo* por testes *in vitro* (Hendriksen <sup>5</sup>; Rowan <sup>8</sup>; Presgrave <sup>6</sup>).

Em 1975, o filósofo australiano Peter Singer lançou o livro intitulado “*Animal Liberation*”, despertando movimentos de proteção aos animais e apontando o Teste de Draize (Figura 1) como o maior alvo de combate para os ativistas (Wilhelmus <sup>7</sup>).



**Figura 1.** Coelhos no Teste de Draize.

Fonte: A = <http://www.rattenclub.ch/dieratte/labor4.html> <sup>9</sup>

B = [http://www.rabbitrehome.org.uk/carrotchronicle/newsletter4\\_2003.asp](http://www.rabbitrehome.org.uk/carrotchronicle/newsletter4_2003.asp) <sup>10</sup>

C = [http://www.askwhy.com/product\\_\(1\).htm](http://www.askwhy.com/product_(1).htm) <sup>11</sup>

A partir da década de 1980, a indústria de cosméticos passou a ser duramente atacada por algumas ONGs e diversos segmentos da sociedade, através de uma campanha contra a utilização de animais para a determinação do potencial de irritação durante o processo de produção de produtos cosméticos (Figura 2). Estas empresas, então, começaram a substituir o Teste de Draize por ensaios de cultura de tecidos e outros métodos *in vitro*, algumas vezes interrompendo totalmente os testes em animais (Holden <sup>12</sup>). Como fruto do desenvolvimento de alguns métodos alternativos e da crescente pressão por parte da opinião pública - que em muitos países passou a boicotar produtos cosméticos de empresas que faziam uso de experimentação animal para avaliação de segurança de seus produtos - já na década de 1980 o número de coelhos utilizados no Teste de Draize pelas companhias de cosméticos diminuiu consideravelmente (Holden <sup>13</sup>).



**Figura 2.** Cartazes de protesto contra o Teste de Draize.

Fonte: [http://www.geocities.com/redeagle\\_pt/crueldade.htm](http://www.geocities.com/redeagle_pt/crueldade.htm)<sup>14</sup>

Neste mesmo período a Europa adotou definitivamente o conceito dos 3R's, criando a Diretiva 86/609, que descreve as leis que regem a proteção dos animais usados em experimentação (Rowan <sup>8</sup>; Balls et al.<sup>15</sup>). Em 1984, o governo britânico concedeu fundos para o desenvolvimento de métodos alternativos ao FRAME – “*Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments*”, que desde 1983, edita uma das principais revistas internacionais na área de métodos alternativos ao uso de animais intitulada ATLA – “*Alternatives to Laboratory Animals*”. Em 1994, foi inaugurado o ECVAM – “*European Committee for Validation of Alternative Methods*”, instituição

pertencente a Comissão Europeia encarregada de promover o desenvolvimento e validar técnicas e metodologias destinadas à substituição dos ensaios em animais (ANVISA <sup>16</sup>). E recentemente, como já citado, a União Europeia através da 7ª emenda da Diretiva 76/768/EEC estabeleceu datas limites para a substituição de todos os testes *in vivo* por testes *in vitro* totalmente validados em estudos que utilizem ingredientes de cosméticos (Pauwels & Rogiers <sup>4</sup>).

### ***1.3. A Origem da Regulamentação de Produtos Cosméticos***

Enquanto hoje discutimos questões éticas sobre a utilização de animais em ensaios pré-clínicos de segurança, a sociedade da década de 1930 sofria conseqüências devastadoras da comercialização de produtos considerados hoje de qualidade inadmissível.

Até meados do século XX, mesmo em países europeus e nos EUA, não era incomum a comercialização de uma diversidade de produtos que, além de não serem testados quanto a sua eficácia, colocavam em risco a saúde de seus consumidores. A necessidade de maior controle por parte das agências regulatórias internacionais, através de uma avaliação criteriosa de produtos disponíveis comercialmente foi tornando-se evidente, conforme as denúncias sobre agravos à saúde associadas à utilização de determinados produtos foram tornando-se públicas (*e.g.* medicamentos como elixir de sulfanilamida, radithor com R226 e R228, talidomida ou produtos cosméticos como *e.g.* maquiagem da linha *Lash Lure*® , creme de depilação *Koremlu*® etc).

Produtos, como o *Berry's Freck*®, uma pomada contendo 12% de mercúrio; *Anti-Mole*®, creme anti-sinais contendo ácido nítrico (5%) e ácido acético glacial (25%); os tônicos capilares *Dr. Dennis's*® e *Dewsberry*® com cloreto de cobre e hidrato de cloro; ou ainda xampus contendo em suas formulações substâncias sabidamente carcinogênicas como o tetracloreto de carbono, eram naquele tempo comercializados livremente (ILAR <sup>17</sup>; Riordan <sup>18</sup>).

A lista de princípios ativos tóxicos presentes em itens de uso para higiene pessoal e embelezamento era significativa. A comercialização de cremes para emagrecimento cujo princípio ativo era o dinitrofenol, composto extremamente tóxico,

hoje usado na indústria de explosivos e como herbicida e inseticida, é mais um exemplo das atrocidades cometidas pela indústria de cosméticos da época. Os fabricantes destes e de outros artigos veiculavam seus produtos em revistas de grande circulação e prometiam ao seu público tratamento revolucionário através de tecnologias inovadoras. Como, por exemplo, o lançamento do creme para depilação *Koremlu*<sup>®</sup> por Dr. Sabouraud, veiculado em importantes revistas de moda como a *Cosmopolitan* e a *Vogue* e comercializado em lojas de renome. Apesar das promessas de “*remover pêlos e ainda beneficiar a pele*”, o produto a base de acetato de tálio, composto extremamente tóxico usado como raticida, causou severos problemas de saúde em suas usuárias como perda generalizada de pêlos, cegueira, paralisia, mialgia etc. (Riordan <sup>18</sup>; <http://www.ahsc.arizona.edu/uac> <sup>19</sup>).

O caso das vítimas de cosméticos da linha *Lash Lure*<sup>®</sup>, um corante para cílios e sobrancelhas, também entrou para história da Toxicologia como uma das maiores tragédias resultante da comercialização de cosméticos de todos os tempos (Wilhelmus <sup>7</sup>). Este produto, a base de parafenileno de amina, deixou pelo menos 12 mulheres cegas e causou a morte de uma pessoa nos EUA (Figura 3).

No final da década de 1930, nos EUA, eram tantos os casos de agravos à saúde e óbitos induzido por produtos de uso comum, que coleções conhecidas como “*The American Chamber of Horrors*”, organizada pela FDA – “*Food and Drug Administration*”, e o *best-seller* americano “*100.000.000 Guinea pigs*” foram publicadas com a finalidade de alertar a opinião pública para tal fato. Estes registros culminaram na publicação, em 1938, do “*The Federal Food, Drug, and Cosmetic Act*”, uma importante lei que pela primeira vez na história 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. O teste de Draize surgiu como fruto da necessidade detectada naquele momento de se controlar a segurança de produtos cosméticos, antes mesmo destes ganharem o mercado consumidor (Kurian <sup>20</sup>).



**Figura 3.** Ilustração divulgada pelo FDA no ano de 1933.

O cartaz descreve o mote da campanha: *Irradie personalidade*, e diz “esta é a versão do fabricante para os efeitos de seu produto” (mostrando a foto de uma das vítimas do *Lash Lure*, uma mulher de 38 anos de Ohio, EUA, horas antes de usar o produto). E depois: “*Totalmente cega: este é o verdadeiro efeito de Lash Lure, em pelo menos um dos casos*” (mostrando a foto da mesma mulher com severa alteração bilateral de córnea, semanas após ter utilizado o produto). Fonte: <http://www.fda.gov/oc/history/historyoffda/section2.html><sup>21</sup> e Wilhelmus<sup>7</sup>.

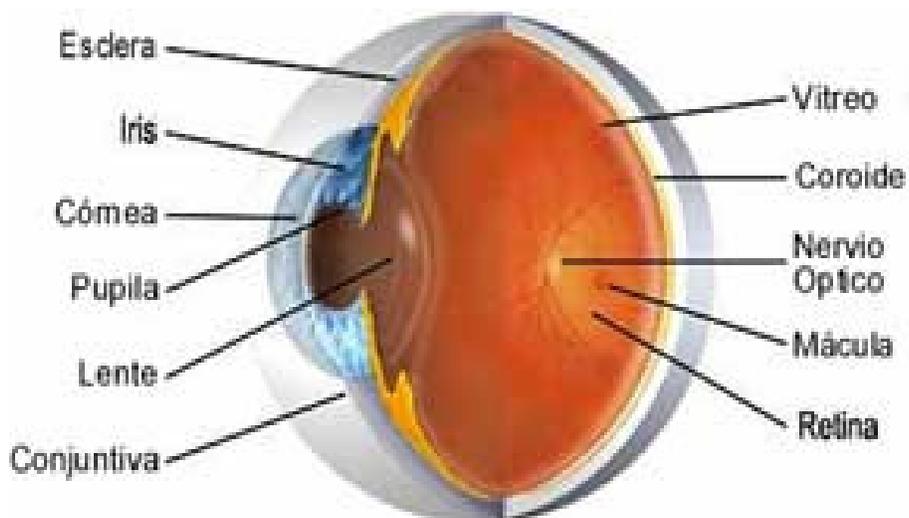
#### ***1.4. Teste de Draize***

John H. Draize (1900-1992) iniciou seus trabalhos na Divisão de Farmacologia do FDA em 1939, tendo como tarefa o desenvolvimento de métodos preditivos para avaliação da segurança de produtos cosméticos. Em 1940, assumiu a chefia do Laboratório de Toxicidade Dérmica e Ocular, onde desenvolveu testes em coelhos para a avaliação da irritação induzida na pele e em mucosas como o pênis e os olhos. Seus trabalhos no FDA geraram em 1944 o famoso artigo Draize et al.<sup>22</sup>, publicado no “*Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*”, que descreveu pela primeira vez o método de avaliação de irritação ocular induzida por substâncias de uso tópico em coelhos. Este método ficou posteriormente conhecido como Teste de Irritação

Ocular de Draize ou, simplesmente, Teste de Draize. Segundo Wilhelmus <sup>7</sup>, o artigo de Draize foi citado cerca de 50 vezes/ano em revistas científicas indexadas durante as décadas de 1980 e 1990, sendo considerado um dos artigos mais citados na área da Toxicologia.

No Teste de Draize a irritação é calculada por uma graduação das alterações e lesões causadas por uma determinada substância-teste instilada diretamente no globo ocular de coelhos (Figura 4), tendo como resultado uma combinação de escores numéricos individuais em períodos de tempo subseqüentes, como: opacidade de córnea, área total afetada da córnea, inflamação da íris, eritema de conjuntiva, inchaço e secreção (Sina et al.<sup>23</sup>; Moldenhauer <sup>24</sup>).

Ao longo dos anos, o Teste de Draize tem sofrido alterações significativas para uma melhor interpretação e classificação das lesões (Kay & Calandra <sup>25</sup>), e principalmente, alterações com o intuito de reduzir o número de animais e minimizar o sofrimento dos mesmos (Sved & Dahlgren <sup>26</sup>). Estas alterações foram descritas em importantes diretrizes internacionais, como *e.g.* OECD – “*Organization for Economic Cooperation and Development*”, e ISO 10993-10 <sup>27</sup>. Entretanto, este tem sido um dos testes mais criticados por aqueles que defendem o bem-estar animal. Críticas adicionais têm surgido por parte da comunidade científica baseadas na subjetividade de avaliação das lesões oculares e variabilidade dos resultados obtidos, e na questionável relevância de se utilizar doses extremamente altas da substância-teste, superestimando assim os efeitos no homem (Spielmann <sup>28</sup>; Wilhelmus <sup>7</sup>). Como resultado, o Teste de Draize é um dos testes mais estudados quanto à sua possível substituição por testes *in vitro*. Porém, apesar de todos os esforços por parte da comunidade científica, ainda não há um método totalmente validado e aceito pelas agências regulatórias mundiais para este fim (Curren & Harbell <sup>29</sup>).



**Figura 4.** Esquema didático do globo ocular.

Fonte: <http://www.retinapanama.com><sup>30</sup>

No Brasil, o controle da qualidade de cosméticos para fins regulatórios ainda é realizado através de testes em animais, e para obter o registro pré-comercialização<sup>1</sup> de seus produtos, a indústria é obrigada a apresentar à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) um dossiê contendo dados de segurança provenientes de estudos conduzidos em animais (entre eles o Teste de Irritação Ocular de Draize, Teste de Irritação Cutânea e Teste de Dermo-sensibilização).

---

<sup>1</sup> Produtos cosméticos são classificados pela ANVISA quanto ao seu potencial tóxico em 2 categorias: produtos de risco I (xampus e condicionadores, sabonetes, desodorantes, cremes hidratantes etc) e produtos de risco II (tinturas e produtos para alisamento de cabelos, produtos de uso infantil, protetores solar etc). Somente para os produtos de risco 2 é exigido o registro pré-comercialização (Resolução RDC nº 211<sup>31</sup>).

### ***1.5. Produtos Cosméticos***

De acordo com a definição conferida pela Legislação vigente, (Resolução RDC nº 211 <sup>31</sup>) produtos cosméticos são “*preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano, pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membranas mucosas da cavidade oral, com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência e ou corrigir odores corporais e ou protegê-los ou mantê-los em bom estado*”.

Por muitos anos têm-se buscado métodos apropriados para a avaliação destes produtos e de suas matérias-primas com relação aos riscos que estes podem representar à saúde humana. A preocupação é pertinente, pois além de pertencerem a um mercado notoriamente crescente em todo o mundo, algumas substâncias contidas em suas formulações podem provocar irritações na pele, mucosas e olhos, efeitos adversos que vão de alergias leves a queimaduras graves, queda de cabelo, ou mesmo asma. Deste modo, pode-se observar três tipos principais de reação (ANVISA <sup>16</sup>): (a) irritação, que é a intolerância local, variando sua intensidade, desde ardor, coceira e pinicação, podendo chegar até a corrosão e destruição do tecido, sendo que todas as reações se restringem à área em contato direto com o produto; (b) sensibilização, que corresponde a um processo alérgico, podendo ser de efeito imediato ou tardio envolvendo mecanismos imunológicos; e (c) efeito sistêmico, resultante da passagem de quaisquer ingredientes do produto para circulação geral.

Segundo o “Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos” (ANVISA <sup>16</sup>), a avaliação de segurança deve preceder a colocação do produto cosmético no mercado. A empresa é responsável pela segurança do produto cosmético, conforme assegurado em um termo de responsabilidade apresentado, onde a mesma declara possuir dados comprobatórios que atestam a eficácia e a segurança de seus produtos. Uma vez que o produto cosmético é de livre acesso ao consumidor, o mesmo deve ser seguro nas condições normais ou razoavelmente previsíveis de uso. A busca dessa segurança deve incorporar permanentemente o avanço do estado de arte da ciência cosmética.

Apesar de numerosos, os produtos cosméticos são formulados com um número razoavelmente restrito de ingredientes. Uma vez que os efeitos observados em estudos

de segurança realizados com o produto acabado são, via de regra, dependentes dos seus componentes, o conhecimento do perfil toxicológico dos mesmos permite avaliar o perfil toxicológico do produto final. No caso de cosméticos como xampus, condicionadores e sabonetes; os tensoativos são as principais substâncias encontradas em suas formulações, e pelo fato destas substâncias apresentarem uma dupla afinidade química, ou seja, serem lipofílicas e também hidrofílicas; são as principais responsáveis pelo efeito de limpeza ou saponificação daqueles cosméticos indicados para este fim (Wolf et al. <sup>32</sup>). Existem quatro tipos principais de tensoativos, classificados pela natureza de sua “cabeça” hidrofílica, são eles: aniônicos, catiônicos, anfóteros e não-iônicos. Os tensoativos aniônicos possuem cargas negativas que devem ser neutralizadas com um material alcalino antes de toda a capacidade detergente ser alcançada; enquanto tensoativos catiônicos são carregados positivamente e devem ser neutralizados por ácidos. Os tensoativos anfóteros incluem ambos os grupos, ácidos (negativos) e básicos (positivos), e os não-iônicos não contém constituintes iônicos. A maioria dos xampus e sabonetes contém uma mistura de dois a quatro tensoativos (Wolf et al. <sup>32</sup>).

Trabalhos experimentais com vários tensoativos demonstraram que sua toxicidade está diretamente relacionada com sua concentração e comprimento da cadeia do grupo lipofílico, e que os tensoativos iônicos freqüentemente exibem maior efeito do que os não-iônicos (Gloxhuber <sup>33</sup>). Segundo Froebe et al. <sup>34</sup>, os tensoativos causam danos significativos tanto em estruturas lipídicas como em protéicas podendo alterar a capacidade de barreira biológica conferida a pele e mucosas. Há uma correlação positiva entre os efeitos irritantes causados por um tensoativo e sua absorção/penetração através de uma barreira biológica e sua habilidade de danificar membranas celulares (Korting et al. <sup>35</sup>; Mizushima et al. <sup>36</sup>). A propriedade dos tensoativos de se adsorver nas interfaces polar/apolar causa uma considerável influência sobre as membranas biológicas, determinando o processo de citólise; sugerindo, com isso, que essa propriedade citotóxica conferida aos tensoativos seja a principal responsável pelos possíveis efeitos irritantes de cosméticos como xampus, condicionadores e sabonetes.

## ***1.6. Alternativas ao Teste de Draize***

Nas últimas décadas, vários grupos de pesquisadores vêm estudando e desenvolvendo métodos alternativos para determinação da irritação ocular (North-Root et al. <sup>37</sup>; Shopsis & Eng <sup>38</sup>; Yang & Acosta <sup>39</sup>; Vian et al. <sup>40</sup>; De Torres et al. <sup>41</sup>; Chiba et al. <sup>42</sup>; Tani et al. <sup>43</sup>; Burdick et al. <sup>44</sup>; Alves et al. <sup>45</sup>; Debbasch et al. <sup>46</sup>; Gerner et al. <sup>47</sup>; Lagarto et al. <sup>48</sup>), tais como: Teste em Membrana Corion-Alantóide de Ovo Embrionado de Galinha (HET-CAM); Opacidade e Permeabilidade de Córnea Bovina (BCOP); Teste em Olho Isolado de Coelho; Teste em Olho Eucleado de Galinha; ensaios de citotoxicidade como o Teste de Hemólise (*Red Blood Cell* - RBC); Ensaio de Captação do Vermelho Neutro (NRU); Ensaio de Quantificação de Proteínas Totais (QPT); Ensaio da Atividade Metabólica Mitocondrial (MTT); Teste de liberação de IL-8; entre outros.

Pode-se dizer que os ensaios *in vitro*, por serem sistemas mais simples e mais facilmente controláveis, apresentam algumas vantagens com relação aos sistemas *in vivo*. Geralmente, são mais sensíveis, reprodutíveis, rápidos, econômicos, produzem uma quantidade menor de resíduos e alguns são sujeitos à automação (Renzi et al. <sup>49</sup>). Por outro lado, o modelo animal é mais complexo, os testes são mais longos, apresentam um maior número de variáveis envolvidas, requerem maior espaço físico e maior demanda de pessoal, são mais caros e envolvem questões éticas importantes. Contudo, os testes *in vivo* são sistemas utilizados há muitos anos e extensamente estudados tornando-se de certa forma sistemas bem conhecidos. Sendo assim, é preciso estar claro que a substituição de testes *in vivo* por ensaios *in vitro* não é simples; a implantação de novas técnicas capazes de substituí-los é um processo lento e gradual, e requer uma análise metodológica e estatística minuciosa (Weiber & Hechler <sup>50</sup>). A complexidade dos sistemas *in vivo* torna extremamente difícil a possibilidade de um único teste *in vitro* vir a prever com exatidão o processo de irritação ocular (Renzi et al. <sup>49</sup>; Roberfroid <sup>51</sup>; European Commission <sup>52</sup>; Princen <sup>53</sup>). É necessário o acesso a uma bateria de testes que sejam complementares, de maneira que o conjunto destes ofereça resultado com os mesmos níveis de embasamento científico, em relação aos obtidos, anteriormente, com os modelos animais (ANVISA <sup>16</sup>).

### ***1.7. Ensaios de Citotoxicidade***

Os ensaios de citotoxicidade têm sido os métodos *in vitro* mais estudados como possíveis alternativas ao Teste de Draize (Guillot<sup>54</sup>; Renzi et al.<sup>49</sup>; Vian et al.<sup>40</sup>; Eun & Suh<sup>1</sup>; Lagarto et al.<sup>48</sup>). A toxicidade celular é um complexo evento, e sua expressão pode se manifestar em um amplo espectro de eventos que vão de complexas aberrações metabólicas à morte celular. Sabe-se que linhagens celulares quando mantidas em cultura dividem-se e multiplicam-se continuamente, e a base destes ensaios está na interferência induzida por agentes químicos justamente neste processo de crescimento celular, interferindo no seu metabolismo e em sua multiplicação, ou mesmo levando à morte celular, refletindo assim na redução do número de células viáveis se comparado com culturas controle não tratadas. Estes ensaios tendem a simplificar os eventos que eles quantificam; contudo, por serem métodos simples, de baixo custo e reprodutíveis, são extensamente empregados (Freshney<sup>55</sup>). Além disso, especificamente com relação à irritação ocular, acredita-se que as reações de citotoxicidade ocorridas *in vivo* em células de córnea são a principal fonte desta irritação (Tani et al.<sup>43</sup>).

Os testes realizados para a medição da viabilidade celular e integridade da membrana citoplasmática, como o NRU que mede a atividade de retenção do corante vermelho neutro pelos lisossomas das células viáveis; o MTT, que mede a atividade mitocondrial das células viáveis em metabolizar sais de tetrazolium; o teste de liberação de enzimas citoplasmáticas como a lactase desidrogenase (LDH); o RBC, que mede a hemólise; entre outros, têm apresentado uma boa correlação com o potencial de irritação ocular determinado *in vivo* (Yang & Acosta<sup>39</sup>; Eun & Suh<sup>1</sup>). Dentre estes “*endpoints*” que fornecem informações sobre diferentes funções celulares e de seus compartimentos, os que utilizam estimativas quantitativas de funções metabólicas como *e.g.* o NRU e MTT, embora precisos e sujeitos à automação, são extremamente dependentes às possíveis modificações fisiológicas celulares, como a atividade lisossomal e mitocondrial. Estes parâmetros são dependentes das condições da cultura celular, que são modificadas consideravelmente por aspectos como densidade celular e secreção celular. Conseqüentemente, somente células crescendo em condições similares podem ser comparadas por estes métodos (Margis & Borojevic<sup>56</sup>).

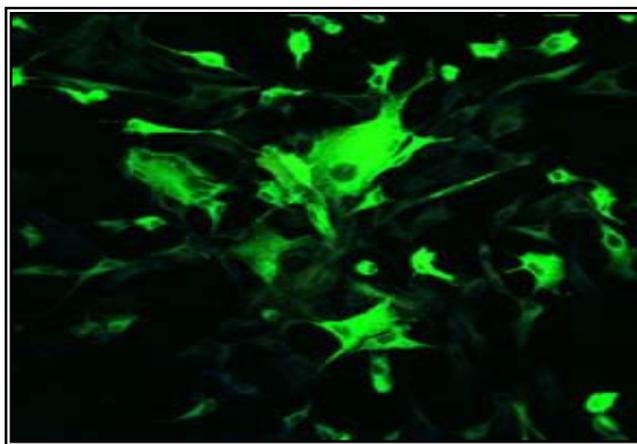
Segundo um extenso programa de estudo interlaboratorial em citotoxicidade realizado pelo FRAME, nenhum outro ensaio de citotoxicidade avaliado apresentou vantagens significativas com relação aos resultados obtidos pelo ensaio de QPT (Knox et al. <sup>57</sup>). Este teste tem como “*endpoint*” o efeito de uma determinada substância-teste sobre o crescimento/proliferação celular, ou seja, o grau de inibição do crescimento celular, relativo com a concentração da substância-teste, fornece um indicativo de toxicidade (Clothier <sup>58</sup>). Este foi o método de escolha para o presente trabalho, pois, apesar de apresentar algumas limitações, como *e.g. i.* quantificar as células indiretamente, ou seja, de forma relativa à quantidade de proteínas totais; e *ii.* os resultados serem dependentes do tipo celular empregado (Eun & Suh <sup>1</sup>); este teste é considerado rápido, sensível, reprodutível, possui simplicidade de execução, custo relativamente baixo, requer reagentes com baixa toxicidade, é sujeito à automação e não é tão dependente das modificações fisiológicas celulares como os ensaios de viabilidade através da avaliação do metabolismo celular (Shopsis & Eng <sup>38</sup>; Knox et al. <sup>57</sup>; Margis & Borojevic <sup>56</sup>).

Este método baseia-se na adsorção, eluição e medição de densidade ótica (D.O.) do corante Azul Brilhante de Coomassie (CBB-R250) que cora proteínas celulares. Há uma relação linear entre proteínas totais dosadas e o número de células. Uma vez que os tensoativos puros ou existentes na composição dos xampus apresentam ação citolítica sobre a cultura de células, o método que quantifica células pelo seu teor protéico pode ser usado diretamente para verificar a ação destas substâncias sobre as células, refletindo um maior efeito citotóxico quanto menor for o teor dosado de proteínas, e um menor efeito quanto mais proteínas forem dosadas. Para isso, a coloração é feita após lavagem das microplacas e fixação das células que permaneceram vivas e aderidas. Esta metodologia permite estocar as microplacas para processamento posterior, além de tornar possível repetir-se o procedimento na mesma amostra. Desta forma, este método indireto pode ser realizado nas mais diversas metodologias onde a quantificação celular é requerida (Margis & Borojevic <sup>56</sup>). Portanto, é possível utilizá-la na avaliação de citotoxicidade de compostos, avaliando diferentes doses, produtos e tratamentos aos quais a monocamada celular é submetida e, além disso, possibilita o uso de microplacas de 96 cavidades, permitindo avaliação simultânea de um grande número de amostras e o uso de lavadoras e leitores automáticos de microplacas, agilizando o processo metodológico (Shopsis & Eng <sup>38</sup>; Renzi et al. <sup>49</sup>).

### ***1.8. SIRC – Linhagem Celular Derivada de Córnea de Coelho***

A lógica por trás da escolha do modelo celular adequado para avaliação da irritação ocular está, principalmente, no uso de: (1) linhagens celulares contínuas ao invés de culturas primárias, pelo fato de serem de melhor manuseio; (2) células obtidas de tecidos dos olhos e (3) células que expressem *in vitro*, o fenômeno observado *in vivo* no Teste de Draize. Para se avaliar estes efeitos citotóxicos causados por um determinado agente químico, não é necessário um estudo profundo de todas as diferentes funções celulares. É aconselhável o uso de linhagens celulares facilmente controláveis, originárias da mesma célula mãe e que possuam curtos períodos de duplicação. Estas, relativamente, homogêneas, estáveis e bem definidas linhagens celulares são, geralmente, derivadas de fibroblastos e células de córnea (Guillot<sup>54</sup>).

A linhagem celular derivada de córnea de coelho (SIRC) tem sido uma das células mais amplamente utilizadas por muitos pesquisadores em vários estudos de fisiologia de córnea, além de estudos imunológicos e toxicológicos (Figura 5). Esta linhagem contínua tem sido extensivamente usada para se prever a irritação ocular, e vem demonstrando uma excelente correlação entre os efeitos *in vivo* e *in vitro* causados por agentes tensoativos e também por cosméticos como xampus (North-Root et al.<sup>37, 59</sup>; Roguet et al.<sup>60</sup>; Yang & Acosta<sup>39</sup>; Hutak et al.<sup>61</sup>). Além de sua origem oftálmica, as vantagens desta linhagem celular estão em sua disponibilidade comercial e facilidade de cultivo (Roguet et al.<sup>60</sup>). Portanto, esta foi a linhagem de escolha para o presente trabalho.



**Figura 5.** Microscopia de fluorescência da linhagem celular SIRC.

Fonte: <http://www.scripps.edu/newsandviews>.<sup>62</sup>

### ***1.9. Relevância do Estudo***

Apesar do Teste de Draize ser um dos principais alvos dos grupos antiviviseccionistas, não existem ainda hoje métodos alternativos para a avaliação da irritação ocular que sejam validados e, portanto plenamente aceitos pelas agências regulatórias mundiais. No caso da avaliação da toxicidade ocular induzida por produtos, assim como em outras situações, sabe-se que um único método alternativo dificilmente será capaz de substituir o uso de animais. Assim, os principais centros internacionais de estudos e validação de métodos alternativos ao uso de animais, como *e.g.* ECVAM na Europa e ICCVAM (*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*) nos EUA recomendam que a comunidade científica: (a) continue a buscar novas metodologias, (b) aprofunde seus conhecimentos a respeito das metodologias pré-existentis (*i.e.* testes de citotoxicidade, teste HET-CAM e ensaios com olho isolado), procurando conhecer as peculiaridades destes métodos e avaliando um maior número de substâncias/classes de substâncias e, (c) sempre que possível, proponha protocolos que sejam sensíveis e reprodutíveis.

Atualmente, há um número considerável de estudos neste sentido, como *e.g.* aqueles que avaliam a aplicabilidade de ensaios de citotoxicidade com células SIRC, 3T3 e L929 com corantes vitais como MTT e NRU (North-Root et al.<sup>37, 59</sup>; Roguet et al.<sup>60</sup>; Young & Acosta<sup>39</sup>; Pasternak & Miller<sup>63</sup>; Tani et al.<sup>43</sup>; Debbasch et al.<sup>46</sup>). No entanto, trabalhos sobre a aplicabilidade do QPT na avaliação do potencial irritante ocular de produtos como alternativa ao teste de Draize são escassos (Vian et al.<sup>40</sup>).

Como o QPT apresenta características importantes, como rapidez, simplicidade de execução, baixo custo, alto grau de automação; além de não ser tão dependente das modificações fisiológicas celulares como os ensaios de viabilidade através da avaliação do metabolismo celular (Shopsis & Eng<sup>38</sup>; Knox et al.<sup>57</sup>; Margis & Borojevic<sup>56</sup>), acreditamos ser importante avaliar de forma consistente sua aplicabilidade na avaliação do potencial irritante ocular. Além disso, o único estudo existente sobre este tema (Vian et al.<sup>40</sup>), avalia somente ingredientes isolados dos produtos acabados (*i.e.* tensoativos), e não formulações como, *e.g.* xampus.

Neste contexto, o presente trabalho pretende contribuir para uma maior compreensão da aplicabilidade deste método de citotoxicidade através da quantificação de proteínas celulares totais na avaliação do potencial de irritação ocular de xampus e tensoativos como mais uma possível alternativa ao Teste de Draize.

## II. OBJETIVOS

### *II.1. Objetivo Geral*

Avaliar a aplicabilidade do método de QPT utilizando o CBB-R250 em células SIRC como uma alternativa ao Teste de Draize para a avaliação da citotoxicidade de xampus e tensoativos.

### *II.2. Objetivos Específicos*

1. Avaliar a correlação existente entre os achados macroscópicos em cada uma das estruturas oculares (córnea, íris e conjuntiva) avaliadas no Teste de Draize e os resultados obtidos *in vitro*;
2. Estabelecer um ponto de corte (*cut-off*) para diferenciação de substâncias irritantes e não-irritantes, e avaliar parâmetros como precisão, sensibilidade e especificidade do método proposto em comparação ao Teste de Draize;
3. Comparar os resultados obtidos com o método de QPT em células SIRC com outros modelos *in vitro* tradicionalmente utilizados para avaliação de toxicidade ocular.

### III. MATERIAS E MÉTODOS

#### *III.1 Soluções Empregadas*

Preparo de soluções de acordo com o Procedimento Operacional Padrão (POP) nº 65.3440.008<sup>64</sup> do INCQS/FIOCRUZ:

#### **PBS 0,01 M pH=7,2 (solução de lavagem)**

##### Solução A

NaHPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 35,61g

Água Deionizada q.s.p. 1000mL

##### Solução B

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 27,6 g

Água Deionizada q.s.p. 1000mL

Homogeneizar 36 mL da solução A + 14 mL da solução B, completando o volume para 100 mL com água deionizada. Ajustar para pH=7,2 e levar até 1000mL com água deionizada, estocar a 4° C.

#### **PBS 0,01 M/ 4% formol (fixador)**

Formaldeído 40% 100 mL

PBS 0,01 M q.s.p. 1000 mL

Estocar a 4° C.

#### **SDS 1% (eluente)**

Dodecilsulfato de Sódio 10 g

Água deionizada q.s.p. 1000 mL estocar a temperatura ambiente

#### **Azul Brillhante de Coomassie 0,2% (corante)**

Azul Brillhante de Coomassie R-250 0,2 g

Ácido Acético Glacial 10 mL

Metanol 40 mL

Água deionizada qsp 100 mL

Filtrar e estocar a temperatura ambiente e ao abrigo da luz

**Solução de Tripsina 0,05% e EDTA 0,02%**

Tripsina 1:250	0,5g
EDTA	0,2g
NaCl	8,0g
KCl	0,4g
Dextrose	1,0g
NaHCO <sub>3</sub>	0,58g

Água deionizada qsp 1000 mL esterilizar por filtração em membrana de 0,22 µm estocar a -20° C.

**Solução de Bicarbonato de Sódio 7,5 %**

Bicarbonato de Sódio	7,5g
----------------------	------

qsp 100 mL esterilizar por filtração em membrana de 0,22 µm estocar a 4° C.

**Solução de Glutamina 3%**

L-Glutamina	3,0 g
-------------	-------

qsp 100 mL esterilizar por filtração em membrana de 0,22 µm estocar a -20° C.

**Solução de Penicilina 10.000UI e Estreptomicina 10mg/mL**

Penicilina G Potássica	1.000.000 UI
Sulfato de Estreptomicina	1g

água destilada qsp 100 mL

esterilizar por filtração em membrana de 0,22 µm estocar a -20° C.

**Solução de Anfotericina 0,025%**

Anfotericina	0,05g
--------------	-------

água destilada qsp 200 mL

esterilizar por filtração em membrana de 0,22 µm estocar a -20° C.

**Solução salina balanceada livre de cálcio e magnésio (BSS.CMF)**

Solução A – 20 vezes concentrada

NaCl	80g
KCl	4g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	3,9g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5g

H<sub>2</sub>O deionizada q.s.p. 500,0mL

Estocar a 4° C. Esta solução pode ser esterilizada por autoclavação.

Solução C – 20 vezes concentrada

Glicose 11g

H<sub>2</sub>O deionizada q.s.p. 500,0mL

Estocar a 4° C.

Solução D – 400 vezes concentrada

Vermelho de fenol 1g

H<sub>2</sub>O deionizada q.s.p. 100,0mL

Solubilizar em água alcalinizada com NaOH 1N e completar o volume.

Estocar a 4° C.

Solução E – 20 vezes concentrada

Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1g

H<sub>2</sub>O deionizada q.s.p. 500,0mL

Estocar a 4° C. Esta solução pode ser esterilizada por autoclavação.

Para o preparo de BSS.CMF 1x, homogeneizar 50mL da solução A + 50mL da solução C + 0,25mL da solução D + 50mL da solução E, completando o volume para 1000mL com água deionizada. Ajustar para pH=7,4 e estocar a 4° C.

**Meio de Cultura DMEM HAM-F12 1x**

Meio base 155,6g

NaHCO<sub>3</sub> 12g

H<sub>2</sub>O deionizada q.s.p. 10L

Este modo de preparo é específico para o reagente Sigma, código D-8900.

Estocar a 4° C.

Meio DMEM HAM-F12 suplementado para manutenção da linhagem celular SIRC em estufa com atmosfera de 3,5% de CO<sub>2</sub>

Soro Fetal Bovino - SFB (Cultilab lote 1210) 100,0mL

Solução de Bicarbonato de Sódio 7,5% 30,0 mL

Solução de Glutamina 3% 15,0mL

Completar o volume para 1000mL qsp de Meio DMEM HAM-F12 1x

Estocar a 4° C.

Meio DMEM HAM-F12 suplementado para diluição dos produtos testados no ensaio de citotoxicidade

Solução de Penicilina/Estreptomicina 10,0mL

Solução de Anfotericina 0,025% 10,0mL

SFB (Cultilab lote 1210) 50,0mL

Solução de Bicarbonato de Sódio 7,5% 30,0mL

Solução de Glutamina 3% 15,0mL

Completar o volume para 1000mL q.s.p. de Meio DMEM HAM-F12 1x

Estocar a 4° C.

### ***III.2 Equipamentos Utilizados***

- Balança Digital Mettler PE 3600.
- Banho Maria Fanen mod. 10212.
- Câmara de Fluxo Laminar marca VECO.
- Capela Química de Exaustão marca BNF.
- Estufa de CO<sub>2</sub> para Cultura Celular marca REVCO.
- Microscópio Invertido Olympus modelo IM.
- Microscópio Óptico Olympus.
- Pipetador Automático Pipet Aid Drummond modelo serial 72834.
- Placa Agitadora Fisatom modelo 704.
- Potenciômetro Analion modelo PM 608.
- Sistema de Criopreservação Cryometal modelo DS-34.
- Bomba de Vácuo/Pressão.
- Sistema de Purificação de Água Milli-Q Millipore.
- Autoclave marca Lutz Ferrando.
- Sistema de Filtração à Vácuo Nalgene volume de 500ml.
- Leitor de Elisa Elx800 Bio-Tek (filtro de 595nm).
- Lavador Automático de Microplacas Elx50 Auto Step Washer Bio-Tek.
- Agitador de Tubos Vortex.
- Micropipetas para volumes de 5-40µl, 50-200µl e 500 - 2500µl.
- Micropipeta Multicanal 40 - 200 µl.
- Cronômetro.

### ***III.3 Materiais e Reagentes de Uso Geral***

- Tubos eppendorf de 1,5 – 2,0mL.
- Pipetas sorológicas de 2,5; 10 e 20mL.
- Ponteiras ajustáveis às micropipetas.
- Estantes para tubos.
- Tubos de ensaio.
- Garrafas para cultivo celular de 25cm<sup>2</sup> e 75cm<sup>2</sup>.
- Béchers.
- Erlenmeyers.
- Provetas.
- Canaletas simples e múltiplas.
- Microplacas de 96 cavidades.
- Adesivos seladores de microplacas.
- Gaze estéril.
- Recipiente para descarte de meio de cultura.
- Recipiente para descartar pipetas sorológicas, tubos e ponteiras.
- Frascos de vidro para descarte do fixador e do corante.
- Luvas de látex descartáveis.
- Câmara de Neubauer (hemocitômetro).
- Azul de Tripan 0,4% p/v.
- Álcool etílico 70% v/v.
- Água destilada.

### ***III.4 Amostras e Substâncias-teste***

Vinte xampus adquiridos em estabelecimentos comerciais no município do Rio de Janeiro (12 infantis e 8 adultos) e cinco tensoativos da marca *Sigma* (Lauril Sulfato de Sódio, L-4509; Triton X-100, x-100; Tween-20, P-1379; Cloreto de Benzalcônio, B-1383; Brometo Cetildimetiletilamônio, C-0636) foram utilizados no presente trabalho.

Cabe ressaltar, que todo o procedimento *in vivo* foi conduzido previamente pela equipe técnica do Departamento de Farmacologia e Toxicologia (DFT) do INCQS e os resultados obtidos neste teste provêm de um banco de dados em software *Microsoft*

*Excel* pertencente a este Departamento. Sendo assim, os 20 xampus aqui estudados foram aqueles, cujos dados *in vivo* estavam incluídos no banco de dados do DFT e que se encontravam disponíveis (mesma marca, mesmo lote e dentro do prazo de validade na ocasião do ensaio *in vitro*) no INCQS.

Todos os produtos foram codificados (1 - 25) e são demonstrados na Tabela 1, a seguir:

**Tabela 1.** Listagem dos xampus e tensoativos testados.

<b>Código</b>	<b>Produto</b>	<b>Tensoativos*</b>
1	Xampu infantil	aniônicos
2	Xampu infantil	aniônicos
3	Xampu infantil	aniônicos
4	Xampu infantil	aniônicos
5	Xampu adulto	aniônicos
6	Xampu infantil	aniônicos
7	Xampu infantil	aniônicos
8	Xampu infantil	aniônicos
9	Xampu infantil	aniônicos
10	Xampu infantil	aniônicos
11	Xampu adulto	aniônicos
12	Xampu adulto	aniônicos
13	Xampu infantil	aniônicos e catiônicos
14	Xampu adulto	aniônicos
15	Xampu adulto	aniônicos
16	Xampu infantil	aniônicos e catiônicos
17	Xampu infantil	aniônicos
18	Xampu adulto	aniônicos
19	Xampu adulto	aniônicos
20	Xampu adulto	aniônicos
21	Lauril Sulfato de Sódio – 30%	Tensoativo aniônico
22	Triton X-100 – 30%	Tensoativo não iônico
23	Tween-20 – não diluído	Tensoativo não iônico
24	Cloreto de Benzalcônio – 1%	Tensoativo catiônico
25	Brometo Cetildimetiletilamônio – 1%	Tensoativo catiônico

\* NATUREZA DOS TENSOATIVOS ENCONTRADOS EM MAIOR CONCENTRAÇÃO NO

### *III.5 Linhagem celular*

Linhagem SIRC obtida da “*American Type Tissue Collection*” (code ATCC CCL 60) e mantida no Setor de Cultura de Células do Laboratório de Vacinas Virais do Departamento de Imunologia do INCQS.

#### *III.5.1 Descongelamento celular*

As células SIRC foram retiradas do reservatório de nitrogênio a  $-196^{\circ}\text{C}$  e descongeladas rapidamente em banho-maria. Em câmara de fluxo laminar, foram transferidas para uma garrafa de cultura contendo aproximadamente 9mL de meio DMEM HAM F12 suplementado para manutenção celular e crescimento em estufa de  $\text{CO}_2$ . O repique foi realizado no momento em que era observada uma monocamada confluyente.

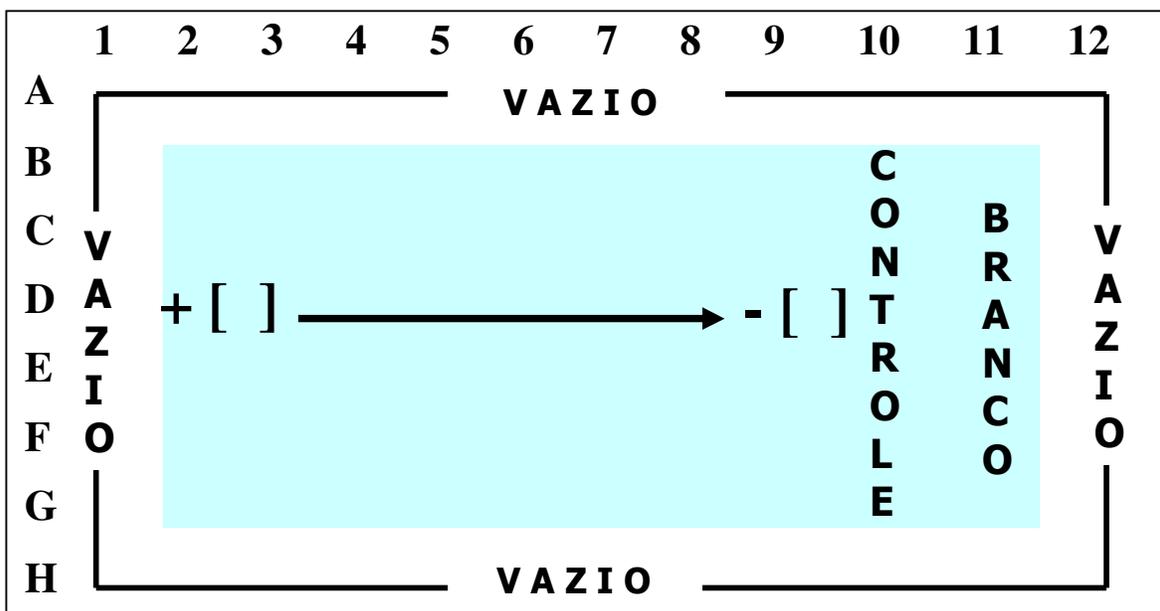
#### *III.5.2 Manutenção de células SIRC*

No momento do repique, a monocamada foi lavada suavemente por duas vezes com aproximadamente 4mL de solução de BSS.CMF para garrafas de  $25\text{cm}^2$  ou 7ml para garrafas de  $75\text{cm}^2$  de forma a enfraquecer as ligações célula-célula e célula-substrato. Após o BSS.CMF ser desprezado, foi adicionada cerca de 2mL de tripsina a 0,05% e EDTA 0,02% para garrafas de  $25\text{cm}^2$  ou 4ml para garrafas de  $75\text{cm}^2$  observando-se até que as células começassem a se individualizar. Então, adicionou-se um igual volume de meio DMEM HAM F12 a 10% de SFB, homogeneizando até se obter uma suspensão celular bem individualizada. A contagem celular foi feita com corante Azul de Tripán (calculando o nº total e a porcentagem da viabilidade celular), num fator de diluição de 1:10 em câmara de Neubauer, levando em conta o número de células viáveis para o preparo de suspensões. Ajustou-se a concentração celular em novas garrafas em aproximadamente  $1,5 \times 10^4$  células/ $\text{cm}^2$ . Completou-se com volume de meio de cultura suplementado com 10% de SFB, 10mL para garrafas de  $25\text{cm}^2$  ou 20mL para garrafas de  $75\text{cm}^2$ , incubando-se a  $36,5^{\circ}\text{C}$  em estufa úmida de  $\text{CO}_2$  até formar novamente uma monocamada completa.

### ***III.6 Ensaio in vitro***

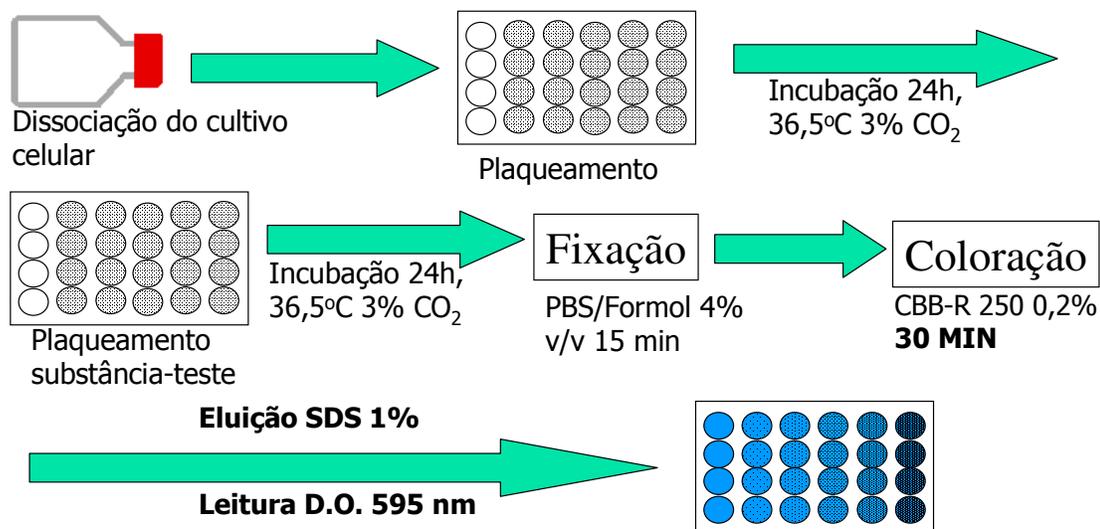
O QPT pelo CBB-R 250 em células SIRC foi realizado conforme proposto por Margis e Borojevic (1989), sendo que no presente trabalho, o mesmo foi adaptado para o uso de microplacas de 96 cavidades e não para microplacas de 24 cavidades. Para tal, estabeleceu-se um protocolo com modificações nos volumes utilizados de cada reagente, no uso de lavador automático de microplacas e no esquema de lavagem das placas após a coloração.

As células SIRC foram semeadas em microplacas de 96 cavidades (excetuando-se as extremidades) no volume de 100µL e concentração de  $1,5 \times 10^5$  células/mL em meio DMEM HAM F12 (10% de SFB) suplementado para manutenção e crescimento celular e mantidas por 24h em estufa a 36,5°C com 3,5% de CO<sub>2</sub>. Depois disso, o meio foi trocado por 100µL de diluições pré-estabelecidas das amostras/substâncias-teste em meio DMEM HAM F12 a 5% de SFB (Figura 6). Após 24h de incubação em estufa a 36,5°C com 3,5% de CO<sub>2</sub>, todo o conteúdo de meio existente nas microplacas foi descartado, procedeu-se à lavagem com PBS 0,01M em lavador automático em quatro ciclos de lavagem. Então, o PBS foi descartado e adicionou-se, em cabine de segurança química, 100µL PBS 0,01M/formol 4% (agente fixador), incubando-se durante 15min. O fixador foi descartado e a placa foi seca à temperatura ambiente. Adicionou-se a cada poço 50µL de solução do corante CBB-R250 0,2% p/v, incubando-se por 30min ao abrigo da luz. O corante foi descartado, a microplaca foi imediatamente mergulhada em um recipiente plástico contendo água destilada e, logo após, lavada manualmente por três vezes, trocando-se o recipiente a cada lavagem e, então, a microplaca foi colocada em um agitador automático por 20min a 500rpm, seguindo-se de uma última lavagem com água destilada. A placa secou-se a temperatura ambiente e o corante foi, então, eluído ao se adicionar 100µL de SDS 1% em cada cavidade deixando agir *overnight*. Então, o eluído foi homogeneizado em cada poço e a D.O. foi medida em leitor de Elisa a 595nm, conforme descrito na Figura 7.



**Figura 6.** Esquema de diluição e distribuição dos xampus/tensoativos em microplaca de 96 cavidades.

Cada concentração da substância-teste foi distribuída em 6 cavidades (B até G) e como resultado obteve-se a média da D.O. referente àquela concentração. Comparou-se então com o resultado obtido no controle para, com isso, *plotar* a curva e calcular o valor de  $IC_{50}$  (controle = células não tratadas; branco = somente o meio de cultura).



**Figura 7.** Representação esquemática do método *in vitro*.

Uma curva inicial foi obtida com oito concentrações de cada produto diluído em meio de cultura (100; 10; 1; 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001 e 0,00001mg/mL). A partir daí, uma segunda curva com uma faixa mais estreita de oito concentrações foi realizada a partir do resultado da primeira curva. A concentração em que se obteve, nesta segunda curva, a redução de 50% na absorvância quando comparado as células não tratadas (controle) foi considerada a concentração de efeito citotóxico (*i.e* IC<sub>50</sub> ou concentração inibitória 50%). O valor de IC<sub>50</sub> para cada produto testado foi calculado pela média de três ensaios independentes.

### III.7 Ensaio *in vivo*

O ensaio *in vivo* foi realizado segundo o POP nº 65.3330.004<sup>65</sup> do INCQS/FIOCRUZ, cujo objetivo é a detecção e avaliação do potencial de irritabilidade para o homem, de qualquer substância ou produto acabado que possa entrar em contato com os olhos. Como mencionado anteriormente, todo o procedimento *in vivo* havia sido conduzido previamente à realização do ensaio *in vitro* pela equipe técnica do DFT/INCQS, e o mesmo encontra-se descrito em Anexo.

### III.8 Análise Estatística

Regressões lineares e correlações através do coeficiente de Pearson e Spearman foram utilizadas para comparar os resultados obtidos nos métodos *in vivo* e *in vitro* através do software MINITAB 10.5 (MINITAB *Statistical Software*<sup>TM</sup>, Minitab Inc., PA, USA, 1995). Além disso, foi montada uma tabela de contingência, calculando-se a sensibilidade, especificidade e precisão do teste *in vitro* com relação ao teste *in vivo*, como se pode observar a seguir:

		<i>in vitro</i>	
		NI	I
<i>in vivo</i>	NI	a	b
	I	c	d

\* NI = não irritante; I = irritante.

Onde:

- 1) Sensibilidade é a capacidade da metodologia *in vitro* detectar os produtos positivos (irritantes) =  $d / c + d$ ;
- 2) Especificidade é a capacidade da metodologia *in vitro* detectar os produtos negativos (não irritantes) =  $a / a + b$ ;
- 3) Precisão é a capacidade da metodologia *in vitro* fornecer os mesmos resultados que o teste *in vivo* =  $a + d / a + b + c + d$ .

## IV. RESULTADOS

Nesta seção serão apresentados os resultados obtidos no ensaio *in vitro* pelo QPT utilizando o CBB-R 250 para avaliação da citotoxicidade de xampus e tensoativos em células SIRC, correlacionando-os com os resultados destes mesmos produtos (e mesmos lotes) no ensaio *in vivo* (Teste de Draize) oriundos do banco de dados do DFT/INCQS.

### IV.1 Resultados *in vivo*

Neste estudo, foram avaliados 25 produtos/tensoativos; 12 xampus infantis, 08 xampus de uso adulto e 05 tensoativos. A Tabela 4 mostra a distribuição destes produtos tanto pela classe a que pertencem (xampus infantis, adultos ou tensoativos), quanto pela classificação segundo o teste de Draize.

**Tabela 4.** Classificação dos produtos/tensoativos obtida no ensaio *in vivo*.

	NI	IL	IM	IS	IMax
<b>Infantil</b>	1 (8%)	3 (25%)	6 (50%)	2 (17%)	0 (0%)
<b>Adulto</b>	0	1 (12,5%)	4 (50%)	3 (38%)	0
<b>Tensoativo</b>	1 (20%)	0	0	0	4 (80%)
<b>Total</b>	2 (8%)	4 (16%)	10 (40%)	5 (20%)	4 (16%)

NI: não irritante; IL: levemente irritante; IM: irritante moderado; IS: irritante severo e IMax: irritante máximo

É digno de nota, o fato de somente 01 (8%) dentre os 12 produtos de uso infantil aqui estudados ter sido classificado *in vivo* como não irritante. O restante dos produtos de uso infantil foi classificado como segue: 03 (25%) levemente irritantes, 06 (50%) irritantes moderados e 02 (17%) irritantes severos.

Foram avaliados 08 produtos da linha adulta. Nenhum destes recebeu classificação não irritante. Destes, somente 01 (12,5%) foi classificado como levemente irritante, 04 (50%) receberam a classificação irritante moderado e 3 (38%) a classificação irritante severo.

Dentre os tensoativos estudados, somente o tween 20 foi testado puro no ensaio *in vivo*. Mesmo puro, este tensoativo não-iônico foi classificado como não irritante. Todos os outros tensoativos foram testados *in vivo* em diluições de 1% (cloreto de benzalcônio e brometo cetildimetilamônio) ou 30% (lauril sulfato de sódio e triton X-100), conforme descrito na Tabela 1. Estas diluições foram pré-estabelecidas em estudos da relação dose-resposta conduzidos no DFT/INCQS, onde grupos de 05 animais foram testados com doses crescentes da substância-teste (*e.g.* 1%, 10% ou 30%) até atingirem a classificação de irritante moderado. Os tensoativos que, mesmo diluídos, foram classificados como irritantes moderados, foram então considerados na classificação final como irritantes máximos (Tabela 6). No presente estudo, os tensoativos lauril sulfato de sódio, triton X-100, cloreto de benzalcônio e brometo cetildimetilamônio receberam a classificação máxima (irritante máximo) no teste de Draize.

Os valores de pH dos xampus estudados variaram entre 5,24 e 7,07; como mostra a Tabela 6. Dentre os 12 produtos infantis aqui estudados, somente 02 (17%) encontram-se dentro da faixa aceitável de pH (7,0 a 8,5) preconizada pelo Ministério da Saúde para xampus infantis (Decreto nº 79.094 <sup>66</sup>).

#### ***IV.2 Resultados in vitro***

As médias de IC<sub>50</sub> de cada um dos 20 xampus e 5 tensoativos foram obtidas dos três experimentos *in vitro* realizados independentemente e estão ordenadas na Tabela 5.

Os valores médios de IC<sub>50</sub> aqui obtidos variaram entre 0,003 e 2,676mg/mL. Os menores valores IC<sub>50</sub> deste estudo foram observados nos dois únicos tensoativos catiônicos aqui avaliados, *i.e.* o cloreto de benzalcônio (produto 24 = 0,004mg/mL) e o brometo cetildimetilamônio (produto 25 = 0,003mg/mL). As IC<sub>50</sub> destes produtos foram cerca de 10 vezes menores que aquelas observadas para o tensoativos lauril sulfato de sódio (produto 21 = 0,040mg/mL) e triton X-100 (produto 22 = 0,030mg/mL) e cerca de 400 vezes inferiores ao IC<sub>50</sub> médio do único tensoativo não irritante aqui estudado, o tween-20 (produto 23 = 1,208mg/mL).

A Tabela 5 mostra ainda os valores de regressão linear das curvas obtidas em cada um dos três experimentos independentes realizados para cada um dos 25 produtos/tensoativos. Os valores de regressão linear variaram entre 0,8316 e 0,9978.

**Tabela 5.** Resultados gerais dos testes *in vitro*.

Produtos	IC <sub>50</sub> (mg/mL)*			Regressão Linear**			Média (IC <sub>50</sub> ) (mg/mL)
	(1º)	(2º)	(3º)	R <sup>2</sup> (1º)	R <sup>2</sup> (2º)	R <sup>2</sup> (3º)	
<b>1</b>	2,6085	2,3935	3,0265	0,9590	0,9960	0,9959	2,676
<b>2</b>	1,1666	0,9092	0,9821	0,9978	0,9587	0,9466	1,019
<b>3</b>	0,8085	0,7833	0,6856	0,9417	0,9035	0,9420	0,759
<b>4</b>	0,5404	0,5376	0,5313	0,9174	0,8929	0,9220	0,536
<b>5</b>	0,7536	0,7797	0,6863	0,8316	0,9517	0,9908	0,740
<b>6</b>	0,3930	0,3537	0,3240	0,9928	0,9073	0,9025	0,357
<b>7</b>	0,4686	0,6303	0,5880	0,8746	0,8936	0,9053	0,562
<b>8</b>	0,4163	0,4004	0,4120	0,9704	0,9635	0,9861	0,410
<b>9</b>	0,5762	0,7320	0,6200	0,9845	0,9261	0,9692	0,643
<b>10</b>	0,5739	0,4818	0,5205	0,9917	0,9465	0,9969	0,525
<b>11</b>	0,1842	0,2342	0,1955	0,9423	0,9017	0,9373	0,205
<b>12</b>	0,4714	0,3248	0,4410	0,9539	0,9897	0,9443	0,412
<b>13</b>	0,4097	0,4855	0,5576	0,9974	0,9836	0,9976	0,484
<b>14</b>	0,4985	0,5884	0,5721	0,9573	0,9763	0,9762	0,553
<b>15</b>	0,4145	0,4257	0,4528	0,9929	0,8756	0,9953	0,431
<b>16</b>	0,4048	0,5169	0,4881	0,9910	0,9779	0,9584	0,470
<b>17</b>	0,4638	0,4264	0,5000	0,9229	0,8957	0,9805	0,463
<b>18</b>	0,3441	0,3207	0,3503	0,9302	0,9966	0,9352	0,338
<b>19</b>	0,2836	0,1702	0,3100	0,9521	0,9567	0,9871	0,255
<b>20</b>	0,3754	0,3552	0,3937	0,9247	0,8409	0,9856	0,375
<b>21</b>	0,0401	0,0377	0,0407	0,9801	0,8866	0,9310	0,040
<b>22</b>	0,0213	0,0377	0,0311	0,9659	0,9077	0,9531	0,030
<b>23</b>	1,4857	0,8561	1,2808	0,8827	0,9594	0,9353	1,208
<b>24</b>	0,0051	0,0040	0,0023	0,9706	0,9872	0,9784	0,004
<b>25</b>	0,0043	0,0022	0,0029	0,9830	0,9354	0,9072	0,003

\*IC<sub>50</sub> e \*\*Regressão linear obtidos em cada um dos três experimentos independentes.

### IV.3 Comparação entre os Testes *in vivo* e *in vitro*

A classificação dos produtos e tensoativos de acordo com a graduação das lesões obtidas nos testes *in vivo*, juntamente com as médias de IC<sub>50</sub> dos experimentos *in vitro*, encontram-se na Tabela 6.

**Tabela 6.** Comparação entre as classificações obtidas no ensaio *in vivo* e o valor médio de IC<sub>50</sub> *in vitro*.

	Produtos	pH**	<i>in vivo</i> Classificação	<i>in vitro</i> IC <sub>50</sub> (mg/mL)
1	Xampu infantil	6,60	NI	2,676
2	Xampu infantil	6,81	IL	1,019
3	Xampu infantil	5,24	IL	0,759
4	Xampu infantil	7,07	IL	0,536
5	Xampu adulto	6,91	IL	0,740
6	Xampu infantil	6,80	IM	0,357
7	Xampu infantil	6,55	IM	0,562
8	Xampu infantil	7,01	IM	0,410
9	Xampu infantil	5,64	IM	0,643
10	Xampu infantil	6,69	IM	0,525
11	Xampu adulto	6,16	IM	0,205
12	Xampu adulto	6,24	IM	0,412
13	Xampu infantil	5,58	IM	0,484
14	Xampu adulto	6,16	IM	0,553
15	Xampu adulto	6,72	IM	0,431
16	Xampu infantil	6,71	IS	0,470
17	Xampu infantil	5,38	IS	0,463
18	Xampu adulto	7,06	IS	0,338
19	Xampu adulto	6,17	IS	0,255
20	Xampu adulto	6,46	IS	0,375
21	Lauril Sulfato de Sódio 30% *	-	IMax	0,040
22	Triton X 100 30% *	-	IMax	0,030
23	Tween 20	-	NI	1,208
24	Cloreto de Benzalcônio 1% *	-	IMax	0,004
25	Brometo Cetildimetilamônio 1% *	-	IMax	0,003

\*: Tensoativos testados diluídos *in vivo* e não-diluídos *in vitro*.

\*\* : Faixa de pH permitido pela ANVISA para xampus infantil: 7,0 a 8,5.

Os coeficientes de correlação de Pearson e Spearman entre os valores de IC<sub>50</sub> do teste *in vitro* e os escores das três estruturas oculares (córnea, íris e conjuntiva) e escore total de Draize encontram-se descritos na Tabela 7.

Os coeficientes de correlação se afiguram de bom calibre quando os valores obtidos *in vitro* são comparados ao escore total de Draize: -0,617 ( $p=0,003$ ) pelo coeficiente de correlação de Pearson e -0,738 ( $p=0,000$ ) pelo coeficiente de correlação de Spearman.

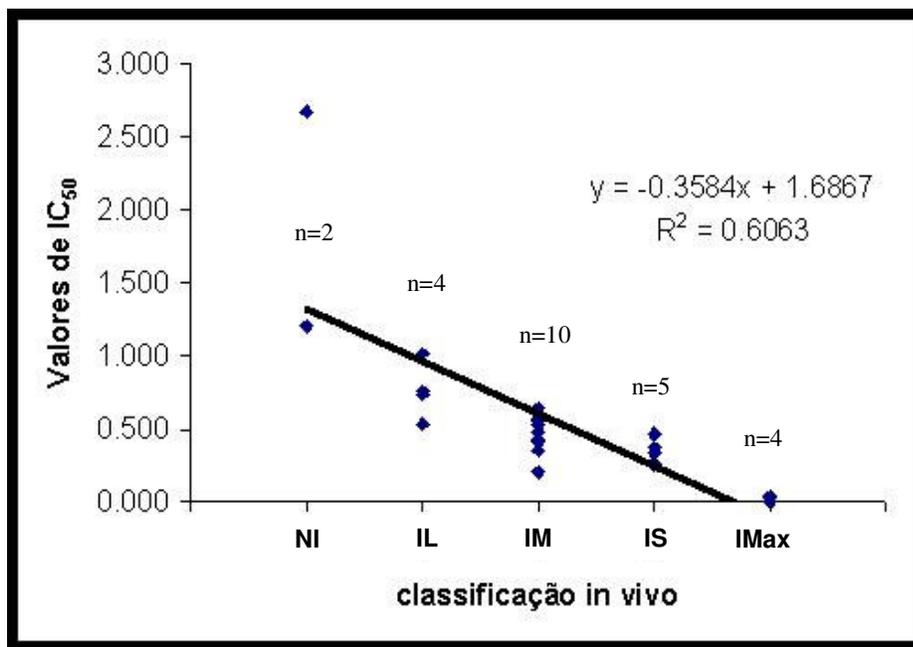
Com relação as estruturas oculares, pode-se dizer que os valores de IC<sub>50</sub> do teste *in vitro* se correlacionam melhor com os achados macroscópicos de conjuntiva e córnea do que com aqueles obtidos após análise da íris (Tabela 7).

**Tabela 7.** Coeficiente de correlação (Pearson e Spearman) relacionando os valores de IC<sub>50</sub> com os escores das estruturas oculares dos ensaios *in vivo*.

	<b>Correlação de Pearson</b>	<b>Correlação de Spearman</b>
Córnea	-0,568 ( $p=0,007$ )	-0,750 ( $p=0,000$ )
Íris	-0,473 ( $p=0,030$ )	-0,603 ( $p=0,004$ )
Conjuntiva	-0,731 ( $p=0,000$ )	-0,686 ( $p=0,001$ )
Escore Total	-0,617 ( $p=0,003$ )	-0,738 ( $p=0,000$ )

N=21, somente os produtos testados puros no ensaio *in vivo* foram utilizados para o cálculo dos coeficientes de Pearson e Spearman.

A regressão linear entre todos os valores de IC<sub>50</sub> (N=25) e as classificações dos produtos no *ensaio in vivo* foi de 0,6063; como pode ser observado na Figura 8.



**Figura 8.** Regressão linear entre os valores de IC<sub>50</sub> e a classificação dos produtos no *ensaio in vivo*.

#### ***IV.4 Preditibilidade do Teste in vitro***

Para avaliar o grau de preditibilidade do teste *in vitro* em relação ao teste de Draize foi necessário que se estabelecesse um ponto de corte (*cut-off*) para diferenciação de substâncias irritantes daquelas não-irritantes no teste *in vitro*.

Para estabelecer o *cut-off*, agrupamos “produtos/tensoativos” classificados *in vivo* como não-irritantes e levemente irritantes numa única categoria (NI/IL, Tabela 8), obtivemos um novo grupo com N=6, todos apresentando o escore máximo no teste de Draize <24,9 (Tabela 2). Consideramos, então, este valor como um novo ponto de corte (*cut-off*) na diferenciação entre substâncias irritantes (>24,9) e substâncias não-irritantes (<24,9) *in vivo*<sup>2</sup>.

Ao analisarmos os valores obtidos *in vitro*, observamos que dentre os 06 produtos com escore *in vivo* <24,9; 05 apresentam valores de IC<sub>50</sub> >0,700mg/mL, e ainda, todos os produtos com escore *in vivo* >24,9 apresentam valores de IC<sub>50</sub> <0,700mg/mL (Tabela 8). Considerando este como um possível ponto de corte para diferenciação de substâncias como irritantes (<0,700mg/mL) ou não-irritantes (>0,700mg/mL) no teste *in vitro*<sup>3</sup>, calculamos os valores de precisão, sensibilidade e especificidade, conforme descrito no item III.8 de material e métodos.

Assim, a precisão do ensaio *in vitro* foi de 96%, a sensibilidade de 100% e a especificidade de 83% (Figura 9). O produto nº 4 (xampu infantil contendo em sua composição tensoativos aniônicos) apresentou resultado falso-positivo (*i.e.* irritante *in vitro* e não-irritante *in vivo*).

		<i>in vitro</i>	
		Não-irritante	Irritante
<i>in vivo</i>	Não-irritante	<b>N = 5</b>	<b>N = 1</b>
	Irritante	<b>N = 0</b>	<b>N = 19</b>

**Figura 9.** Tabela de Contingência.

---

<sup>2</sup> Muitos autores consideram que o grau de lesão induzido no olho do coelho após a aplicação de substâncias classificadas como levemente irritantes é pouco significativo e representa baixo risco quando extrapolado para a situação de exposição humana. Isso porque as condições experimentais do teste de Draize são maximizadas, *i.e.* a substância-teste é aplicada sem diluição, é instilada diretamente no saco conjuntival do animal e a exposição é de longa duração quando comparada com a situação de exposição no homem, uma vez que não há enxague do produto (Freeberg et al.<sup>67</sup>; Roggerband et al.<sup>68</sup>).

<sup>3</sup> Existe na literatura um artigo (Vian et al.<sup>40</sup>) que avalia a aplicabilidade do QPT em células SIRC na determinação de irritação ocular induzida por tensoativos como alternativa ao Teste de Draize. Assim como em nosso estudo, estes autores consideraram o valor de IC<sub>50</sub>=0,700mg/mL como *cut-off* na diferenciação entre irritantes e não-irritantes.

**Tabela 8.** Comparação dos resultados obtidos nos ensaios *in vivo* e *in vitro* com base nos valores de *cut-off*.

Produto	<i>in vivo</i>		<i>in vitro</i>	
	Classificação	Graduação	Classificação	Graduação
1	NI/IL	<24,9	NI	>0,700
2	NI/IL	<24,9	NI	>0,700
3	NI/IL	<24,9	NI	>0,700
4*	NI/IL	<24,9	I	<0,700
5	NI/IL	<24,9	NI	>0,700
6	IM	>24,9	I	<0,700
7	IM	>24,9	I	<0,700
8	IM	>24,9	I	<0,700
9	IM	>24,9	I	<0,700
10	IM	>24,9	I	<0,700
11	IM	>24,9	I	<0,700
12	IM	>24,9	I	<0,700
13	IM	>24,9	I	<0,700
14	IM	>24,9	I	<0,700
15	IM	>24,9	I	<0,700
16	IS	>24,9	I	<0,700
17	IS	>24,9	I	<0,700
18	IS	>24,9	I	<0,700
19	IS	>24,9	I	<0,700
20	IS	>24,9	I	<0,700
21	IMax	>24,9	I	<0,700
22	IMax	>24,9	I	<0,700
23	NI/IL	<24,9	NI	>0,700
24	IMax	>24,9	I	<0,700
25	IMax	>24,9	I	<0,700

\*: Produto falso-positivo

## V. DISCUSSÃO

### V.1. Avaliação da Qualidade dos Produtos Estudados

O artigo 50 do Decreto nº 79.094 <sup>66</sup>, de 05 de janeiro de 1977, dispõe sobre produtos de higiene e cosméticos para uso infantil e é claro quanto à proibição de xampus infantis com potencial irritante ocular. Segundo este Decreto, “*xampus destinados à limpeza do cabelo e do couro cabeludo das crianças por ação tensoativa ou absorção sobre sujidades podem ser apresentados em formas e veículos apropriados, mas sem ser irritantes ao couro cabeludo e aos olhos da criança, devem ser facilmente removíveis após a sua aplicação e o pH deve estar compreendido entre os limites de 7,0 (sete vírgula zero) e 8,5 (oito vírgula cinco)*”.

Os dados apresentados em nosso estudo mostram, claramente, uma discrepância entre a Lei em vigor e a situação real dos produtos comercializados no município do Rio de Janeiro. Dentre os 12 xampus infantis aqui avaliados, somente 01 (8%) foi aprovado no Teste de Draize, embora seu pH estivesse fora da faixa preconizada para a linha infantil. Além disso, somente 02 (17%) dos produtos infantis encontravam-se dentro do limite aceitável de pH (7,0 a 8,5) preconizado pelo Ministério da Saúde para xampus infantis (Decreto nº 79.094 <sup>66</sup>).

A situação é ainda mais crítica entre os produtos de uso adulto, *i.e.* todos os xampus adultos foram reprovados no Teste de Draize e 38% deles foram classificados como irritantes severos. Embora se saiba que as condições maximizadas do Teste de Draize representam uma limitação importante deste teste, podemos dizer que os resultados obtidos em nosso estudo evidenciam que - pelo menos sob o ponto de vista de toxicidade ocular - a maioria destes produtos comercializados no município do Rio de Janeiro não são seguros.

### V.2. Limitações do Teste de Draize

Nenhum outro teste em animais tem apresentado tantas controvérsias com relação a sua substituição por testes *in vitro* quanto o Teste de Draize, embora

inicialmente se tenha acreditado que sua substituição fosse tarefa relativamente simples. Desde o início da década de 1980, numerosos testes alternativos têm sido desenvolvidos e, em alguns casos até mesmo submetidos à validação. Porém, a comunidade científica ainda não encontrou um teste (ou grupo de testes) capaz de substituir plenamente o método *in vivo* para avaliação da irritação ocular. Qual seria o motivo para tal quadro?

Primeiramente, para muitas das alternativas estudadas, não se tem observado suficiente concordância entre o teste de escolha e os mecanismos que realmente influenciam o processo da irritação ocular. Além disso, a variabilidade intra/inter-laboratorial dos resultados encontrados no Teste de Draize, sobretudo na avaliação daquelas substâncias que causam irritação leve a moderada, potencializa tal problema. Os fatos que contribuem para esta considerável variabilidade de resultados no Teste de Draize são bem conhecidos da comunidade científica. Um deles (e talvez o principal) diz respeito à subjetividade do processo de avaliação das lesões oculares, fato que leva muitas vezes a discordâncias entre diferentes observadores e, portanto, à variação inter-laboratorial (Wilhelmus<sup>7</sup>; Prinsen<sup>53</sup>). Além disso, alguns pesquisadores têm discutido sobre as condições pouco realistas de exposição ocorridas no Teste de Draize, como o fato de se instilar a substância-teste diretamente no saco conjuntival do coelho e se comparar o potencial de exposição de tal substância ao homem em uma situação real (Freeberg et al.<sup>67</sup>; Roggerband et al.<sup>68</sup>). Muitos autores consideram que o grau de lesão induzido no olho do coelho após a aplicação de substâncias classificadas como levemente irritantes é pouco significativo e representa baixo risco quando extrapolado para a situação de exposição humana. O fato do Teste de Draize superestimar possíveis efeitos adversos é considerado, portanto, um fator limitante deste teste e a sensibilidade do Teste de Draize parece estar mais relacionada às condições maximizadas de exposição preconizadas nesta metodologia do que propriamente à sensibilidade específica do tecido ocular dos animais (Prinsen<sup>53</sup>).

Para a maioria dos testes de toxicidade utilizados rotineiramente, os níveis de dose, as vias de administração e a duração da exposição à droga em questão são bem definidos. No Teste de Irritação Dérmica, por exemplo, a aplicação da substância-teste é delimitada por bandagens sobre uma área de pele do animal definida e o período de sua exposição é preciso. Por outro lado, no Teste de Draize, nenhum destes parâmetros são bem estabelecidos. Para líquidos, sólidos e substâncias pastosas é impossível estimar qual quantidade e por quanto tempo a substância-teste permanece em contato com o

olho do animal. Para formulações aquosas e não-viscosas, a instilação padronizada de 0,1mL no saco conjuntival de coelhos resulta, geralmente, em uma rápida remoção do material através do lacrimejamento e do frequente piscar dos olhos do animal. Isto se contrasta com o que ocorre quando o mesmo é tratado com pastas ou substâncias viscosas que não são removidas tão facilmente. Contudo, a mais dramática variação com relação ao tempo de exposição e a quantidade da substância-teste ocorre na avaliação de substâncias sólidas (e.g. maquiagens), pois a quantidade exata que permanece em contato com os olhos do animal é imprevisível. Em testes realizados antes de abril de 2002, data da última atualização da *guideline* nº 405 da OECD (OECD <sup>69</sup>; <http://www.oecd.org> <sup>70</sup>), o período de exposição à substâncias sólidas podia variar de alguns minutos à 24 horas. Isso porque até a revisão descrita nesta *guideline* não era permitido lavar os olhos dos animais antes da leitura do período de 24 horas de exposição. Somente recentemente, através desta atualização, passou a ser permitida a lavagem dos olhos dos animais em teste 01 hora após o início do tratamento com substâncias sólidas (Prinsen <sup>53</sup>).

Apesar de haver consenso entre pesquisadores envolvidos em estudos de validação sobre a variabilidade intra/inter-laboratorial de resultados encontrada no Teste de Draize, sobretudo na avaliação de substâncias pastosas e sólidas, a atitude geral continua sendo a de se tentar adequar e comparar os testes *in vitro* com o Teste de Draize, pelo simples fato deste ser o sistema clássico de avaliação de toxicidade ocular, ser o mais estudado e melhor conhecido no meio científico.

### ***V.3. Principais Testes in vitro para a Avaliação do Potencial Irritante Ocular de Produtos***

As alterações celulares e sub-celulares resultantes do contato com uma determinada substância constituem a base do processo patológico ocorrido em um órgão. Com isso, parece lógico o estudo de tais alterações em culturas de células, mesmo que fenômenos mais complexos também estejam relacionados (Guillot <sup>54</sup>). No entanto, não é esperado que um único teste *in vitro* (como e.g. teste de citotoxicidade) seja capaz de substituir por completo o Teste de Draize. Esta substituição irá depender, dentre outros fatores, do estudo de uma bateria de testes *in vitro* com diferentes desfechos (Renzi <sup>49</sup>; Wilhelmus <sup>7</sup>; Debbasch et al. <sup>46</sup>).

O Quadro 2 mostra os principais testes *in vitro* usados para avaliação da toxicidade ocular.

**Quadro 2.** Principais testes *in vitro* usados para avaliação da toxicidade ocular.

<b>Método</b>	<b>Sistema teste</b>	<b>Desfecho</b>
Opacidade e Permeabilidade de Córnea Bovina (BCOP)	Córnea isolada de bovino	Opacidade e permeabilidade da córnea
Teste em Membrana Corion-Alantóide de Ovo Embrionado de Galinha (HET-CAM)	Ovo de galinha	Danos na membrana corion-alantóide
Chorioallantoic membrane-trypan-blue staining (CAM-TBS)	Ovo de galinha	Danos na membrana corion-alantóide
Isolated rabbit eye test (IRE)	Olho isolado de coelho	Edema corneal, opacidade corneal e retenção de fluoresceína
Isolated chicken eye test (IRE)	Olho isolado de galinha	Edema corneal, opacidade corneal e retenção de fluoresceína
Fluorescein leakage test (FL)	Células MDCK *	Danos causados nas junções das células
Ensaio de Captação do Vermelho Neutro (NRU)	Células SIRC e 3T3	Viabilidade celular
<i>Red Blood Cell</i> – Teste de Hemólise (RBC)	Amostra de sangue de bovino	Dano à membrana citoplasmática em combinação com dano às proteínas celulares (desnaturação)
Agarose diffusion method	Fibroblasto de camundongos (L-929)	Morte celular
EpiOcular	Epitélio corneal humano reconstituído	Viabilidade celular, liberação de mediadores inflamatórios e permeabilidade celular

\*: Mardin-Darby canine kidney

Fonte: Alves <sup>71</sup>.

#### V.4. Estratégias de Avaliação do Potencial Irritante Ocular de Produtos

Apesar dos testes *in vitro* apresentarem vantagens significativas como *e.g.* possibilidade de permitir repetições ou análises simultâneas dentro de um período curto de tempo, produção de menores volumes de resíduos tóxicos, redução de custos etc; nestes modelos não há possibilidade de se observar/avaliar as características morfológicas e fisiológicas encontradas nos métodos *in vivo* e, via de regra, são estudos de curta duração, apresentando limitações quanto à avaliação dos efeitos toxicológicos a longo prazo (Eun & Suh <sup>1</sup>). As Tabelas 9 e 10 mostram as principais vantagens e desvantagens do Teste de Draize e dos principais sistemas *in vitro* para predição do potencial irritante ocular.

**Tabela 9.** Principais vantagens e desvantagens do Teste de Draize.

<b>Teste de Draize</b>	
<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
⇒ Sistema íntegro: é possível a análise do sistema como um todo, <i>i.e.</i> com as interações morfo-fisiológicas de um organismo;	⇒ Avaliação qualitativa e subjetiva, envolvendo um grande número de variáveis;
⇒ Estudo de maior duração, permitindo observar efeitos mais tardios ou mesmo a regressão dos efeitos induzidos;	⇒ Envolve questionamentos éticos (como a questão dos 3 R's);
⇒ Sistema clássico, mais estudado e melhor conhecido.	⇒ Alto custo devido à infra-estrutura de biotérios e dificuldade na transferência tecnologia entre laboratórios;
	⇒ Menor agilidade na liberação dos laudos devido à longa duração do ensaio.

**Tabela 10.** Principais vantagens e desvantagens dos testes *in vitro*.

<b>Testes <i>in vitro</i></b>	
<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
<p>⇒ Condições de exposição bem estabelecidas (controláveis e de simples interpretação);</p>	<p>⇒ Não há possibilidade de se observar e avaliar as interações morfo-fisiológicas que ocorrem no organismo como um todo e que podem influenciar no resultado da avaliação;</p>
<p>⇒ Avaliação final dos resultados é quantitativa (com exceção do HET-CAM)</p>	<p>⇒ São estudos de curta duração, apresentando limitações quanto à avaliação dos efeitos toxicológicos a longo prazo;</p>
<p>⇒ Sistema uma vez implementado requer infra-estrutura mais simples e de menor custo, possibilitando uma maior facilidade na transferência tecnológica, <i>e.g.</i> LACENS (Laboratórios Centrais de Saúde Pública), REBLAS (Laboratórios da Rede Brasileira de Laboratórios Analítico-Certificadores), indústrias etc;</p>	<p>⇒ Há necessidade de uma análise metodológica e estatística minuciosa e a validação de uma bateria de testes com vários desfechos para se poder obter uma avaliação mais completa do potencial irritante de produtos.</p>
<p>⇒ Aumento do espectro de atuação dos LACENS;</p>	
<p>⇒ Maior agilidade na liberação de laudos técnicos;</p>	
<p>⇒ Produção de menores volumes de resíduos tóxicos.</p>	

Grande parte dos testes alternativos baseia-se na avaliação da citotoxicidade de um determinado agente químico (Quadro 2). Estes métodos também têm sofrido críticas devido às suas limitações em prever os efeitos associados à irritação ocular no homem (Debbasch et al.<sup>46</sup>). Segundo alguns autores, uma comparação realmente segura deveria ser feita utilizando dados de patologia humana. Todavia, os sintomas no homem são geralmente descritos sem nenhuma medida verdadeiramente padronizada e objetiva dos efeitos tóxicos induzidos. Isto faz com que as comparações dos resultados obtidos *in vitro* sejam, como já citado anteriormente, realizadas com os resultados obtidos em coelhos (Guillot<sup>54</sup>).

Como os resultados “falso-positivos” e “falso-negativos” devem ser interpretados? Estes erros de estimação parecem estar estritamente relacionados com a classe química das substâncias-teste. Assim, substâncias que apresentem pH extremo, ou seja, sabidamente irritantes *in vivo*, podem apresentar resultados subestimados *in vitro*. Por outro lado, substâncias pouco irritantes *in vivo*, em alguns casos, podem apresentar resultados superestimados *in vitro*, devido ao fato dos parâmetros de medição serem mais sensíveis nestes testes de citotoxicidade. Neste contexto, possíveis influências dos componentes dos meios de cultura devem ser levadas em consideração: (a) soro, glicose e algumas proteínas podem exercer efeitos protetores nas células; (b) substâncias do meio podem inativar alguns produtos testados; (c) algumas proteínas do meio podem se desnaturar e induzir uma toxicidade não presente *in vivo* etc. Adicionalmente, deve-se levar em consideração o fato das diferentes solubilidades apresentadas pelas diversas substâncias-teste nos meios de cultura também poderem ser causas deste tipo de problema (Seifreid<sup>72</sup>; Guillot<sup>54</sup>).

A toxicidade *in vitro* pode ser medida por diferentes desfechos, como mudanças na taxa de proliferação, viabilidade ou metabolismo celular. Embora a análise *in vitro* - via de regra - não permita o pleno conhecimento dos mecanismos envolvidos na toxicidade induzida por um dado agente, os ensaios *in vitro* têm suas vantagens reconhecidas pela comunidade científica. Quando utilizadas como métodos de triagem, culturas de células podem permitir a eliminação com antecedência no mercado de muitas das substâncias inadequadas à saúde humana em termos da segurança ao consumidor. Este tipo de método é geralmente mais econômico do que os tradicionais métodos *in vivo*. As funções específicas das células não são essenciais para avaliar a

toxicidade em geral, permitindo, com isso, o uso de linhagens celulares contínuas nestes estudos de citotoxicidade (Guillot <sup>54</sup>).

As linhagens celulares proporcionam modelos bem definidos, confiáveis e prontamente disponíveis à maioria dos investigadores, diminuindo os custos adicionais, a duração do ensaio e a infra-estrutura necessária para manutenção do grande número de animais utilizados no Teste de Draize. Nos ensaios de citotoxicidade, as condições experimentais podem ser rigorosamente definidas, controladas, padronizadas e reproduzidas. Somente uma pequena quantidade da substância-teste é necessária, e há a possibilidade de se obter um bom controle sobre as concentrações e períodos de exposição empregados em cada ensaio (Guillot <sup>54</sup>; Prinsen <sup>53</sup>).

Geralmente os resultados dos ensaios de citotoxicidade são obtidos por automação, e assim medições objetivas e quantitativas são obtidas permitindo uma fácil transferência de tecnologia entre diferentes laboratórios. Esses resultados também permitem que uma curva dose-resposta seja facilmente determinada, demonstrando a quantidade da substância-teste necessária para se obter uma redução de 50% no efeito medido (IC<sub>50</sub>). Além disso, a maioria dos métodos alternativos propostos não requer nenhum equipamento de alto custo ou muito sofisticado (Guillot <sup>54</sup>). Por fim, muitos pesquisadores têm demonstrado que os resultados obtidos nestes ensaios de citotoxicidade apresentam uma boa correlação com aqueles obtidos no Teste de Draize (North-Root et al. <sup>37, 59</sup>; Roguet et al. <sup>60</sup>; Guillot <sup>54</sup>; Renzi et al. <sup>49</sup>; Young & Acosta <sup>39</sup>; Eun & Suh <sup>1</sup>; Hutak et al. <sup>61</sup>).

Contudo, para se escolher modelos de culturas de células capazes de compor uma bateria de testes *in vitro* com objetivo de substituir o Teste de Draize, deve-se levar em consideração tanto à finalidade de cada estudo quanto às classes dos compostos químicos a serem testados. Dependendo em qual propósito o estudo irá se inserir, diferentes objetivos e métodos serão necessários. No caso da indústria química, *e.g.* produtos agroquímicos e saneantes, deve-se estimar qual o risco do produto entrar em contato com os olhos no caso de um acidente, e calcular a possível escala desse acontecimento. Na indústria farmacêutica (colírios, soluções de lentes de contato etc), os estudos deverão ajudar a provar a boa tolerância a um produto que deverá entrar em contato com os olhos voluntariamente. Já na indústria de cosméticos, na maioria das vezes (sabonetes, xampus, cremes hidratantes, perfumes etc) há a necessidade do

conhecimento do potencial apresentado pelos seus produtos de provocarem algum efeito adverso irreversível em caso de uma exposição acidental. Segundo Guillot <sup>54</sup>, no caso de produtos como xampus, até mesmo uma irritação moderada pode ser aceitável. Portanto, o absoluto pré-requisito para se escolher cada modelo será o fato de se ter bem elucidado qual objeto e propósito do estudo.

Em suma, vários testes desenvolvidos foram aceitos e utilizados na avaliação do risco irritativo de ingredientes e produtos cosméticos, entretanto, não há um único teste *in vitro* especificamente indicado para avaliação da irritação ocular que seja totalmente validado até o presente momento. Contudo, baseando-se em protocolos consistentes, qualquer pesquisador treinado pode interpretar os resultados obtidos para comparação entre produtos da mesma categoria. Portanto, alguns destes modelos, apesar de não serem validados<sup>4</sup>, são válidos no sentido de permitirem ao pesquisador dispor de resultados que ele sabe reproduzir e interpretar com finalidade preditiva. Esses modelos podem ser contemplados como testes experimentais de “triagem”, ou seja, de caráter preliminar (ANVISA <sup>16</sup>), e o ideal é se obter dados relacionados aos diferentes mecanismos de irritação como àqueles obtidos dos diferentes ensaios de citotoxicidade (MTT, NRU, RBC, QPT, Citotoxicidade pela Difusão em Gel de Agarose), além de outros tipos de avaliação, como àqueles relacionados à vascularização (hiperemia, hemorragia e coagulação) da membrana cório-alantóide de ovo embrionado de galinha (HET-CAM) e à opacidade e permeabilidade da córnea isolada bovina (BCOP); que são testes *in vitro* clássicos e também extensamente estudados (Spielmann <sup>28</sup>; Debbasch et al.<sup>46</sup>).

### ***V.5. Confronto com Dados da Literatura***

Os resultados encontrados no único estudo disponível nas bases de dados da literatura internacional sobre a aplicabilidade do método QPT na avaliação do potencial irritante ocular de produtos como uma alternativa ao Teste de Draize (Vian et al.<sup>40</sup>) foram confrontados com os resultados obtidos no presente estudo e estão descritos nas Tabelas 11 e 12.

---

<sup>4</sup> Um método validado é aquele que sua relevância e confiabilidade são estabelecidas para um propósito particular em uma série de avaliações interlaboratoriais de acordo com critérios pré-estabelecidos por uma Agência Reguladora, como a ECVAM na EEC. Por outro lado, um método válido é uma técnica que não necessariamente passou por um completo processo de validação, porém que apresenta uma quantidade suficiente de informações científicas capazes de provar sua relevância e confiabilidade (Pauwels & Rogiers <sup>4</sup>).

Vian et al.<sup>40</sup>, assim como no presente estudo, avaliaram os tensoativos lauril sulfato de sódio, triton X-100, tween 20, cloreto de benzalcônio e brometo cetildimetiletilamônio. Assim como em nosso estudo, o *cut-off* entre substâncias irritantes e não-irritantes foi estabelecido em 0,700mg/mL. Os valores médios de IC<sub>50</sub> estão descritos na Tabela 11, assim como os tensoativos que foram então considerados irritantes ou não-irritantes.

Há uma boa concordância entre os valores de IC<sub>50</sub> médios obtidos por Vian et al.<sup>40</sup> e aqueles obtidos em nosso estudo. Cloreto de benzalcônio e brometo cetildimetiletilamônio, os dois únicos tensoativos catiônicos aqui estudados, apresentaram valores muito próximos, tanto em nosso estudo quanto no estudo de Vian et al.<sup>40</sup>. Há ainda boa concordância entre os valores obtidos para lauril sulfato de sódio e triton X-100. Estes valores foram de 0,040 mg/mL e 0,030 mg/mL (nosso estudo) e 0,082 mg/mL e 0,017 mg/mL (Vian et al.<sup>40</sup>). Todos estes produtos apresentaram valores de IC<sub>50</sub> médio menores que 0,700 mg/ml, *i.e.* são considerados irritantes. Já o tween 20 foi reconhecidamente não irritante, tanto no presente estudo como no de Vian et al.<sup>40</sup>. Estes dados, apesar de ainda limitados, sugerem uma boa reprodutibilidade deste ensaio.

**Tabela 11.** Comparação entre valores médios de IC<sub>50</sub> obtidos na avaliação de tensoativos: confronto com dados da literatura.

<b>Tensoativos</b>	<b>Vian et al.<sup>40</sup> (mg/mL)</b>	<b>Presente trabalho(mg/mL)</b>	<b>Resultado Final</b>
<b>Lauril sulfato de sódio</b>	0,082	0,040	Irritante
<b>Triton X –100</b>	0,017	0,030	Irritante
<b>Tween – 20</b>	0,728	1,208	Não-irritante
<b>Cloreto de Benzalcônio</b>	0,004	0,004	Irritante
<b>Brometo cetildimetiletilamônio</b>	0,004	0,003	Irritante

*Cut-off*: irritantes (<0,700mg/mL) ou não-irritantes (>0,700mg/mL).  
Em ambos os estudos, utilizou-se células SIRC.

A Tabela 12 mostra os valores de coeficiente de Spearman/Pearson entre diferentes métodos *in vitro* de citotoxicidade e os valores de escores máximos do Teste de Draize.

Os valores de coeficiente de Spearman/Pearson obtidos por Vian et al.<sup>40</sup> são próximos àqueles obtidos em nosso estudo. Segundo estes autores, os valores de escores máximos de Draize se correlacionam melhor com o método de citotoxicidade por MTT do que por NRU e QPT, tanto quando conduzido com células SIRC como com células 3T3.

**Tabela 12.** Comparação entre os coeficientes de Spearman/Pearson entre os métodos *in vitro* NRU, MTT e QPT e o teste de Draize: confronto com dados da literatura.

		<b>SIRC</b>	<b>3T3</b>	<b>L929</b>
<b>Vian et al.<sup>40</sup></b>	<b>NRU</b>	-0,61 / -0,59 (N = 20)	-0,60 / -0,58 (N = 20)	-0,59 / -0,57 (N = 20)
	<b>MTT</b>	-0,64 / -0,59 (N = 20)	-0,64 / -0,62 (N = 20)	ND
	<b>QPT</b>	-0,56 / -0,56 (N = 20)	-0,53 / -0,48 (N = 19)	-0,56 / -0,55 (N = 20)
<b>Presente trabalho</b>	<b>QPT</b>	-0,74 / -0,62 (N = 21)	ND	ND

\* : Células de embrião de camundongo; \*\* : Células de tecido conjuntivo de camundongo.  
ND = não determinado.

### **V.6. Considerações Finais**

Apesar de haver a necessidade de se estudar um maior número de substâncias, os dados do presente estudo, associados aos disponíveis na literatura, demonstram que o QPT em células SIRC pode ser usado na rotina como teste preliminar, tendo como vantagens: (a) a capacidade de predizer o potencial tóxico de tensoativos e produtos que os contenham, (b) ser um ensaio simples e quantitativo, (c) ser de baixo custo e não requerer equipamentos sofisticados, e (d) poder ser usado como um rápido ensaio de *screening* na bateria de testes *in vitro*.

## VI. CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo permitem concluir:

### 1. Quanto aos produtos estudados:

- Embora se saiba que as condições maximizadas do teste de Draize representam uma limitação do mesmo, a taxa de reprovação dos produtos aqui estudados e o alto percentual de produtos classificados como irritantes severos evidenciam que - pelo menos com relação à toxicidade ocular – a maioria destes produtos comercializados no município do Rio de Janeiro não são seguros.

### 2. Quanto à aplicabilidade do ensaio de quantificação de proteínas totais em células SIRC como uma alternativa ao Teste de Draize:

- Os coeficientes de correlação de Pearson -0,617 ( $p=0,003$ ) e de Spearman -0,738 ( $p=0,000$ ) se afiguram de bom calibre quando os valores obtidos *in vitro* são comparados ao escore total de Draize.
- Quanto à relação existente entre os achados macroscópicos em cada uma das estruturas oculares avaliadas no Teste de Draize e os valores obtidos *in vitro*, pode-se dizer que o valor de  $IC_{50}$  se correlaciona melhor com os danos induzidos na conjuntiva e córnea do que com aqueles observados na íris.
- Apesar de serem escassos os estudos sobre a aplicabilidade do método QPT em células SIRC para avaliação da irritação ocular induzida por xampus e tensoativos, pode-se dizer que há uma boa concordância entre os valores de  $IC_{50}$  obtidos por outros autores (Vian et al.<sup>40</sup>) e aqueles encontrados em nosso laboratório. Além disso, os valores dos coeficientes de Pearson e Spearman observados em nosso estudo são

comparáveis àqueles obtidos com modelos tradicionalmente usados (MTT e NRU).

- O QPT em células SIRC mostrou-se sensível (100%), específico (83%) e preciso (96%) quando comparado ao Teste de Draize. Estes aspectos associados a características importantes deste teste *in vitro* (*e.g.* teste rápido, simples, de baixo custo, requer reagentes com baixa toxicidade, é sujeito à automação e, além disso, não é tão dependente das modificações fisiológicas celulares como os ensaios de viabilidade MTT e o NRU), tornam este teste uma alternativa interessante na avaliação da irritação oftálmica induzida por produtos.
- Estudos adicionais com um maior número de produtos, assim como a realização de estudos inter-laboratoriais para avaliar a reprodutibilidade desta metodologia são necessários.

## VII. REFERÊNCIAS

1. Eun HC, Suh DH. Comprehensive outlook of in vitro tests for assessing skin irritancy as alternatives to Draize Test. *Jornal of Dermatological Science* 2000; 24: 77-91.
2. Concil Directive 93/35/EEC. Amending for the sixth time Directive 76/768/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products. *Oficial J. L151*, 1993; 23 june.
3. Directive 2003/15/EC. Amending Council Directive 76/768/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products. *Oficial J. L66*, 2003; 11 march.
4. Pauwels M, Rogiers V. Safety evaluation of cosmetics in EU reality and challenges for the toxicologist. *Toxicology Letters* 2004; 151: 7-17.
5. Hendriksen CFM. A short history of the use of animals in vaccine development and quality control. *Devlopments in Biological Standartization* 1994; 86: 3-10.
6. Presgrave OAF. Alternativas para animais de laboratório: do animal ao computador. In: Andrade A, Pinto SC, de Oliveira RS, organizadores. *Animais de laboratório – criação e experimentação*. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ; 2002.
7. Wilhelmus KR. Therapeutic reviews: the Draize Eye Test. *Survey of ophthalmology* 2001; 45 Suppl 6: 493-515.
8. Rowan AD. The three R's (reduction, refinement and replacement) of animals in experimentation: a historical perspective. *Jenkintown. PA: America Anti-Vivisection Society*; 1997. p. 6-12.
9. Die Ratte im Labor. Tierversuche für Kosmetische Produkte. [www.rattenclub.ch/dieratte/labor4.html](http://www.rattenclub.ch/dieratte/labor4.html) (acessado em 30/Nov/2005).
10. Rabbitrehome. Special feature by Lisa Hodgson. Help say no to animal testing! [http://www.rabbitrehome.org.uk/carrotchronicle/newsletter4\\_2003.asp](http://www.rabbitrehome.org.uk/carrotchronicle/newsletter4_2003.asp) (acessado em 30/Nov/2005).
11. Askuswhy. Product testing: tests performed on animals. [http://www.askwhy.com/product\\_\(1\).htm](http://www.askwhy.com/product_(1).htm) (acessado em 20/Fev/2006).
12. Holden C. Cosmetics firms drop Draize Test. *Science* 1989; 245: 125.
13. Holden C. Much work but slow going on alternatives to Draize Test. *Science* 1988; 242: 185-186.

14. Geocities. Crueldade humana para com os animais. [http://www.geocities.com/redeagle\\_pt/crueldade.htm](http://www.geocities.com/redeagle_pt/crueldade.htm) (acessado em 22/Nov/2005).
15. Balls M, Zeller AM, Halder M, editors. Progress in the reduction, refinement and replacement of animal experimentation. Proceedings of 3<sup>th</sup> World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences; 2000; Netherlands: Elsevier; 2000.
16. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para Avaliação de Segurança de produtos Cosméticos. Brasília: ANVISA; 2003.
17. Institute for Laboratory Animal Research (ILAR). Science, medicine and animals. The National Academies Press; 2004.
18. Riordan T. Inventing beauty: A history of the innovations that have made us beautiful. Broadway Books; 2004.
19. The University of Arizona. University Animal Care. Quality care for research animals. <http://www.ahsc.arizona.edu/uac> (acessado em 24/Nov/2005).
20. Kurian G. The Historical Guide to American Government. New York: Oxford University Press; 1998.
21. U.S. Food and Drug Administration. History of the FDA. The 1938 Food, Drug and Cosmetic Act. <http://www.fda.gov/oc/history/historyoffda/section2.html> (acessado em 24/Nov/2005).
22. Draize JH, Woodard G, Calvery OH. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 1944; 83: 377-390.
23. Sina JF, Galer DM, Sussman RG, Gautheron P, Sargent EV, Leong B, et al. A collaborative evaluation of seven alternatives to Draize Eye Irritation Test using pharmaceutical intermediates. Fundamental and Applied Toxicology 1995; 26: 20-31.
24. Moldenhauer F. Using in vitro prediction models instead of the rabbit eye irritation test to classify and label new chemicals: a post hoc data analysis of the International EC/HO Validation Study. Alternatives to Laboratory Animals 2003; 31: 31-46.
25. Kay JH, Calandra JC. Interpretation of eye irritation tests. Journal of the Society of Cosmetic Chemists 1962; 13: 281-289.

26. Sved DW, Dahlgren RR. Oversight regulations. In: Chengelis CP, Holson JF, Gad SC, editors. *Regulatory Toxicology*. New York: Raven Press; 1995. p.211-228.
27. International Standardization Organization. *Biological evaluation of medical devices*. ISO 10993-10. Test for Irritation and Sensitization. 1<sup>th</sup> edition. Switzerland: International Standardization Organization; 1995.
28. Spielmann H. Ocular Irritation. In: Castell JV, Gómez-Lechón MJ. *In Vitro Methods in Pharmaceutical Research*. Califórnia: Academic Press Ltd; 1997. p.265-285.
29. Curren RD, Harbell JW. Ocular safety: a silent (in vitro) success story. *Alternatives to Laboratory Animals* 2002; 2: 69-74.
30. Retinologos asociados. Terminologia ocular: globo ocular (anatomía). <http://www.retinapanama.com> (acessado em 06/Mar/2006).
31. Resolução RDC nº 211, de 14 de julho de 2005. Ficam estabelecidas a Definição e a Classificação de Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes, conforme Anexos I e II desta Resolução. *Diário Oficial da União* 2005; 18 julho.
32. Wolf R, Wolf D, Tüzün B, Tüzün Y. Soaps, shampoos and detergents. *Clinics in Dermatology* 2001; 19: 393-397.
33. Gloxhuber CH. Toxicological properties of surfactants. *Archives of Toxicology* 1974; 32: 245-270.
34. Froebe CL, Simion FA, Rhein LD, Cagan RH, Kligman A. Stratum corneum lipid removal by surfactants: relation to in vivo irritation. *Dermatology* 1990; 181: 277-283.
35. Korting H, Herzinger R, Hartinger A, Kerschner M, Angerpointner T, Maibach HI. Discrimination of the irritancy potential of surfactants in vitro by two cytotoxicity assays using normal keratinocytes, HaCat cells and 3T3 mouse fibroblasts: correlation with in vivo data from a soap chamber assay. *Journal of Dermatological Science* 1994; 7: 119-129.
36. Mizushima J, Kawasaki Y, Tabohashi T, Kitano T, Sakamoto K, Kawashima M, et al. Effect of surfactants on human stratum corneum: elétron paramagnetic resonance study. *International Journal of Pharmaceutics* 2000; 197: 193-202.
37. North-Rooth H, Yackovich F, Demetrulias J, Gagula M, Heinze JE. Evaluation of an in vitro cell toxicity test using rabbit corneal to predict the eye irritation potential of surfactants. *Toxicology Letters* 1982; 14: 207-212.

38. Shopsis C, Eng B. Rapid cytotoxicity testing using a semi-automated protein determination on cultured cells. *Toxicology Letters* 1985; 26 Suppl 1:1-8.
39. Yang W, Acosta D. Cytotoxicity potential of surfactants mixtures evaluated by primary cultures of rabbit corneal epithelial cells. *Toxicology Letters* 1994; 70: 309-318.
40. Vian L, Vincent J, Maurin J, Fabre I, Giroux J, Cano JP. Comparison of three in vitro cytotoxicity assays for estimating surfactant ocular irritation. *Toxicology In Vitro* 1995; 9 Suppl 2: 185-190.
41. De Torres EP, Larrauri AG, Kuhn GR. Ensayos alternativos a la experimentación animal. *Animales de Experimentación* 1997; 3 Suppl 2: 30-36.
42. Chiba K, Makito I, Ohuchi J, Kasai Y, Kakishima H, Tsukumo K, et al. Interlaboratory validation of the in vitro eye irritation test for cosmetic ingredients (9). Evaluation of cytotoxicity test on HeLa cells. *Toxicology in vitro* 1999; 13: 189-198.
43. Tani N, Kinoshita S, Okamoto Y, Kotani M, Itagaki H, Murakami N, et al. Interlaboratory validation of the in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients. (8) Evaluation of cytotoxicity tests on SIRC cells. *Toxicology in Vitro* 1999; 13:175-187.
44. Burdick J, Merrill J, Spangler T, Moyer G, Harbell J. Use of histological examination in bovine corneal opacity and permeability (BCOP) assay for assessing the ocular irritation potential of fragranced formulations. *The Toxicologist* 2002; 66: 1194.
45. Alves E.N, Presgrave RF, Sabagh FP, Machado DOD, Presgrave OAF, Delgado IF, et al. Comparative study of three in vitro methods for assessment to eye potential irritation. *Revista Brasileira de Toxicologia* 2005; 18: 102.
46. Debbasch C, Ebenhahn C, Dami N, Pericoi M, Van Den Berghe C, Cottin M, et al. Eye irritation of low-irritant cosmetic formulations: correlation of in vitro results with clinical data and product composition. *Food and Chemical Toxicology* 2005; 43: 155-165.
47. Gerner I, Liebsch M, Spielmann H. Assessment of eye irritation properties of chemicals by applying alternatives to the Draize rabbit eye test: the use of QSARs and in vitro tests for the classification of eye irritation. *Alternatives to Laboratory Animals* 2005; 33 Suppl 3: 215-237.

48. Lagarto A, Vega R, Vega Y, Guerra I, Gonzalez R. Comparative study of red blood cell meted in rat and calves blood as alternatives of Draize eye irritation test. *Toxicology In Vitro* 2005; 14 (Epub ahead of print).
49. Renzi D, Valtolina M, Forster R. The evaluation of a multi-endpoint cytotoxicity assay system. *Italian Tissue Culture Meeting. Alternatives to Laboratory Animals* 1993; 21: 89-96.
50. Weiber K, Hechler U. *Animal welfare aspects in the quality control of immonobiologicals*. Nottingham UK: Frame; 1997.
51. Roberfroid M. Alternatives in safety testing: progress or uselessness? *Alternatives to Laboratory Animals* 1994; 22: 438-444.
52. European Commission. Notes of guidance for testing of cosmetic ingredients for their safety evaluation. The rules governing cosmetic products in the European Union. *Cosmetic Products Guideline. Volume 3*. European Union: European Commission; 1999.
53. Princen, MK. The Draize Eye Test and in vitro alternatives; a left-handed marriage? *Toxicology in vitro* 2005. (Article in Press) <http://www.sciencedirect.com> (acessado em 10/Out/2005).
54. Guillot R. Ocular irritation: present cell culture models and perspectives. Third SPTC Meeting. *Alternatives to Laboratory Animals* 1992; 20: 471-475.
55. Freshney RI. *Culture of animal cells. A manual of basic technique*. 3<sup>th</sup> edition. New York: Wiley-Liss, Inc; 1994.
56. Margis R, Borojevic R. Quantification of attached cells in tissue culture plates and on microcarries. *Analytical. Biochemistry* 1989; 181: 209-211.
57. Knox P, Uphill PF, Fry JR, Benford J, Balls M. The FRAME multicentre project on in vitro cytotoxicology. *Food and Chemical Toxicology* 1986; 24 Suppl 6: 457-463.
58. Clothier, RH. The Frame Cytotoxicity Test (Kenacid Blue). The Ergatt/Frame data bank of In Vitro Techniques in toxicology 1992; Invitox Protocol Number 3b.
59. North-Rooth H, Yackovich F, Demetrulias J, Gagula M, Heinze JE. Prediction of the eye irritation potential of shampoos using the in vitro SIRC cell toxicity test. *Food and Chemical Toxicology* 1985; 23 Suppl 2: 271-273.
60. Roguet R, Dossou KG, Rougier A. Prediction of eye irritation potential of surfactants using the SIRC-NRU cytotoxicity test. Third SPTC Meeting. *Alternatives to Laboratory Animals* 1992; 20: 451-456.

61. Hutak MC, Kavanagh ME, Agarwal V, Afouna MI, Khan MA, Reddy IK. Use of SIRC rabbit corneal cell lines grown on polycarbonate- or polyester-based filters to assess the in vitro corneal transport/toxicity screening using pilocarpine with or without benzalkonium chloride. *Journal of Toxicology* 2003; 22: 101-114.
62. The Scripps Research Institute. Weighing the risks and benefits of xenotransplantation. <http://www.scripps.edu/newsandviews> (acessado em 30/Nov/2005).
63. Pasternak AS, Miller WM. First-Order Toxicity assays for eye irritation using cell lines: parameters that affect in vitro evaluation. *Fundamental and applied Toxicology* 1995; 25: 253-263.
64. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Preparo de meios de cultura e soluções utilizadas em cultivo de linhagens celulares. Seção 10 (nº 65.3440.008). Manual da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ; 1999.
65. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Ensaio de Irritação Ocular. Seção 10 (nº 65.3330.004). Manual da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ; 2002.
66. Decreto nº 79.094 de 05 de janeiro de 1977. Regulamenta a Lei no 6360 de 23 de setembro de 1976, que submete a sistema de vigilância sanitária os medicamentos, insumos farmacêuticos, drogas, correlatos, cosméticos, produtos de higiene, saneantes e outros. *Diário Oficial da União* 1977; 5 jan.
67. Freeberg FE, Nixon GA, Reer PJ, Weaver JE, Bruce RD, Griffith JF et al. Human and rabbit eye responses to chemical insult. *Fundamental and Applied Toxicology* 1986; 7: 626-634.
68. Roggeband R, York M, Pericoi M, Braun W. Eye irritation responses in rabbit and man after single applications of equal volumes of undiluted model liquid detergent products. *Food and Chemical Toxicology* 2000; 38 Suppl 8: 727-734.
69. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). Guideline for testing of chemicals. OECD 405 – Acute Eye Irritation. Paris: OECD; 1987.
70. Organization for Economic Cooperation and Development. <http://www.oecd.org>. (acessado em 27/Nov/2005).
71. Alves EN. Red blood cell (RBC) – teste de hemólise: uma alternativa ao teste de Draize - irritação ocular na avaliação do poder tóxico de produtos cosméticos no controle de qualidade [Dissertação de mestrado]. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz; 2003.

72. Seifreid HE. Eye irritation testing: historical perspectives and future directions.  
Journal of Toxicology – Cutaneous and Ocular Toxicology 1986; 5: 89-114.

## ANEXO

### *Descrição do Procedimento in vivo*

A) *Animais*: Coelho albinos, machos ou fêmeas da raça “Nova Zelândia”, hígdidos e provenientes da Cunicultura Rivadávia, do Rio de Janeiro, RJ. Com peso corpóreo acima de 2,0 Kg. Foram utilizados cinco animais por amostra/substância-teste.

B) *Acondicionamento*: Os animais foram mantidos em gaiolas individuais em condições controladas de temperatura ( $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e umidade relativa do ar (30 – 70%) e ciclo claro/escuro constante (período de 12 horas cada). Os animais receberam ração – Nuvilab coelhos (Nuvilab) e água *ad libidum*.

C) *Preparo dos animais*: Ambos globos oculares de cada animal foram examinados 24 horas antes do início do ensaio. Os animais que apresentaram injúrias na conjuntiva e globo ocular foram descartados.

D) *Aplicação*: Instilou-se 0,1mL do produto no saco conjuntival inferior e, em seguida massageou-se gentilmente durante 30 segundos. As substâncias ou produtos fortemente ácidos ou alcalinos (pH menor que 2,0 e maior que 11,5) não foram testados, pois são reconhecidamente corrosivos.

E) *Leitura*: Foram realizadas leituras, por três analistas, nos períodos de 24h, 48h, 72h e sete dias, para observar as alterações e graduações das lesões (Quadro 1).

F) *Avaliação dos Resultados*: foi dividida em duas etapas: I e II

#### Etapa I

A – Determinação da quantificação da lesão ocular

Este cálculo deve ser realizado para cada animal, com base nas leituras de 24h, 48h, 72h e 7 dias, conforme as graduações das lesões, segundo a equação abaixo e registrando-se os valores na ficha de soma das leituras para, em seguida, calcular a média aritmética de cada tempo de leitura.

$$Lxt = (AxB) \times 5 + (Cx5) + [(D+E+F) \times 2] \quad , \text{ onde:}$$

**Lxt** = leitura de um animal em um intervalo de tempo (t);

**A** = densidade de opacidade;

**B** = área de opacidade;

**C** = irite;

**D** = hiperemia;

**E** = quimose;

**F** = secreção.

**B** – Seleção da maior média aritmética entre as médias de 24h, 48h, 72h ( $ME_{24h}$ ,  $ME_{48h}$ ,  $ME_{72h}$ ).

Selecionada a média de valor ( $ME_{max}$ ), foi calculada a faixa de confiança, utilizando a seguinte equação:

$$Fc = ME_{max} \pm 5 \quad , \text{ onde:}$$

**Fc** = faixa de confiança;

**ME<sub>max</sub>** = média aritmética de maior valor entre os tempos de 24h, 48h e 72h.

Uma vez selecionada a  $ME_{max}$  verificar se, pelo menos, dois valores de Lxt encontram-se dentro da Fc. Se tais valores forem encontrados, deve-se considerar o  $ME_{max}$  e utilizar a Tabela 2, referente à classificação prévia do produto.

**Quadro 1.** Graduação das alterações e lesões do globo ocular de coelhos após instilação no saco conjuntival inferior de 0,1mL de amostra/substância-teste.

Estrutura		Alteração	Graduação				
			0	1	2	3	4
Córnea	O P A C I D A D E	Quanto à densidade	Sem opacidade	Área difusa ou disseminada, detalhes da íris claramente visíveis (perda de brilho)	Áreas translúcidas facilmente discerníveis, detalhes da íris ligeiramente obscuros	Área opalescente, nenhum detalhe da íris	Opaca, íris invisível
		Quanto à área	Córnea normal	1/4 (ou menos), mas não zero	Maior do que 1/4 e menor do que a metade	Maior do que a metade e menor do que 3/4	Maior do que 3/4 até a área total
Íris	Irite	Íris normal	Raias com congestão, edema, injestão circuncorneal (qualquer uma ou todas essas alterações ou a combinação de algumas delas), íris ainda reage à luz (reação lenta é positiva)	Nenhuma reação à luz, hemorragia, destruição (qualquer uma ou todas essas)			
Conjuntiva	Hiperemia	Vasos normais	Vasos definitivamente injetados acima do normal	Vermelho intenso mais difuso e vasos individuais não facilmente discerníveis	Vermelho escuro difuso		
	Quimose	Ausência de edema	Algum edema acima do normal (incluindo a membrana nictante)	Edema óbvio com eversão parcial das pálpebras	Edema com as pálpebras cobrindo a metade do olho	Edema com pálpebra cobrindo de metade ao fechamento total do olho	
	Secreção	Ausência de secreção	Qualquer quantidade diferente do normal	Secreção com umedecimento das pálpebras e pêlos adjacentes	Secreção com umedecimento das pálpebras, pêlos e área considerável ao redor do olho		

**Tabela 2.** Classificação prévia do potencial de irritabilidade de um produto.

<b>Classe</b>	<b>Faixa/Escores</b> (graduação das lesões)	<b>Classificação</b>
<b>I</b>	<b>0,0 a 14,9</b>	<b>Produto não-irritante (NI)</b>
<b>II</b>	<b>15,0 a 24,9</b>	<b>Produto levemente irritante (IL)</b>
<b>III</b>	<b>25,0 a 49,9</b>	<b>Produto irritante moderado (IM)</b>
<b>IV</b>	<b>50,0 a 79,9</b>	<b>Produto irritante severo (IS)</b>
<b>V</b>	<b>80,0 a 110,0</b>	<b>Produto irritante máximo (IMax)</b>

**Etapa II – Classificação Final do Potencial de Irritabilidade de um Produto**

Esta etapa foi utilizada para confirmar ou alterar a classificação da amostra ou substância-teste, encontrada na Etapa I. Pra tal, fez-se uso da Tabela 3, referente à classificação final do produto.

**Tabela 3.** Classificação final do potencial de irritabilidade de um produto.

<b>Classificação</b>	<b>Confirmação da classificação inicial</b>
<b>Não irritante (classe I)</b>	$M_{24h} < 2.4$ – classe I; se $M_{24h} > 2.4$ ir para classe II
<b>Irritante leve (classe II)</b>	(1) $M_{48h} \leq 2.4$ , classe II; se $M_{48h} > 2.4$ , ir para o item (2) (2) $M_{72h} \leq 2.4$ , classe II; se $M_{72h} > 2.4$ , ir para classe III
<b>Irritante moderado (classe III)</b>	(1) $M_{7d} \leq 20$ , ir para o item (2); se $M_{7d} > 20$ , ir para classe IV (2) $L_{7d} \leq 10$ em pelo menos 3 animais, classe III; se $L_{7d} > 30$ em pelo menos 1 animal, classe IV
<b>Irritante severo (classe IV)</b>	(1) $M_{7d} \leq 40$ , ir para o item (2); se $M_{7d} > 40$ , ir para classe V (2) $L_{7d} \leq 30$ em pelo menos 3 animais, classe IV; se $L_{7d} > 60$ em pelo menos 1 animal, classe V
<b>Irritante máximo (classe V)</b>	(1) $M_{7d} > 40$ , ir para o item (2) (2) $L_{7d} > 60$ em pelo menos 1 animal, classe V

\*M = média; h = horas; d = dias; L = leitura