

Eloisa Nunes Alves

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.

PPGVS/INCQS

FIOCRUZ

2003

“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”.

ELOISA NUNES ALVES

**Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Fundação Oswaldo Cruz**

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Pinto Corrado

Rio de Janeiro

2003

“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”.

ELOISA NUNES ALVES

Dissertação submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre.

Aprovado

Dra. Rita de Cássia Mattos – CESTE/ FIOCRUZ

Dr. João Ernesto de Carvalho – CPQBA/ UNICAMP

Dra. Paula Novais Sarcinelli – CESTE/ FIOCRUZ

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Pinto Corrado

***Aos meus pais, Ruth e Nilton, por sempre
acreditarem no meu sucesso e terem me
dado como herança, o estudo.
Aos meus irmãos, pelo carinho.***

De tudo ficaram três coisas:

*A certeza de que estamos sempre
começando...*

A certeza de que precisamos continuar..

*A certeza de que seremos interrompidos
antes de terminar...*

Portanto, devemos:

Fazer da interrupção, um caminho novo...

Da queda, um passo de dança...

Do medo, uma escada...

Do sonho, uma ponte...

Da procura, um encontro...

Fernando Pessoa

Alves, Eloísa Nunes

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./ Eloísa Nunes Alves. Rio de Janeiro: INCQS/ FIOCRUZ, 2003.

xix. 89p. il. tab. graf.

Tese (Mestrado). INCQS, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2003.

Agradecimentos

À Deus, que meu deu forças para continuar e vencer mais este desafio.

Ao meu orientador Prof. Dr Alexandre Pinto Corrado que soube me acompanhar com paciência para escutar, com critério profissional para julgar sem concessões, além de partilhar das dúvidas, das ansiedades e das expectativas.

À todos os professores do Curso de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária/INCQS e do Curso de Pós-Graduação/IOC que, de alguma forma, contribuirão para a realização deste trabalho.

À Simone Nascimento Teixeira Amaral, secretária do curso de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária/INCQS, pela atenção dispensada durante a realização do curso.

Aos professores do curso de graduação Eulógio Carlos de Queiroz, Rogério Tortelly e Jefferson Andrades dos Santos, por terem estendido as mãos quando dei meus primeiros passos no caminho da ciência. Agradeço o apoio, a confiança e a dedicação.

Aos amigos e colegas de trabalho , Rosaura Farias Presgrave e Octávio Augusto Presgrave, pela amizade e companheirismo, pela troca de idéias e momentos de descontração.

À Fernanda Peres Sabagh, por seu apoio e dedicação no desenvolvimento da parte experimental.

À Isabella Fernandes Delgado, pelo apoio inestimável no início deste trabalho.

À Adgerson F. Pires e Márcia Santos de Oliveira, funcionários da FENEIS, pelo auxílio e cooperação na lavagem do material usado nos experimentos.

A amiga e colega de trabalho Marília Martins Nishikawa, pela amizade e pela cooperação e doação de materiais de laboratório, ajuda inestimável na realização inicial deste trabalho.

Ao colega de trabalho Lenilson Alves Netto, pelo desprendimento em ensinar-me os conceitos básicos em espectrofotometria.

A colega de trabalho Luciana Oliveira dos Santos, pela disponibilidade em ajudar-me na calibração do espectrofotômetro.

Ao colega de curso Luiz Otávio Barroso Pereira, pela cooperação e doação de materiais de laboratório, ajuda inestimável na realização deste trabalho.

Aos colegas de trabalho do Setor de Patologia Clínica, por facilitarem o acesso ao espectrofotômetro durante toda a realização deste trabalho.

Aos colegas de trabalho Adriana Sant'Anna da Silva e Leonardo de Souza Lopes, pela disponibilidade em ajudar-me na determinação do pH das substâncias-teste e das soluções das amostras utilizadas na realização deste trabalho.

Ao Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL/FIOCRUZ), pelo precioso serviço de fornecimento de sangue, sem o qual este trabalho não teria sido realizado e principalmente ao colega de trabalho Clênio Fernandes Viana, técnico responsável pela coleta de sangue.

Lista de Figuras

Figura 1 – Representação esquemática da membrana citoplasmática do eritrócito.....	9
Figura 2 – Mudanças conformacionais induzidas na hemoglobina pela ligação com o oxigênio. A forma do lado direito é a oxiemoglobina e a forma do lado esquerdo é a deoxiemoglobina . As subunidades α estão ilustradas em branco e azul claro, as subunidades β estão mostradas em diferentes tons de púrpura e o grupo heme, colorido em vermelho.....	12
Figura 3 – Esquema geral da oxidação e degradação da hemoglobina. O primeiro produto da reação em meio aquoso e pH neutro é a metemoglobina. Esta, pode se transformar em hemicromogênio reversível, o qual se não sofrer redução se converterá em hemicromogênio irreversível com subsequente precipitação.....	15
Figura 4 – Relação entre as médias dos escores máximos das lesões da córnea e o tempo necessário para regressão dos efeitos de irritabilidade.....	29
Figura 5 - Relação entre as médias dos escores máximos das lesões da íris e o tempo necessário para regressão dos efeitos de irritabilidade.....	30
Figura 6 – Relação entre as médias dos escores máximos das lesões da conjuntiva e o tempo necessário para regressão dos efeitos de irritabilidade.....	30
Figura 7 – Relação entre o tempo de regressão das lesões oculares e o potencial de irritabilidade de 19 produtos cosméticos. Notar que os produtos classificados como NI e IL , as lesões oculares tendem a regredir em 3 dias, enquanto que os classificados como IM e IS , causaram lesões que regredem somente após 7 ou mais dias. Relacione esta figura com as anteriores (4, 5 e 6) e com a Tabela 3.....	30
Figura 8 – Plotagem das médias dos escores máximos (MEM) dos 19 produtos cosméticos em estudo. Notar que 10 produtos apresentam $MEM \leq 10$ sendo classificados como NI ou IL e que os demais com $MEM > 10$ correspondem aos IM e IS . Os valores das MEM individuais estão descritos na Tabela 3.....	31

Figura 9 – Análise de regressão entre as médias dos escores máximos e as médias dos escores da córnea. Coeficiente de correlação de Pearson $r = 0,988$	32
Figura 10 – Análise de regressão entre as médias dos escores máximos e as médias dos escores da íris. Coeficiente de correlação de Pearson $r = 0,898$	32
Figura 11 – Análise de regressão entre as médias dos escores máximos e as médias dos escores da conjuntiva. Coeficiente de correlação de Pearson $r = 0,917$	33
Figura 12 – Análise de regressão entre as médias dos escores máximos e as médias dos escores de 24 horas. Coeficiente de Pearson $r = 0,987$	34
Figura 13 – Representação gráfica das lesões induzidas por tensoativos nas 3 estruturas oculares. Notar que: (i) – T1 e T2 são inócuos para córnea e íris e com baixo poder irritante na conjuntiva; (ii) – os T3 e T4 causam lesões indistintamente nas 3 estruturas, porém com maior severidade na córnea, seguida da conjuntiva e da íris.....	35
Figura 14 – Olho de coelho preservado em sua forma íntegra.....	36
Figura 15 – Olho apresentando Hiperemia de grau 2, conforme indicado pela ponta da seta.....	37
Figura 16 – Olho apresentando Írite de grau 1, mostrando as raias da íris bem definidas, conforme indicado pela ponta da seta.....	37
Figura 17 – Olho apresentando Quimose (edema) de grau 2, conforme indicado pela ponta da seta.....	38
Figura 18 – Olho apresentando Opacidade de grau 2, conforme indicado pela ponta da seta.....	38
Figura 19 – Análise de regressão e correlação de Pearson entre as médias dos escores máximos (MEM) e os log das concentrações das H ₅₀ das substâncias-teste.....	44
Figura 20 – Análise de regressão e correlação de Pearson entre as médias dos escores máximos (MEM) e a razão log H ₅₀ /ID das substâncias-teste.....	45

Figura 21 – Distribuição no intervalo interquartil dos tensoativos analisados.....	48
Figura 22 – Distribuição no intervalo interquartil dos produtos estudados.....	48
Figura 23 – Freqüência de observações de concordância e discordância entre os ensaios “in vitro” (H ₅₀ /ID) e “in vivo” (MEM). Substância-teste positiva tem MEM ≥ 3,2 e H ₅₀ /ID < 100. Sensibilidade = a/(a + c) x 100%; Especificidade = d/(b+d) x 100%; Valor preditivo = a/(a + b) x 100%; Precisão = (a + d)/(a + b + c + d) x 100%.....	49
Figura 24 – Curvas Concentração-Resposta da hemólise induzida por tensoativos em hemácias de Carneiro. Notar o deslocamento , embora não significativo dessas curvas para esquerda a partir da 2 ^o ou 3 ^o semanas. Os valores das H ₅₀ estão transcritos na Tabela 5.....	51
Figura 25 – Curvas Concentração-Resposta como descrito na Fig 24, porém em relação a produtos cosméticos codificados . Os valores das H ₅₀ , estão transcritos na Tabela 6.....	52
Figura 26 – Comportamento dos tensoativos em relação aos parâmetros <i>in vitro</i> estimados: H ₅₀ , ID e H ₅₀ /ID, como indicados na Tabela 5.....	57
Figura 27 – Análises de regressão e correlação entre as médias dos escores máximos (MEM) da córnea , obtidas <i>in vivo</i> , e o logH ₅₀ ug/mL obtidas <i>in vitro</i>	59
Figura 28 – Análises de regressão e correlação entre as médias dos escores máximos (MEM) da íris , obtidas <i>in vivo</i> , e o logH ₅₀ ug/mL obtidas <i>in vitro</i>	60
Figura 29 – Análises de regressão e correlação entre as médias dos escores máximos (MEM) da conjuntiva , obtidas <i>in vivo</i> , e o logH ₅₀ ug/mL obtidas <i>in vitro</i>	60
Figura 30 – Análise de regressão e correlação entre as médias dos escores máximos (MEM) da córnea , obtidas <i>in vivo</i> , e os valores de ID, obtidas <i>in vitro</i>	61
Figura 31 – Análise de regressão e correlação entre as médias dos escores máximos (MEM) da íris , obtidas <i>in vivo</i> , e os valores de ID, obtidas <i>in vitro</i>	61
Figura 32 – Análise de regressão e correlação entre as médias dos escores máximos (MEM) da conjuntiva , obtidas <i>in vivo</i> , e os valores de ID, obtidas <i>in vitro</i>	62

Figura 33 – Análises de regressão e correlação entre as médias dos escores máximos (MEM) da córnea , obtidas <i>in vivo</i> , e os valores dos logH ₅₀ /ID obtidas <i>in vitro</i>	62
Figura 34 - Análises de regressão e correlação entre as médias dos escores máximos (MEM) da íris , obtidas <i>in vivo</i> , e os valores dos logH ₅₀ /ID obtidas <i>in vitro</i>	63
Figura 35 – Análises de regressão e correlação entre as médias dos escores máximos (MEM) da conjuntiva , obtidas <i>in vivo</i> , e os valores dos logH ₅₀ /ID obtidas <i>in vitro</i>	63
Figura 36 - Comportamento dos produtos analisados frente aos parâmetros <i>in vitro</i> H ₅₀ , ID e H ₅₀ /ID.....	65
Figura 37 – Análises de regressão e correlação entre as médias dos escores máximos (MEM) da córnea , obtidas <i>in vivo</i> , e o logH ₅₀ ug/mL obtidas <i>in vitro</i>	67
Figura 38 – Análises de regressão e correlação entre as médias dos escores máximos (MEM) da íris , obtidas <i>in vivo</i> , e o logH ₅₀ ug/mL obtidas <i>in vitro</i>	67
Figura 39 – Análises de regressão e correlação entre as médias dos escores máximos (MEM) da conjuntiva , obtidas <i>in vivo</i> , e o logH ₅₀ ug/mL obtidas <i>in vitro</i>	68
Figura 40 – Análise de regressão e correlação entre as médias dos escores máximos (MEM) da córnea , obtidas <i>in vivo</i> , e os valores de ID, obtidas <i>in vitro</i> ..	68
Figura 41 – Análise de regressão e correlação entre as médias dos escores máximos (MEM) da íris , obtidas <i>in vivo</i> , e os valores de ID, obtidas <i>in vitro</i>	69
Figura 42 - Análise de regressão e correlação entre as médias dos escores máximos (MEM) da conjuntiva , obtidas <i>in vivo</i> , e os valores de ID, obtidas <i>in vitro</i>	69
Figura 43 – Análises de regressão e correlação entre as médias dos escores máximos (MEM) da córnea , obtidas <i>in vivo</i> , e os logH ₅₀ /ID obtidas <i>in vitro</i>	70

Figura 44 - Análises de regressão e correlação entre as médias dos escores máximos (MEM) da íris , obtidas <i>in vivo</i> , e os $\log H_{50}/ID$ obtidas <i>in vitro</i>	70
Figura 45 – Análises de regressão e correlação entre as médias dos escores máximos (MEM) da conjuntiva , obtidas <i>in vivo</i> , e os $\log H_{50}/ID$ obtidas <i>in vitro</i>	71

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Classificação Prévia do Potencial de Irritabilidade do Produto.....	20
Tabela 2 – Classificação Final do Potencial de Irritabilidade do Produto.....	20
Tabela 3 – Classificação do Potencial de Irritação de Produtos Cosméticos Codificados resultante de Teste <i>in vivo</i> de Draize – usando 5 coelhos por amostra.....	27
Tabela 4 – Correlação entre as médias dos escores por estrutura com as médias dos escores máximos.....	33
Tabela 5 – Valores das H_{50} , dos ID e da razão H_{50}/ID de tensoativos avaliados por diferentes analistas.....	39
Tabela 6 – Valores das H_{50} , dos ID e da razão H_{50}/ID de produtos cosméticos avaliados por diferentes analistas.....	40
Tabela 7 – Classificação do potencial de irritabilidade dos tensoativos pelo ensaio RBC <i>in vitro</i> e sua comparação com a classificação pelo Teste de Draize <i>in vivo</i>	42
Tabela 8 – Classificação do potencial de irritabilidade dos produtos cosméticos pelo ensaio RBC <i>in vitro</i> e sua comparação com a classificação pelo Teste de Draize <i>in vivo</i>	43
Tabela 9 – Coeficientes de correlação (Pearson e Spearman) relacionado aos valores das H_{50} , da razão H_{50}/ID dos ensaios <i>in vitro</i> e os escores das estruturas oculares dos ensaios <i>in vivo</i>	46
Tabela 10 – Preditibilidade do Ensaio RBC.....	47
Tabela 11 – Valores das H_{50} de 4 tensoativos comparativamente aos encontrados por WOLFGANG et al.; (1987 e 1990).....	56
Tabela 12 – Valores dos coeficientes de correlação de Pearson e Spearman, relatados em literatura entre os resultados <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> para tensoativos.....	58

Tabela 13 – Coeficientes de correlação entre os parâmetros <i>in vitro</i> e os escores do ensaio <i>in vivo</i> dos tensoativos.....	59
Tabela 14 – Classificação do potencial de irritação ocular (H ₅₀ /ID) de 4 tensoativos.....	64
Tabela 15 – Classificação do Potencial de irritação ocular dos 19 produtos cosméticos.....	66
Tabela 16 – Coeficientes de correlação entre os parâmetros <i>in vitro</i> e os escores do ensaio <i>in vivo</i> dos produtos coeméticos.....	67
Tabela 17 – Apresentação dos métodos alternativos mais utilizados para irritação ocular.....	74

Lista de Quadros

Quadro 1 – Relação entre a quantidade de hemoglobina e o número de eritrócitos em diferentes espécies animais.....	13
Quadro 2 – Graduação das alterações do globo ocular de coelhos após instilação no saco conjuntival inferior de 0,1 mL da substância-teste.....	18
Quadro 3 – Classificação do Potencial de Irritação Ocular	25
Quadro 4 – Classificação do Potencial de Irritação dos Tensoativos resultante de Teste <i>in vivo</i> de Draize usando 5 coelhos por amostra.....	35

Lista de Abreviaturas e Siglas

INCQS – Instituto Nacional de Controle e Qualidade em Saúde
FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz
CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
TER – Transcutaneous electrical resistance (Resistência elétrica transcutânea)
NRU – Neutral Red Uptake (Captação do vermelho neutro)
FDA – Food, Drug and Cosmetic Act
LCCDM – Laboratório Central de Controle de Drogas e Medicamentos
LCCDMA – Laboratório Central de Controle de Drogas , Medicamentos e Alimentos
OECD – Organisation for Economic Cooperation and Development
CRF – Code Registre Federal
ISO – International Standard Operation
UFAW – Universities Federation for Animal Welfare
SDS – Sodium dodecyl sulphate (Dodecil sulfato de sódio)
RBC – Red blood cell (hemácias)
POP – Procedimento Operacional Padrão
PBS – Tampão fosfato salino
IC₅₀ – Concentração que causa 50% de hemólise
H₅₀ – Dose efetiva que causa 50% de hemólise
ID – Índice de desnaturação
MEM – Média do escore máximo
NI – Não irritante
IL – Irritante leve
IM – Irritante moderado
IS – Irritante severo

RESUMO

O objetivo do presente trabalho, foi o de correlacionar os resultados obtidos em Teste convencional *in vivo*, de **Draize** de Irritação ocular, em coelhos, que preconiza o estudo quantitativo das lesões induzidas por produtos cosméticos na **conjuntiva, córnea e íris**, com os resultados do Teste **RBC**, *in vitro*, que preconiza a análise quantitativa da hemólise e desnaturação protéica induzidas pelos mesmos produtos, em **eritrócitos** de mamíferos, com a finalidade não só de validar este último como um Teste **preliminar** capaz de selecionar produtos altamente irritantes, excluindo-os do Teste de Draize, bem como avaliar o Teste *in vitro*, como uma alternativa válida para uma eventual substituição do Teste *in vivo*. Para isto, realizamos estudo paralelo *in vivo/in vitro* de 23 substâncias-teste (19 produtos cosméticos e 4 tensoativos) procurando relacionar as lesões das 3 estruturas oculares, quantificadas por **escores**, com os 3 parâmetros *in vitro*, referentes à indução, em eritrócitos de carneiro, (i) de **hemólise (H₅₀)** e (ii) de **desnaturação protéica (ID)**, cuja razão **H₅₀/ID**, reflete o **Potencial de Irritação(PI)** das substâncias-teste. Em termos de **tensoativos**, obtivemos expressivas correlações entre as médias dos escores máximos (**MEM**) das lesões das três estruturas oculares, com os efeitos induzidos nos 3 parâmetros *in vitro*, com Coefs. Correlação de **Pearson (CCP)** de **0,900 a 0,988**. Resultados análogos ocorreram com os **produtos cosméticos** em relação à conjuntiva e córnea (**CCP: 0,682 a 0,788**) porém, em menor escala, em relação à íris. (**CCP: 0,513 a 0,519**), Portanto, o Ensaio RBC pode ser usado como “screening” para avaliar o **PI** de produtos cosméticos que contenham tensoativos pois revelou-se capaz de prever, com um elevado nível de precisão (96%) o valor desse PI. Além disso mostrou elevados graus de sensibilidade e especificidade, com índices da ordem de 94 e 100%, respectivamente.

ABSTRACT

The objective of the present study was to correlate the results obtained *in vivo* with the standard Draize test of ocular irritation, which permits a quantitative study of the lesions induced by cosmetic products in the conjunctiva, cornea and iris, with the *in vitro* results of the sheep red blood cell (RBC) test, which permits a quantitative analysis of the hemolysis and protein denaturation induced by the same products in mammalian erythrocytes, in order not only to validate the latter as a preliminary test capable of selecting highly irritating products, excluding them from the Draize test, but also to evaluate the *in vitro* test as a valid alternative for an eventual replacement of the *in vivo* test. To this end, we performed a parallel *in vivo/in vitro* study of 23 test substances (19 cosmetic products and 4 tensoactive agents) in order to relate the lesions of the 3 ocular structures, quantified by scores, to the 3 *in vitro* parameters concerning the induction of (i) hemolysis (**H₅₀**) and (ii) protein denaturation (**ID**) in sheep RBC whose H₅₀/ID ratio reflects the irritation potential (IP) of the test substances. With respect to the tensoactive agents, we obtained significant correlations between mean maximum scores for the lesions of the three ocular structures and the effects induced on the 3 *in vitro* parameters, with Pearson correlation coefficients (**PCC**) of **0.900** to **0.988**. Similar results were obtained for the cosmetic products with respect to the conjunctiva and the cornea (**PCC: 0.682 to 0.788**) although to a lesser extent compared to the iris (**PCC: 0.513 to 0.519**). Thus, the RBC assay can be used as a screening method to assess the IP of cosmetic products containing tensoactive agents since it proved to be able to predict the IP value with a high level of accuracy (96%). In addition, the assay showed high sensitivity and specificity rates of 94 and 100%, respectively.

SUMÁRIO

Lista de Figuras	viii
Lista de Tabelas.....	xiii
Lista de Quadros.....	xv
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	xvi
Resumo.....	xvii
Abstract.....	xviii
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Considerações Gerais.....	1
1.2 Fragmentos da História.....	3
1.2.1 Vigilância Sanitária.....	3
1.2.2 Teste de Draize.....	5
1.2.3 A Regra dos 3 R's – Métodos Alternativos.....	6
1.3 Ensaio RBC – “ Red Blood Cell Test System “	8
1.3.1 Mecanismo de Hemólise.....	9
1.3.1.1 Tensoativo catiônico.....	10
1.3.1.2 Tensoativo aniônico.....	11
1.3.1.3 Tensoativo não-iônico.....	11
1.3.2 Mecanismo de desnaturação da hemoglobina.....	11
1.3.3 Propriedades da hemoglobina e seus derivados.....	13
2 OBJETIVO.....	16
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.1 Ensaio <i>in vivo</i> de Irritação Ocular.....	17
3.1.1 Procedimento.....	17
3.2 Ensaio <i>in vitro</i> RBC em hemácias de carneiro.....	21
3.2.1 Detalhes do procedimento.....	21
3.2.2 Procedimento do ensaio.....	23
3.3 Análise Estatística.....	26
4 RESULTADOS.....	27
4.1 Experimentos <i>in vivo</i>	27
4.2 Experimento <i>in vitro</i>	39
5 DISCUSSÃO.....	53
6 CONCLUSÕES.....	75
7 REFERÊNCIAS.....	79
8 ANEXOS.....	84
Anexo 1 Protocolo de Recebimento do Projeto pela CEUA-FIOCRUZ.....	85
Anexo 2 Fórmula e pH dos produtos estudados.....	86
Anexo 3 Cálculo da determinação da classificação do potencial de irritação da substância-teste.....	89

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais

Produtos cosméticos tem uma história de muitos anos, sendo usados pelo homem desde épocas remotas. Inicialmente, as fontes de seus ingredientes eram essencialmente plantas, animais e minerais, no entanto o avanço da tecnologia resultou na inclusão de muitas substâncias químicas sintéticas na formulação destes produtos. Atualmente o uso, principalmente como produto de higiene, é amplo e atinge um grupo populacional cada vez maior, como assinala o “The Scientific Committee on Cosmetic Products on Non-food Products Intended for Consumers” (SCCNFP/O119), 1999.

Na prática, os produtos cosméticos têm sido raramente associados com sérios danos a saúde. Entretanto, isto não significa que produtos cosméticos sejam sempre seguros, especialmente considerando os efeitos a longo prazo. Considerando o fato que esses produtos podem ser usados extensivamente em um amplo período de nossa vida, sentiu-se a necessidade de garantir a segurança em relação a eles, através do controle da toxicidade do produto final e dos seus ingredientes. Assim, a legislação brasileira de acordo com a (Resolução Nº 79, de 2000), estabeleceu normas e procedimentos para registro de Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes, adotando a seguinte definição de produtos cosméticos:

Produtos cosméticos são “substâncias ou preparações para serem colocadas em contato direto com as várias partes do corpo humano, incluindo, pele, cabelos, unhas, lábios e órgãos genitais externos, dentes e membranas mucosas da cavidade oral, com a finalidade exclusiva ou principal de limpá-los, perfumá-los ou protegê-los, com o objetivo de mantê-los em boas condições , mudar sua aparência ou corrigir odores do corpo”.

Segundo o Decreto Nº 79.094, de 1977, os produtos cosméticos colocados no mercado não devem causar danos à saúde quando aplicados sob condições normais ou previsíveis de uso. Em relação aos produtos destinados ao uso infantil

a legislação é clara, salientando que: “produtos cosméticos não podem conter substâncias cáusticas ou irritantes”. Sendo assim, os produtos cosméticos devem passar por um processo de avaliação de risco para que se faça valer o direito do consumidor e, principalmente, garantir a saúde da população.

A avaliação de risco é o processo em que estimamos a probabilidade de um determinado agente químico produzir efeitos adversos em um dado segmento populacional, sob determinadas condições de exposição. É o resultado deste processo, conhecido como caracterização do risco, que orienta as decisões das Autoridades Regulatórias, destinadas a reduzir ou eliminar riscos que envolvem agravos à saúde decorrentes da exposição a substâncias químicas. Portanto, para que se possa utilizar com segurança (recíproca de risco) um produto, é preciso submetê-lo a uma bateria de ensaios toxicológicos, com o objetivo de se obter informações que tem por finalidade avaliar a segurança do uso do produto acabado. Tais informações poderão resultar do conhecimento da toxicidade dos ingredientes sem necessidade do teste no produto final.(KLAASSEN e WATKINS, 1999).

Nesse contexto, se encaixa o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (**INCQS/FIOCRUZ**), órgão que tem por missão avaliar a qualidade de produtos e insumos sujeitos à vigilância sanitária, cuja avaliação está baseada em Ensaios de Segurança.

Portanto, a intervenção da autoridade regulatória no mercado é fundamental e se justifica face à necessidade de garantir a saúde da população e os direitos do consumidor. No entanto, alguns ensaios toxicológicos utilizados no Controle de Qualidade de produtos, e.g. testes de rotina descritos nas Farmacopéias ou em diretrizes Internacionais (OECD/1987, CRF/1973 e ISO–10993-parte 10/1995), tais como o teste *in vivo* para detecção de contaminantes pirogênicos em coelhos, o teste de determinações de DL₅₀ em ratos e camundongos, o teste de irritação dérmica em coelhos e o teste de Draize - irritação ocular em coelhos têm sido questionados pelos grupos defensores do bem estar dos animais por levarem ao sofrimento e sacrifício injustificados de um número extraordinário de animais. Esta tendência internacional, vem se tornando cada vez mais crescente também no

Brasil, onde Instituições de Pesquisa, como e.g. a FIOCRUZ, já contam com comissões especializadas em analisar, caso a caso, a utilização de animais de laboratório (**Comissão de Ética em Uso de Animais - CEUA/FIOCRUZ**). Cabe, portanto, ao profissional envolvido em questões técnico-científicas o bom senso na utilização de ensaios toxicológicos e a busca de abordagens alternativas, evitando sempre que possível o sofrimento e a morte desnecessários dos animais de experimentação.

As metodologias *in vitro* para determinação do potencial tóxico de ingredientes presentes nos produtos cosméticos relatadas na literatura não tem sido ainda suficientemente validadas para uso, a não ser em áreas tais como: (i) estudo de mutagenicidade/genotoxicidade, (ii) pré-“screening” para irritação, (iii) ensaios para avaliar o potencial de corrosão na pele –TER - Transcutaneous Electrical Resistance (Resistência elétrica transcutânea), utilizando pele humana reconstituída e (iv) Teste de Fototoxicidade – 3T3 NRU.(FRAME,2002)

1.2 FRAGMENTOS DA HISTÓRIA

1.2.1 Vigilância Sanitária

A Vigilância Sanitária é a forma mais ampla e complexa de existência da Saúde Pública , pois atua sobre fatores de risco associados a produtos, insumos e serviços relacionados com a saúde, com o ambiente, inclusive o de trabalho, e com a circulação internacional de transportes, cargas e pessoas (COSTA e ROZENFELD, 2000, p.15).

A busca da saúde e as ações de controle sobre o exercício da medicina, o meio ambiente, os medicamentos e os alimentos acompanham a história das civilizações, isto é, desde longínquas eras. A saúde era considerada essencial à dignidade humana. O homem, desde o século XVI a.C já possuía habilidade para preparar drogas e lhes delimitar prazos de validade. Os perfumes também faziam parte das preocupações de povos antigos, que poderiam ser objeto de práticas desonestas por parte dos comerciantes. Na Índia, em 300 a.C, uma lei proibiu a

adulteração de alimentos, medicamentos e perfumes (COSTA e ROZENFELD, op. cit., p. 19).

Dando um salto na história da Vigilância Sanitária e chegando ao século XX, merecem ser citados os anos 1928 (Noruega) e 1934 (Suécia), que assinalam os primeiros países a regulamentar sobre segurança e eficácia de medicamentos. Logo em seguida, em 1938, os EUA aprovam o “Food, Drug, and Cosmetic Act”, (**FDA**) dando ênfase aos seguintes aspectos:

- proibir a comercialização de novas substâncias antes de comprovação de segurança ao FDA;
- regulamentar a propaganda e coibir a falsa;
- regulamentar os avisos em rotulagens;
- regulamentar o estabelecimento de sanções e penalidades.

Na década de **1960**, o episódio da **Talidomida**, constitui-se num marco da história da regulamentação sanitária no mundo. Criaram-se órgãos nacionais de controle e se publicou farta legislação, com vistas a garantir a segurança e eficácia dos produtos, atribuindo aos fabricantes responsabilidade pela qualidade dos produtos oferecidos ao mercado e o monitoramento pós-comercialização dos efeitos adversos (COSTA e ROZENFELD, op. cit., p. 22).

No Brasil, a Vigilância Sanitária tem sua história iniciando-se no Brasil-Colônia em que o controle sanitário baseava-se no modelo existente em Portugal. Caminhando para o Brasil-República, na época de **Oswaldo Cruz** aprova-se o Decreto Nº 5156 de **1904**, que implanta o novo **Regulamento dos Serviços Sanitários da União**, estabelecendo, pela primeira vez, a necessidade de elaboração de um Código Sanitário pela União e a Instituição do Juízo dos Feitos de Saúde Pública, ocorrendo, em **1923**, a elaboração do **Código Sanitário Federal**. (COSTA e ROZENFELD, op. cit., p. 22 a 26).

Na década de **1950**, foi criado o **Ministério da Saúde** (Lei Nº 1920/53). No ano seguinte criou-se o Laboratório Central de Controle de Drogas e Medicamentos(**LCCDM**), para realizar análises e estabelecer padrões. Em **1961**, este laboratório incorporou a área de alimentos, transformando-se no Laboratório

Central de Controle de Drogas, Medicamentos e Alimentos(LCCDMA) (COSTA e ROZENFELD, op. cit., p.30).

Na década de **1980**, o LCCDMA foi transferido para a Fundação Oswaldo Cruz, onde renasceu com estrutura moderna e novo nome, Instituto Nacional de Controle e Qualidade em Saúde (**INCQS**), que tem por missão: **“Contribuir para a promoção e recuperação da saúde e prevenção de doenças, atuando como referência nacional para questões científicas e tecnológicas relativas ao controle da qualidade de produtos, ambientes e serviços vinculados à Vigilância Sanitária.”** (COSTA e ROZENFELD, op. cit., p. 34).

No Brasil, até 1988, Vigilância Sanitária era definida como : “ um conjunto de medidas que visam elaborar, controlar a aplicação e fiscalizar o cumprimento de normas e padrões de interesse sanitário relativo a portos, aeroportos e fronteiras, medicamentos, cosméticos, alimentos, saneantes e bens, respeitando a legislação pertinente, bem como o exercício profissional relacionado com a saúde.” (COSTA e ROZENFELD, op. cit., p.34).

Porém, com a criação da Lei Nº 8080 de **1990**, chamada **Lei Orgânica da Saúde**, organiza o **Sistema Único de Saúde** e define a **Vigilância Sanitária** como: **“ um conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir, ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e de prestação de serviços de interesse a saúde.”** (SILVA, 2000, p 274).

Com a nova definição, a Vigilância Sanitária perde o caráter burocrático e normativo, introduz o conceito de risco e confere um caráter mais completo ao conjunto de ações, situando-se na esfera da produção (COSTA e ROZENFELD, op. cit., p.16).

Assim o objetivo de qualquer ação de Vigilância Sanitária é fiscalizar o cumprimento da legislação e que a principal função da avaliação analítica realizada por um Laboratório Oficial é fornecer subsídios para ação da fiscalização, elucidando dúvidas quanto à qualidade dos produtos que estão no mercado. Neste contexto, o INCQS exerce um importante papel frente à saúde da

população, sendo assim, necessária a constante atualização de metodologias que visem melhoria na qualidade e na confiabilidade dos produtos comercializados.

1.2.2 TESTE DE DRAIZE

O Teste de Draize, o primeiro ensaio preditivo para determinação da irritabilidade oftálmica induzida por drogas, cosméticos e substâncias químicas foi descrito pela primeira vez por John H. Draize e colaboradores em 1944 (Draize, 1944), que preconiza a utilização de 9 (nove) coelhos albinos, nos quais instila-se 0,1mL da substância-teste em um dos olhos de cada animal para observar e graduar as possíveis injúrias que a substância-teste venha causar na conjuntiva (Hiperemia, Quimose e Secreção), na íris (Hiperemia, Hemorragia e Edema) e na córnea (Opacidade), nos períodos de 1, 24 e 48 horas.

Entretanto, ao longo dos anos, o Teste de Draize-Irritação Ocular vem sofrendo alterações significativas, sempre com o intuito de reduzir o número de animais e minimizar o sofrimento dos mesmos. Estas alterações foram descritas nas seguintes diretrizes internacionais: **OECD**, **CRF** e **ISO 10993-10**. De fato, entre os testes toxicológicos que utilizam animais, o Teste de Draize é um dos mais criticados, particularmente no que diz respeito à avaliação do potencial de irritação ocular de produtos cosméticos. Apesar disto, ele ainda é o único ensaio aceito pelas agências regulatórias mundiais. Entretanto, diante das críticas que vem sofrendo, o meio científico tem demonstrado uma forte tendência em aplicar a regra dos Três Erres(3 R's) que analisaremos a seguir.

1.2.3 A Regra dos 3 R's – Métodos Alternativos

A preocupação com questões éticas em pesquisa animal começou a crescer após a Segunda Guerra Mundial. Na **Inglaterra**, em **1947**, um novo conceito, cognominado dos “**três erres**”, começou a emergir de trabalhos da Federação de Universidades para o Bem-estar Animal – “Universities Federation for Animal Welfare” - **UFAW**), ainda em forma bastante incipiente. Somente em **1957**, o conceito dos 3 R's foi pela primeira vez, discutido publicamente em um encontro da UFAW sobre questões éticas aplicadas a animais de laboratório.

Em **1959**, William Russel e Rex Burch apresentaram à comunidade científica o livro “**The Principles of Humane Experimental Technique**” (Princípios Humanitários em Técnicas Experimentais) definindo os 3R’s: que, em língua inglesa, referem-se a três fatores cognominados “**refinement**”, “**reduction**” e “**replace**” isto é, respectivamente, (1) **refinamento**, que consiste em qualquer desenvolvimento tecnológico direcionado a minimizar a incidência e/ou severidade de procedimentos não-éticos, principalmente no campo da toxicologia experimental em animais de experimentação, (2) **redução**, como um meio de diminuir o número de animais utilizados e (3) **substituição** –envolvendo qualquer método científico que empregue materiais não-sensitivos, isto é, tendência em substituir testes *in vivo* pelos *in vitro*.

Nas décadas de **1960-1970** a discussão sobre o uso de animais em pesquisas biológicas, tornou-se mais abrangente e madura. Estas décadas viveram a discussão de temas, tais como: (i) meios para se reduzir tanto o número de animais de laboratório quanto o número de experimentos realizados; (ii) otimização das condições que promovessem um maior bem-estar de animais em experimentação animal, e (iii) desenvolvimento de métodos de refinamento das técnicas convencionais, além de, sempre que possível, a tentativa de substituir modelos *in vivo* por modelos *in vitro*.

Somente na década de **1980** a Europa adotou o conceito dos 3R’s, criando a Directive 86/609, que descreve as leis que regem a proteção dos animais usados em experimentação (BALLS et al., 2001; ROWAN, 1997).

Por outro lado, devido a importância e a necessidade regulatória dos métodos alternativos em relação ao Ensaio de Draize - Irritação Ocular em Coelho, várias Entidades tais como: **National Centre for Documentation and Validation of Alternatives to Animal Experiments (ZEBET)**, **Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM)**, **Interagency Regulatory Alternatives Group (IRAG)**, **European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)**, **European Cosmetic, Toiletry & Perfumery Association (COLIPA)** e **Fund for Replacement of Animal in**

Medical Experiments (FRAME) vem trabalhando arduamente para a validação de métodos alternativos em toxicologia.

Face ao exposto, uma breve evolução temporal histórica, referente aos estudos realizados sobre validação de métodos alternativos como “screening” e/ou como substituição ao Teste Draize – Irritação Ocular em Coelho, será apresentado a seguir.

1. BGA/BMBF – Estudo Nacional de Validação na Alemanha – Estudo de dois métodos alternativos ao Teste de Draize- – “The HET-CAM Test and the 3T3 NRU Cytotoxicity Test” (1988–1995), (SPIELMANN et al., 1996).

2. Estudo IRAG – Estudo Internacional Retrospectivo sobre o “CAM—Based Assay”, organizado pelas “US Regulatory Agencies”(991-1994), (SPIELMANN, 1997)

3. Estudo EC/HO – Estudo Internacional de Validação –“Alternatives to the Draize Eye Irritation Test”, organizado pela UK e patrocinado pela EU (1992 – 1995), .(BALLS, 1995).

4. Estudo do Grupo Japonês de Validação Nacional – “First phase of the In Vitro Eye Irritation Teste for Cosmetic Ingredients” (1991–1995), (OHNO, 1994)

5. Estudo COLIPA – Estudo Internacional de Validação – “Summary report of the Study on Alternatives to the Draize Rabbit Eye Irritation Test” (1994–1997), (BRANTON et al., 1997).

Atualmente, vários grupos de pesquisadores vem estudando através de diversos métodos alternativos a determinação da irritabilidade oftálmica (BRADLAW, 1997), tais como:

Teste em olho isolado de coelho

Teste em olho enucleado de galinha

Opacidade e permeabilidade corneal bovina

Teste em membrana corion alantóide de ovo embrionado de galinha

Ensaio de citotoxicidade em células SIRC

Ensaio de captação do vermelho neutro

Ensaio de difusão em agar

“Red Blood Cell” (RBC) teste de hemólise.

Sabendo-se que lesões vasculares, bem como alteração morfo-fisiológica na córnea estão presentes no teste *in vivo*, a escolha do método alternativo Ensaio RBC (Lise e desnaturação), WOLFGANG et al., (1990) tem por finalidade avaliar a possibilidade de uma boa correlação com os resultados obtidos no Teste de Draize - Irritação Ocular, uma vez que avalia os fenômenos de hemólise e desnaturação protéica, determinados pela substância-teste.

1.3 Ensaio RBC – Teste de hemólise

Desenvolvido por WOLFGANG et al., (1987) o ensaio avaliava somente o fenômeno de hemólise, frente a uma substância-teste. Em 1990, estes autores o padronizaram em termos de estimar o potencial de irritação de tensoativos e produtos que os contenham (xampus, sabonetes, produtos de limpeza, etc.) com modificação na metodologia, isto é, avaliando não só o dano causado na membrana celular dos eritrócitos (hemólise), mas também os danos causados nas proteínas celulares liberadas (desnaturação), que podem ser sensivelmente detectados pela mudança na absorvância da oxiemoglobina, indicador de ambos os processos (WOLFGANG et al., 1990).

1.3.1 Mecanismo de hemólise

O conhecimento sobre a propriedade hemolítica de tensoativos vem de longos anos, porém somente na década de 1930 com o estudo da físico-química começou-se a compreender o mecanismo de hemólise por tensoativos.

Conhecer a composição e estrutura da membrana citoplasmática do eritrócito e as propriedades físico-químicas dos tensoativos é de fundamental importância, pois somente assim será possível compreender como os tensoativos (catiônicos, aniônicos e não-iônicos) interagem com a membrana celular (KONDO, 1976).

A membrana celular do eritrócito é composta de 46 – 55% de proteínas, 35 – 45% de lipídios e 10% de oligossacarídeos.

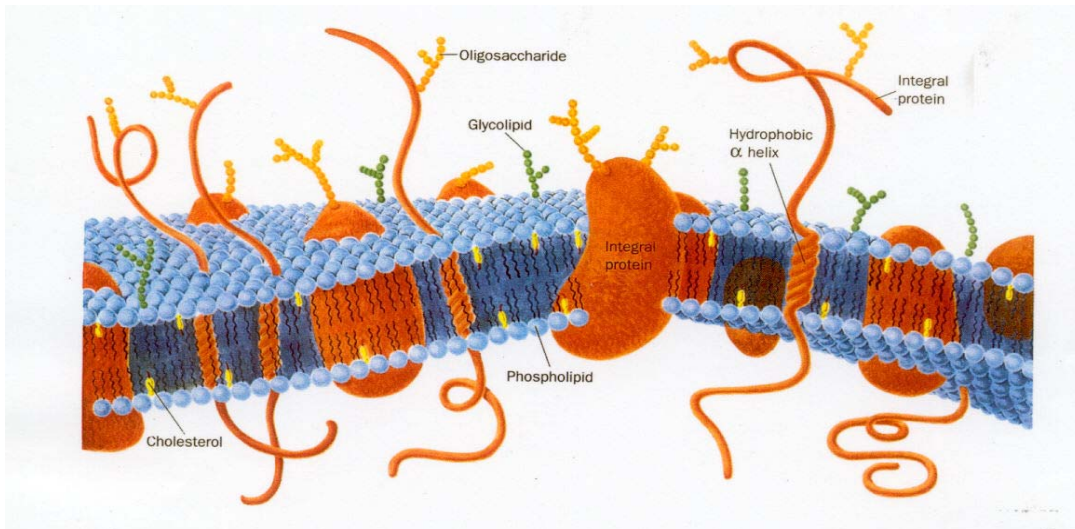


Fig. 1 Representação esquemática da membrana citoplasmática do eritrócito

O mecanismo de hemólise está diretamente relacionado com a estrutura do tensoativo, isto é, o modo de interação com os componentes de membrana celular vai depender da natureza química do tensoativo.

Os tensoativos são de considerável importância na indústria de cosmético. Quando aplicados topicamente, a sua atividade tóxica sobre a pele e membranas mucosas, está diretamente relacionada à sua concentração, cuja atividade sobre o sistema biológico pode ser amplamente explicada através de suas propriedades físico-químicas. Neste aspecto, são subdivididos em quatro grupos, de acordo com sua estrutura química.

- Aniônicos;
- Catiônicos;
- Não-iônicos;
- Anfóteros

A propriedade dos tensoativos de se adsorver nas interfaces, causa uma considerável influência sobre as membranas biológicas, determinando o processo de citólise, o qual é bem demonstrado em eritrócitos (KONDO, 1968, 1969; 1976 e GLOXHUBER, 1974). Trabalhos experimentais com vários tensoativos tem demonstrado que o poder de toxicidade está diretamente relacionado com a concentração e com o comprimento da cadeia do grupo lipofílico e que os

tensoativos aniônicos freqüentemente exibem maior efeito do que os não- iônicos (GLOXHUBER, 1974).

1. 3. 1. 1 - Tensoativo catiônico

Quando o tensoativo catiônico entra em contato com a porção lipoprotéica da membrana celular, interage electrostáticamente com as moléculas de fosfolipídios. Deste modo, o tensoativo toma o lugar de algumas moléculas de fosfolipídios resultando em uma desordem parcial da membrana celular e/ou alteração da sua permeabilidade, permitindo assim a liberação da hemoglobina no meio, causando o fenômeno de hemólise.

1. 3. 1. 2 - Tensoativo aniônico

Os tensoativos aniônicos, quando em contato com os eritrócitos são adsorvidos pela camada de proteínas da membrana celular, resultando na solubilização de algumas proteínas e/ou causando mudanças na permeabilidade celular, permitindo assim a liberação da hemoglobina para o meio extracelular, levando ao processo de hemólise.

1. 3. 1. 3- Tensoativo não-iônico

O modo de ação do tensoativo não-iônico necessita de mais estudos, para melhor compreensão . Porém admite-se que a incorporação do tensoativo não-iônico à porção lipoprotéica da membrana celular possa causar uma desordem parcial da membrana e/ou mudanças na permeabilidade celular, levando à hemólise.

1. 3. 2 Mecanismo de desnaturação da hemoglobina

A hemoglobina dos mamíferos é uma proteína conjugada, formada por tetrâmeros com 4 cadeias peptídicas sendo duas cadeias α e duas cadeias β , unidas cada uma a um grupo heme. A cadeia α contém 141 resíduos de

aminoácidos e a β , 146 resíduos (VILLELA et al., 1966, LEHNINGER et al., 1995 e VOET e VOET., 1995).

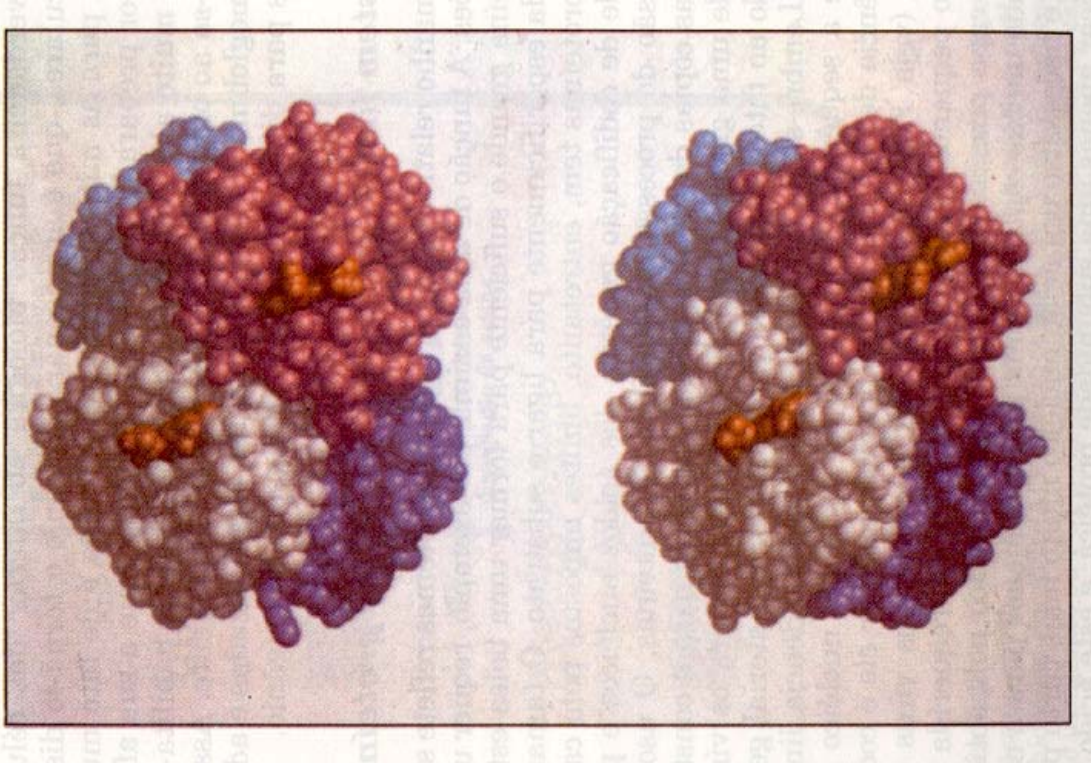


Fig. 2 Mudanças conformacionais induzidas na hemoglobina pela ligação com o oxigênio. A forma do lado direito é a **oxiemoglobina** e a forma do lado esquerdo é a **desoxiemoglobina**. As subunidades α estão ilustradas em branco e azul-claro; as subunidades β estão mostradas em diferentes tons de púrpura e o grupo heme, colorido em vermelho.

Nos mamíferos, a quantidade de hemoglobina por 100mL de sangue é proporcional ao número de glóbulos vermelhos, cuja variação nas diferentes espécies é evidenciada no **Quadro 1**. Normalmente a hemoglobina tem três estruturas conformacionais ; oxi, deoxi e metemoglobina (VOET e VOET., 1995).

Quadro 1. Relação entre a quantidade de hemoglobina e o número de eritrócitos em diferentes espécies animais.

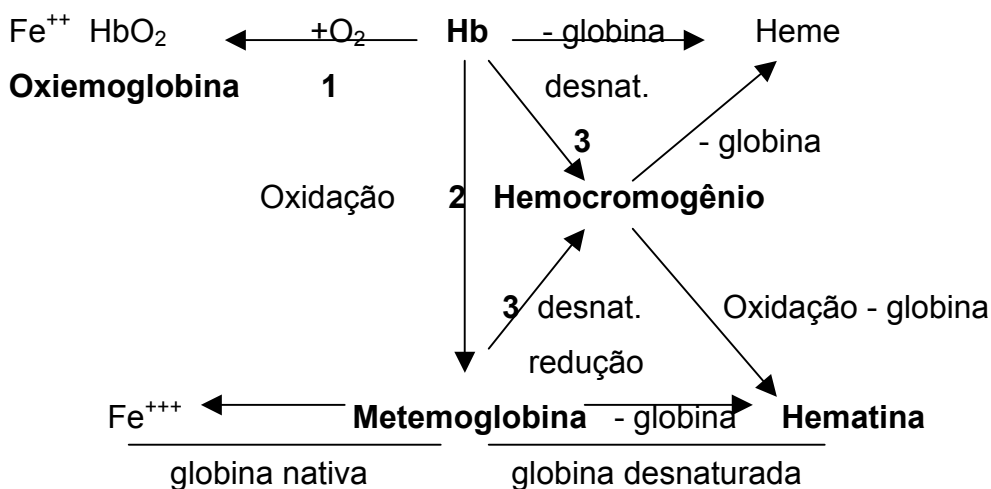
Espécie animal	Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	Hemoglobina g/100mL
Homem	5,0	15,5
Carneiro	11,5	13,2
Rato	9,0	13,8
Camundongo	9,2	14,6
Coelho	6,0	13,5
Bovino	6,3	12,03

Fonte: VILLELA et al.,(1996)

1.3.3 Propriedades da hemoglobina e seus derivados

A hemoglobina e seus derivados apresentam espectros de absorção característicos que permitem diferenciá-los ao exame espectrocópico. A cor da hemoglobina se deve à distribuição eletrônica, de acordo com o ressonância, ao estado de ferro e ao composto de adição.

O espectro de absorção da oxiemoglobina apresenta duas faixas(α e β) em 576 e 540nm e uma terceira(γ) em 414nm, faixa de Soret. No esquema abaixo pode-se observar as inter-relações dos derivados da hemoglobina (Hb), onde se destacam: (1) oxigenação da Hb, formando a oxiemoglobina, (2) oxidação da Hb para metemoglobina, (3) desnaturação da Hb formando o hemocromogênio



Define-se desnaturação protéica como sendo a perda da ordem estrutural (em níveis secundários, terciários e quaternários, ou uma combinação destas) a qual confere à proteína sua atividade biológica. A mudança na estrutura da proteína, produzida pela desnaturação, é quase sempre invariavelmente associada à perda da função.

As proteínas podem ser desnaturadas não somente pelo aquecimento, mas também: (1) por valores extremos de pH, (2) por alguns solventes miscíveis com a água, como o etanol ou a acetona e (3) por detergentes. Estes últimos agem primariamente pela ruptura das interações hidrofóbicas que fazem estável o núcleo das proteínas globulares (LEHNINGER et al., 1995).

De acordo com HAYASHI et al., (1995) o fenômeno de desnaturação da hemoglobina por tensoativos ocorre através de dois mecanismos: (i) destruição da α -hélice e (ii) mudança na cadeia β implicando na mudança estrutural e no ambiente ao redor do grupo heme.

Segundo MAcDONALD et al., (1994), a hemoglobina quando em meio aquoso, sem o sistema metemoglobina redutase, presente nos eritrócitos intactos, os grupos hemes da mesma podem se auto-oxidar de forma contínua. Nestas condições, ocorrem as seguintes alterações na hemoglobina: (i) dissociação dos tetâmeros e (ii) distorções da estrutura terciária. A figura 3 apresenta o esquema dos fenômenos de oxidação e desnaturação da hemoglobina.

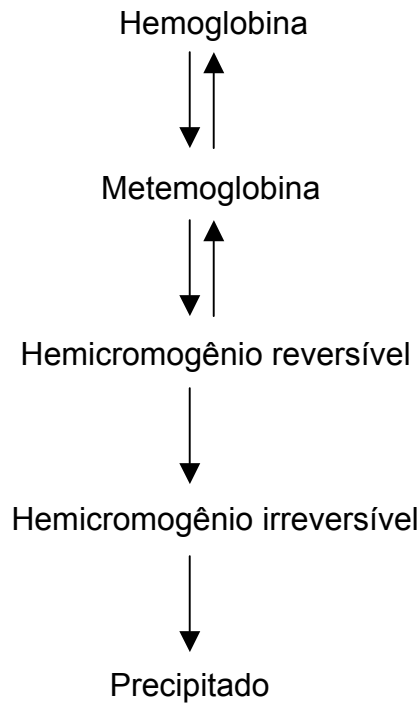


Fig. 3 Esquema geral da oxidação e degradação da hemoglobina. O primeiro produto de reação em meio aquoso e pH neutro é a metemoglobina. Esta, pode se transformar em hemicromogênio reversível, o qual se não sofrer redução se converterá em hemicromogênio irreversível com subsequente precipitação.

REZA et al., (2002) relatam que o duodecil sulfato de sódio (**SDS**), detergente aniônico com propriedade desnaturante, quando em concentrações maiores de 2mM determina o desdobramento de muitas proteínas, porém em concentrações menores que 2mM pode causar compactação de algumas proteínas. REZA et al., (2002), relatam também que o efeito dos tensoativos na desnaturação protéica, é predominantemente uma contribuição eletrostática.

2. OBJETIVOS

Sendo o Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde(INCQS) o órgão de referência nacional responsável pela avaliação da qualidade de insumos, produtos, ambientes e serviços sujeitos à Vigilância Sanitária, faz-se necessária a constante atualização de metodologias que visem melhoria na qualidade e na confiabilidade desses produtos. A este propósito, face ao grande desenvolvimento das indústrias de cosméticos no país e sabendo-se que os tensoativos, componentes presentes na maioria dos produtos cosméticos, têm propriedade tóxica quando em contato com a pele ou membrana mucosa, há uma tendência mundial no desenvolvimento de métodos alternativos que visem a redução e/ou até mesmo a substituição de animais nos ensaios para avaliar o potencial de irritabilidade dessas substâncias.

2.1 Objetivo principal

Comparar os resultados obtidos nos ensaios *in vivo* e *in vitro*, com a finalidade de substituição do ensaio em animais ou no seu refinamento com conseqüente redução no número de animais.

2.2. Objetivos específicos

Avaliar a viabilidade do uso de sangue desfibrinado de carneiro em substituição às hemácias de bovino bem como avaliar a interferência nos fenômenos de hemólise e desnaturaçãõ da hemoglobina em relação ao tempo de manutenção dos eritrócitos, avaliando-se a fragilidade da membrana celular no decorrer da armazenagem.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Ensaio *in vivo* de Irritação Ocular

Os ensaio *in vivo* foram realizados segundo o **POP** (Procedimento Operacional Padrão) nº 65.3330.004 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. Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética de Uso de Animais (**CEUA/FIOCRUZ**), de acordo com o modelo do processo apresentado no **Anexo 1**.

3.1.1 Procedimento

A) Animais: Coelhos albinos, machos ou fêmeas da raça Nova Zelândia, hípidos, provenientes da Cunicultura Rivadávia, do Rio de Janeiro, RJ. Com peso corpóreo acima de 2,0Kg. Foram utilizados cinco animais por substância-teste.

B) Condições de 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 para animais de laboratório – Nuvilab coelhos (Nuvital) e água ad libitum.

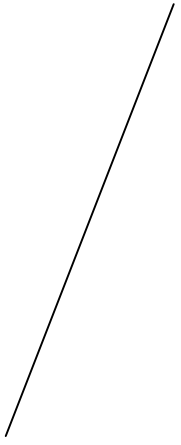
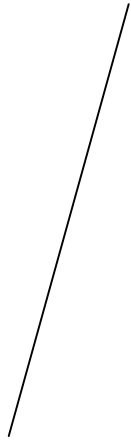
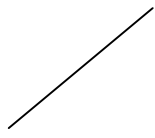
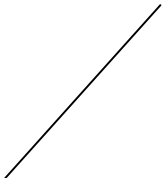
C) Preparo dos Animais: Ambos globo oculares de cada animal foram examinados 24 horas antes do início do ensaio. Os animais que apresentaram injúrias na conjuntiva e globo ocular foram descartados.

D) Aplicação: Instilou-se 0,1mL do produto no saco conjuntival inferior e, em seguida massageou-se gentilmente durante 30 segundos.

Observação: Substâncias ou produtos fortemente ácidos ou alcalinos (pH menor que 2,0 ou maior que 11,5) não foram testados porque são reconhecidamente corrosivos. As formulações e o pH dos produtos cosméticos analisados, encontram-se descritos no **Anexo 2**.

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 como assinala o **Quadro 2**.

Quadro 2. Graduação das Alterações e Lesões do Globo Ocular de Coelhos após Instilação no Saco Conjuntival Inferior de 0,1 ml de Substância-teste

		Graduação					
Estrutura		Alteração	0	1	2	3	4
Córnea	Opacidade	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	¼ (ou menos), mas não zero	Maior do que ¼ e menor do que a metade	Maior do que a metade e menor do que ¾	Maior do que ¾ até a área total
Íris		Irite	Íris normal	Raias com congestão, edema, injeção 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 pálebras, pêlos e área considerável ao redor do olho	

G) Avaliação dos Resultados

A avaliação foi feita 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 (Quadro 2), 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 (ver exemplo em **Anexo 3**).

$$L_{xt} = (A \times B) \times 5 + (C \times 5) + [(D + E + F) \times 2] \quad , \text{ onde:}$$

L_{xt} = 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 e 72h (ME_{24h} , ME_{48h} , ME_{72h}).

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

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

F_c = faixa de confiança;

ME_{max} = 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 1, referente à Classificação Prévia do Produto.

Tabela 1. Classificação Prévia do Potencial de Irritabilidade do Produto Cosmético

Classe	Faixa (quantificação das lesões)	Classificação
I	0,0 a 14,9	Produto não-irritante
II	15,0 a 24,9	Produto levemente irritante
III	25,0 a 49,9	Produto irritante moderado
IV	50,0 a 79,9	Produto irritante severo
V	80,0 a 110,0	Produto irritante máximo

Etapa II – Classificação Final do Potencial de Irritabilidade do Produto

Esta etapa foi utilizada para confirmar ou alterar a classificação da substância-teste, encontrada na Etapa I. Para tal, fez-se uso da Tabela 2, referente à Classificação final do produto.

Tabela 2. Classificação final do Produto.

Classificação	Confirmação da classificação inicial
Não irritante (classe I)	$M_{24h} < 2.4$ – classe I; se $M_{24h} > 2.4$ ir para classe 2
Irritante leve (classe II)	(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
Irritante moderado (classe III)	(1) $M_{7d} \leq 20$, ir para o item (2); se $M_{7d} > 20$, ir para a 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
Irritante severo (classe IV)	(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
Irritante Máximo (Classe V)	(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

H) Classificação do Potencial de Irritabilidade

- 1- Não irritante
- 2- Irritante leve
- 3- Irritante moderado
- 4- Irritante severo
- 5- Irritante máximo

3.2 Ensaio *in vitro* RBC em hemácias de carneiro

O Ensaio RBC “Red Blood Cell Test System” é um teste simples, no qual utilizam-se hemácias de mamíferos, sendo caracterizado por “endpoints” definidos e objetivos (hemólise e desnaturação), usando como indicador desses fenômenos a oxiemoglobina. O ensaio é rápido, barato, não requer equipamento especial e necessita somente de 1 hora por amostra (WOLFGANG et al., 1987, 1990).

A metodologia utilizada é uma integração entre os protocolos: INVITTOX (1992) e ZENECA (1994), os quais apresentam o mesmo objetivo que é: “Quantificar os efeitos adversos induzidos pelos tensoativos ou pelos produtos que os contenham, na membrana citoplasmática de eritrócitos (hemólise) em combinação com a desnaturação protéica, fenômenos estes, avaliados através da espectrofotometria da oxiemoglobina, indicador natural de ambos processos”.

3.2.1 Detalhes do procedimento

- a. **Produtos:** foram comprados em estabelecimentos comerciais, localizados na cidade do Rio de Janeiro.
- b. **Tecido:** amostras de sangue desfibrinado de carneiro proveniente do Centro de Criação de Animais de Laboratório (**CECAL/FIOCRUZ**).

c. Equipamentos e materiais

- . microtubos de polipropileno com tampa e capacidade de 1,5mL
- . centrifuga refrigerada – Sorvall RC-5B
- . microcentrifuga – Beckman Microfuge™ B centrifuge
- . microscópico óptico – Olympus BH2
- . espectrofotômetro dual-beam(UV/VIS) – Shimadzu UV – 160
- . agitador
- . micropipetas de 2-20 μ L, 20-200 μ L, 100-1000 μ L
- . tubos de polipropileno capacidade 10mL
- . pipetas de 5mL
- . cubetas capacidade 1cm

d. Reagentes

- . Na₂HPO₄ – Synth Lote 50494 (PA)
- . KH₂PO₄ – VETEC Lote 001568 (PA)
- . NaCl – SIGMA Lote 70K0049 (PA)
- . Glicose – VETEC Lote 002277 (PA)

e. Preparo do PBS (tampão fosfato-salino)

pH na faixa de 7.2 – 7.4

Na₂HPO₄ – 22.2mmol/L

KH₂PO₄ - 5.6mmol/L

NaCl - 123.3mmol/L

Glicose - 10.0mmol/L

A solução de PBS deve ser preparada a cada semana e conservada a 4°C.

3.2.2. Procedimento do ensaio

a. Preparo e estocagem das células vermelhas do sangue

a.1. Amostras de sangue desfibrinado de caneiro

- Coletadas à vácuo, em frasco de vidro contendo pérolas de vidro, no volume de 50mL, obtido diretamente do CECAL/FIOCRUZ

a.2. Isolamento das hemácias

- Centrifugar o sangue a 3000 rpm por um período de 15 minutos;
- Aspirar o sobrenadante cuidadosamente e lavar as hemácias em tampão fosfato-salino (PBS) 3 vezes por centrifugação a 3000rpm, para retirar traços de plasma e de outras impurezas;
- Ressuspender as hemácias em PBS suplementado com 10mmol/L de glicose na concentração de 8×10^9 cél./mL e estocar em microtubos com capacidade de 1.5mL. Conservar a 4°C.

Nota: Antes de usar, equilibrar as células a temperatura ambiente.

O sangue de bovino armazenado nestas condições pode ser usado por um período de 4 semanas (WOLFGANG et al., 1990). No presente trabalho, avaliamos esta possibilidade testando eritrócitos de carneiro.

b. Estudo da IC₅₀

b.1. Substâncias-teste – diluídas em PBS nas seguintes concentrações mg/L

1,0

10,0

100,0

1.000,0

10.000,0

100.000,0

- 25µL da suspensão de hemácias em PBS, foi adicionado em 975µL da substância –teste, diluída no mesmo solvente, seguido de homogeneização

- e incubação por 10 minutos a temperatura ambiente com agitação constante;
- após o período de incubação, centrifugou-se a, aproximadamente, 10.000 rpm durante 1 minuto;
 - o sobrenadante foi decantado em cubeta de 1cm sendo medida a absorbância no comprimento de onda de 540nm contra o branco (substância-teste diluída em PBS). Os resultados foram comparados com o tubo totalmente lisado pela água destilada.

b. 2. Hemólise

- A partir dos dados obtidos no estudo da IC₅₀, foram elaboradas as curvas dose-resposta referentes aos tensoativos e aos produtos comerciais em estudo, aplicados em concentrações crescentes a partir de, respectivamente, 1 e 10 mg/mL;
- incubadas com 25µL da suspensão de hemácias em PBS por 10 minutos a temperatura ambiente com agitação constante;
- após este período de incubação, centrifugou-se a, aproximadamente 10.000 rpm durante 1 minuto e o grau de hemólise foi determinado no sobrenadante a 540 nm contra o branco. As leituras obtidas foram comparadas com a leitura do tubo totalmente lisado pela água destilada, de forma a calcular a concentração efetiva que causa 50% de hemólise (H₅₀).

Nota: As substâncias-teste foram avaliadas em triplicatas e empregando-se, no mínimo de 6 diluições.

b.3. Desnaturação

- foi preparada uma solução mãe da substância-teste em PBS na concentração de 10mg/mL,
- aliquotou-se 100µL da solução mãe no caso de tensoativos em microtubo de 1,5mL acrescentando-se 875µL de PBS e no caso de produtos foi aliqotado 975 µL da solução mãe em microtubo de 1.5mL;
- colocou-se 25µL de eritrócitos e incubou-se por 10 minutos a temperatura

- ambiente em agitação constante;
- terminado o período de incubação, centrifugou-se a 10.000rpm durante 1 minuto;
 - o sobrenadante foi decantado em cubeta de 1cm;
 - mediu-se a absorbância nos comprimentos de onda de 540 e 575 nm contra o branco (substância-teste diluída em PBS);
 - dividiu-se a extinção medida a 575nm(α) pela extinção medida a 540nm(β) obtendo-se a proporção α/β . Esta proporção foi usada para caracterizar o Índice de Desnaturação da hemoglobina(ID).
 - Equação para obtenção do Índice de Desnaturação(ID):

$$ID(\%) = (R_1 - R_i) / (R_1 - R_2) \times 100, \text{ onde:}$$
 - R_1 - proporção α/β da hemoglobina;
 - R_i - proporção α/β da substância-teste;
 - R_2 - proporção α/β do SDS a 0,1%.

Em adição, a relação entre a concentração que causa 50% de hemólise(H_{50}) e o Índice de Desnaturação (**ID**), definido como o quociente de H_{50} / ID , calculado para cada substância-teste, foi usado para comparação com os dados obtidos *in vivo* . O Quadro 3 refere-se à classificação do potencial de irritação ocular (WOLFGANG et al. 1990).

Quadro 3. Classificação do potencial de irritação ocular

<i>IN VIVO</i>	<i>IN VITRO</i> (H_{50} / ID)
Não Irritante	>100
Irritante Leve	≥ 10
Irritante Moderado	≥ 1
Irritante Severo	≥ 0.1
Irritante Máximo	<0.1

3.3 Análise Estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente usando a **versão 13** do Programa **Minitab**, utilizando os Coeficientes de **Pearson** e **Spearman**, para correlacionar com os 3 parâmetros obtidos nos experimentos *in vitro* (**H₅₀**, **ID** e **H₅₀/ID**) com os **escores** referentes às lesões ocorridas nas 3 estruturas oculares (**conjuntiva**, **córnea** e **íris**) nos ensaios *in vivo*. A reprodutibilidade dos valores das **H₅₀**, entre os dois analistas, foi avaliada de acordo com as médias dos valores do **Coeficiente de Variação** de cada analista, utilizando o programa **EXCEL – Windows (2000)**, sendo a distribuição dos valores das **H₅₀** representada sob a forma de **Distribuição no Intervalo Interquartil (Box-plot)**. A diferença entre os valores das **H₅₀** obtidos empregando-se eritrócitos em diferentes tempos de armazenamento, utilizamos o Teste não-paramétrico de **Mann-Whitney**, cujos resultados, foram confirmados pela aplicação de Teste paramétrico da relação concentração-resposta do tipo não -linear, cujas curvas sigmóides, foram obtidas através do programa de computador **Graph Pad Prism**.

4. RESULTADOS

4.1 – Experimentos *in vivo*

A classificação dos produtos, quanto ao seu potencial de irritabilidade oftálmica, foi realizada segundo o POP 65.3330.004/INCQS-FIOCRUZ e se encontram resumidos na **Tabela 3**. Dentre os **19** produtos avaliados, **7** tiveram a classificação de **não irritantes** (SH1, CO13, CO14, CO15, CO16, CO17 e CO19), **3** foram classificados como **irritantes leves** (SH2, CO18 e SH30), **5** foram considerados como **irritantes moderados** (SH21, SH22, SH23, SH27 e SH28) e **4** foram classificados como **irritantes severos** (SH24, SH25, SH26 e SH29).

Tabela 3. Classificação do potencial de irritação ocular de produtos cosméticos codificados resultante de Teste *in vivo* de Draize- usando 5 coelhos por amostra .

Produto	MEM/estrutura			MEM	Média de 24h/estrutura			Escore 24h	TRL (dias)	Classificação
	Córnea	Iris	Conjuntiva		Córnea	Iris	Conjuntiva			
SH1*	0	0	1.6	1.6	0	0	1.6	1.6	3	NI
SH2*	4	0	4.8	8.8	4	0	4.4	8.4	7	IL
CO13*	0	0	0.8	0.8	0	0	0.8	0.8	0	NI
CO14*	0	0	0.8	0.8	0	0	0.8	0.8	0	NI
CO15*	0	0	1.2	1.2	0	0	1.2	1.2	2	NI
CO16*	0	0	0.8	0.8	0	0	0.8	0.8	0	NI
CO17*	0	0	0.4	0.4	0	0	0.4	0.4	0	NI
CO18*	0	0	3.6	3.6	0	0	3.6	3.6	3	IL
CO19	0	0	2.4	2.4	0	0	2.4	2.4	2	NI
SH21	36	5	13.2	52.2	20	4	13.2	37.2	>7	IM
SH22	16	2	12.4	29	12	2	12.4	26.4	>7	IM
SH23	24	3	11.2	38.2	15	3	11.2	29.2	7	IM
SH24	36	3	12.8	52.2	20	2	12.8	34.8	>7	IS
SH25	36	3	10.8	46.2	20	1	10.8	31.8	>7	IS
SH26	20	0	7.6	26.4	16	0	7.2	23.2	>7	IS
SH27	4	0	8.4	12.4	4	0	8.4	12.4	7	IM
SH28	24	2	8	34	16	2	7.2	25.2	>7	IM
SH29	18	4	11.6	32	16	2	10.8	28.8	>7	IS
SH30	0	0	7.2	7.2	0	0	7.2	7.2	3	IL

* Produtos da linha infantil

NI – Não Irritante; **IL** – Irritante Leve; **IM** – Irritante Moderado; **IS** – Irritante Severo;

Escore **córnea** = Opacidade (0 – 4) x área (0 – 4) x 5 = 80(valor máximo)

Escore **íris** = graduação (0 – 2) x 5 = 10 (valor máximo)

Escore **conjuntiva**=Hiperemia{(0 – 3)+quimose(0 – 4)+secreção(0 – 3)}x2 = 20(valor máximo)

A média do escore máximo (**MEM**) foi calculada com os valores dos escores referentes à conjuntiva, íris e córnea dos cinco coelhos, nos períodos de 24, 48 e 72 horas, prevalecendo o maior escore referentes aos três períodos. **Escore 24 h**: referente somente ao período de 24h.

TRL – Tempo de regressão das lesões.

Correlação entre as médias do escores máximos por estrutura ocular, obtidos no Ensaio de Draize – Irritação Ocular e o tempo de regressão das lesões

Dos 19 produtos analisados, **9** (SH1, CO13, CO14, CO15, CO16, CO17, CO18, CO19 e SH30) apresentaram regressão dos seus efeitos de irritabilidade em um tempo inferior a 3 dias, enquanto que **3** (SH2, SH23 e SH27) produziram lesões que persistiram por mais de 3 dias, porém com total regressão em 7 dias e, **7** tiveram lesões que não regrediram no sétimo dia.

Os produtos classificados *in vivo* como **não irritantes** ou **irritantes leves** mostraram um baixo poder de toxicidade, sendo este visível com maior frequência na conjuntiva ao contrário dos classificados como **irritantes moderados** e **severos**, os quais, na sua grande maioria, causaram lesões indistintamente nas três estruturas oculares córnea, íris e conjuntiva como pode ser visto na **Tabela 3**.

A análise da **MEM** para cada estrutura do olho, nos indica que quanto maior for o grau de severidade da lesão, maior o tempo necessário para regressão dos efeitos observados (**Figs. 4, 5 e 6**). Os produtos que apresentaram graduação (**0**) em, pelo menos, duas estruturas, tem uma tendência de regressão da lesão menor ou igual a 3 dias (com uma única exceção, o **SH2**, com regressão no 7º dia) sendo, de um modo geral, classificados como **não irritantes** e/ou **irritantes leves**, como pode ser evidenciado na **Tabela 3** (pg 27). Porém a análise dos produtos considerados **irritantes moderados** e **severos**, revela ser esta tendência menos evidente embora se mostre clara quando comparados com os **não irritantes** como revela a **Fig. 7**.

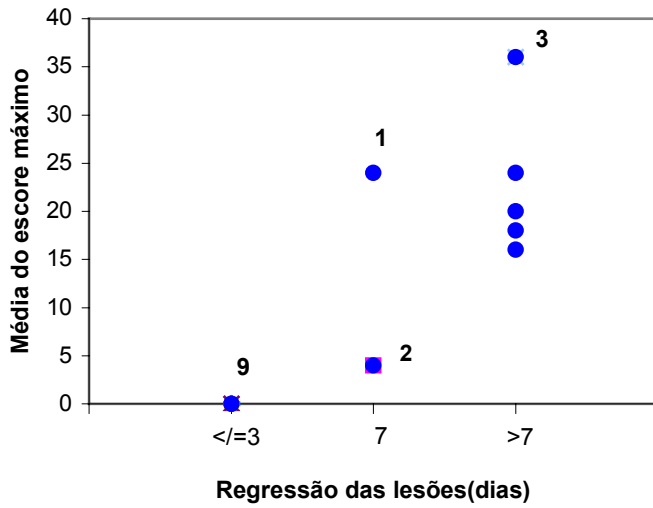


Fig. 4 Relação entre as médias dos escores máximos das lesões da **córnea** e o tempo necessário para regressão dos efeitos de irritabilidade.

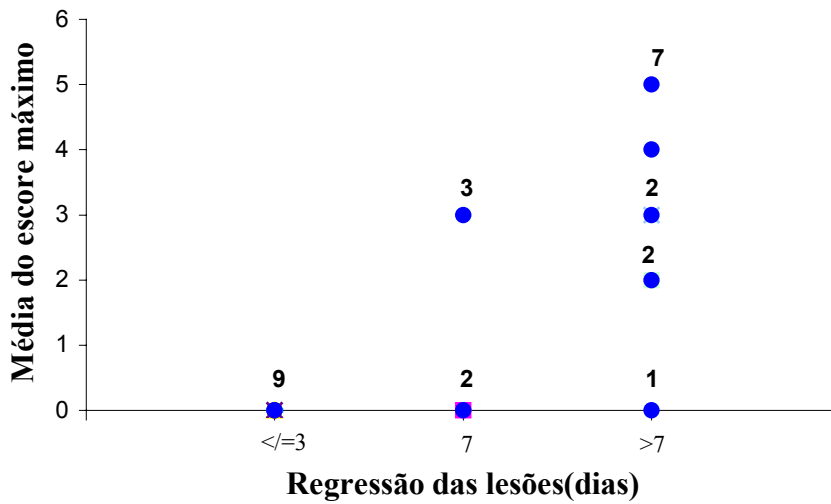


Fig. 5 Relação entre as médias dos escores máximos das lesões da **íris** e o tempo necessário para regressão dos efeitos de irritabilidade.

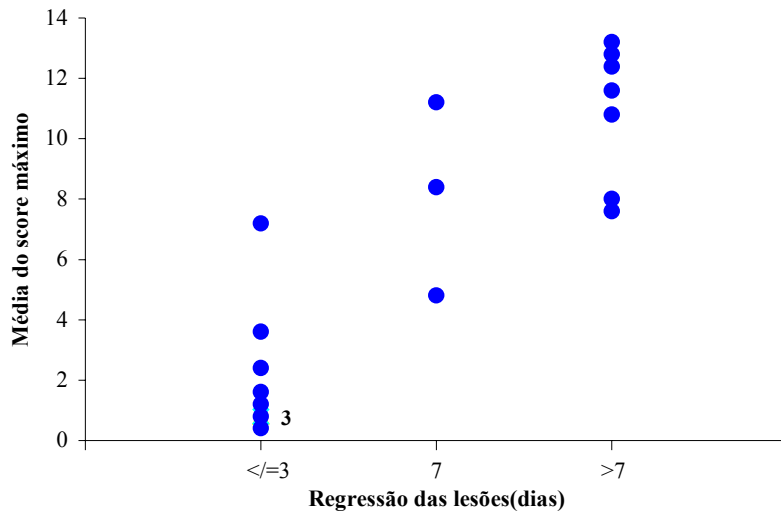


Fig. 6 Relação entre as médias dos escores máximos das lesões da **conjuntiva** e o tempo necessário para regressão dos efeitos de irritabilidade.

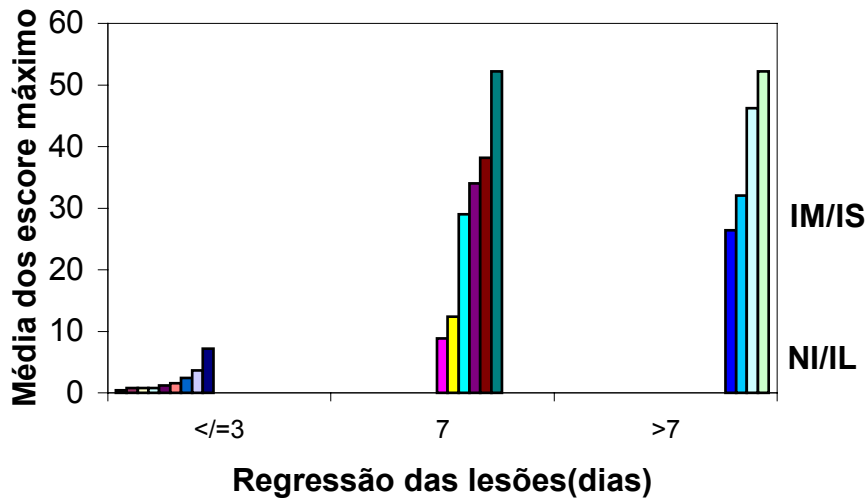


Fig. 7 Relação entre o tempo de regressão das lesões oculares e o potencial de irritabilidade de 19 produtos cosméticos.

A Figura 8, mostra as médias dos escores máximos de irritação dos 19 produtos cosméticos analisados, notar que 10 produtos apresentam $MEM \leq 10$ sendo classificados como **NI** ou **IL** e que os demais com $MEM > 10$ correspondem aos **IM** e **IS**. Os valores das **MEM** individuais estão transcritos na **Tabela 3**.

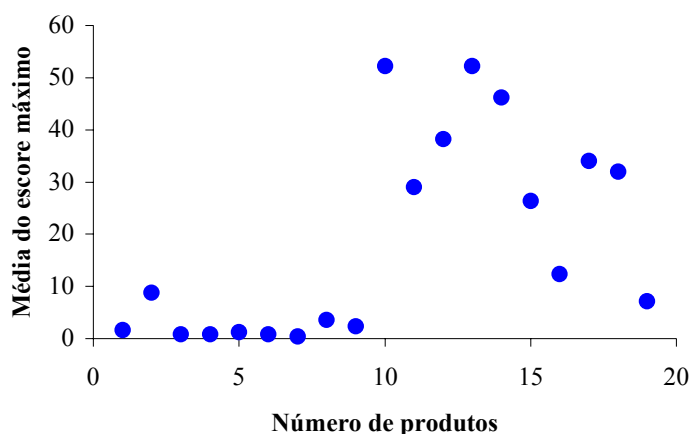


Fig. 8 Plotagem das médias dos escores máximos (MEM) dos 19 produtos cosméticos em estudo.

Correlação entre as MEM e as médias dos escores observadas na córnea, íris e conjuntiva.

A análise de regressão entre as médias dos escores máximos e as médias dos escores por estrutura do globo ocular, evidenciou que, no ensaio *in vivo* há uma boa correlação entre a severidade das lesões observadas à nível de córnea, íris e conjuntiva como pode ser visto nas **Figuras 9, 10 e 11**. O resultado desta análise, nos permite dizer, no que se refere aos produtos analisados, que: (i)– produtos que causam lesões severas tendem a afetar as três estruturas, com exceção de dois produtos (**SH26** e **SH27**) que não induziram alterações na íris (**Tabela 3**, pg. 27); (ii) – produtos que induzem alterações de menor severidade, em geral comprometem praticamente somente a conjuntiva.

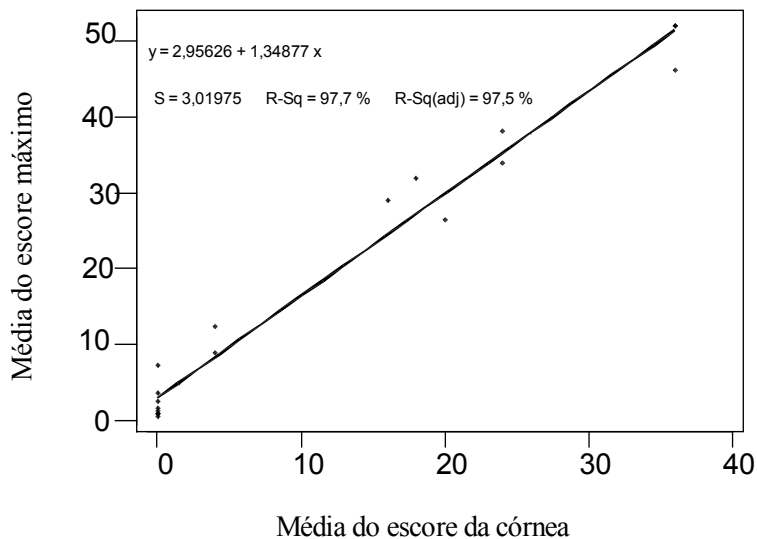


Fig. 9 Análise de regressão entre as médias dos escores máximos e as médias dos escores da **córnea**. Coeficiente de correlação de **Pearson** $r = 0,985$, $p = 0,000$

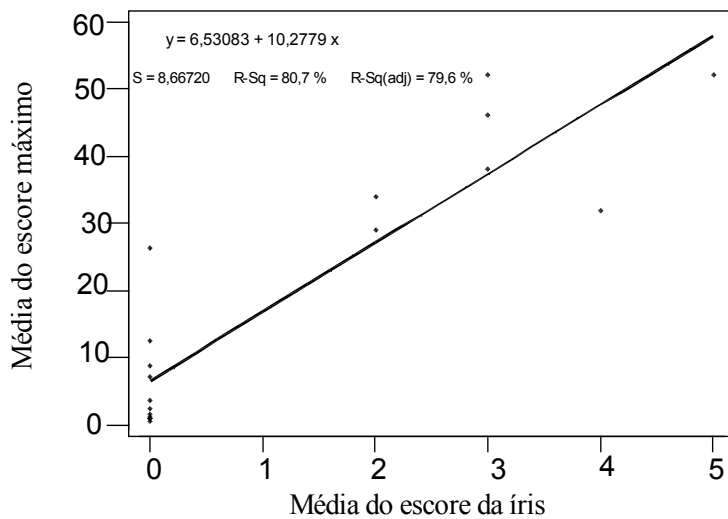


Fig. 10 Análise de regressão entre a médias dos escores máximos e as médias dos escores da **íris**. Coeficiente de correlação de **Pearson** $r = 0,864$, $p = 0,000$

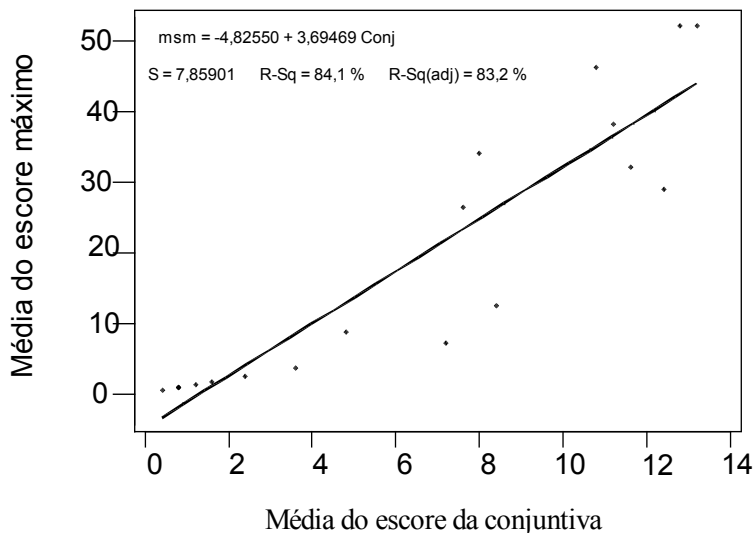


Fig. 11 Análise de regressão entre a médias dos escores máximos e a média dos escores da **conjuntiva**. Coeficiente de correlação de **Pearson** $r = 0,850$, $p = 0,000$

Os coeficientes de correlação encontrados quando se comparam as médias dos escores por estruturas com as médias dos escores máximos estão descritos na **Tabela 4**. A grandeza dos valores dos escores da córnea pode ser explicada pelo fato da graduação do fenômeno (0 – 80) ser bem superior às graduações observadas na **íris** (0 – 10) e na **conjuntiva** (0 – 20).

Tabela 4. Correlação entre as médias dos escores por estrutura com as médias dos escores máximos.

Estrutura	Córnea	Íris	Conjuntiva
Íris	0,807		
Conjuntiva	0,759	0.810	
Média escore máximo	0.985	0.864	0.850

Coeficiente de Correlação de **Pearson**.

A **Figura 12** mostra com bastante clareza a boa correlação que há entre as médias dos escores máximos e as médias dos escores de 24 horas bem como a distribuição dos produtos quanto ao seu poder de irritabilidade. Os produtos

classificados como **NI** e **IL** se encontram agrupados à esquerda e os **IM** e **IS** à direita da figura, com apenas uma exceção, o produto (**SH27**) classificado como **IM** que, entretanto, apresenta um escore próximo do escore dos produtos classificados como **IL**

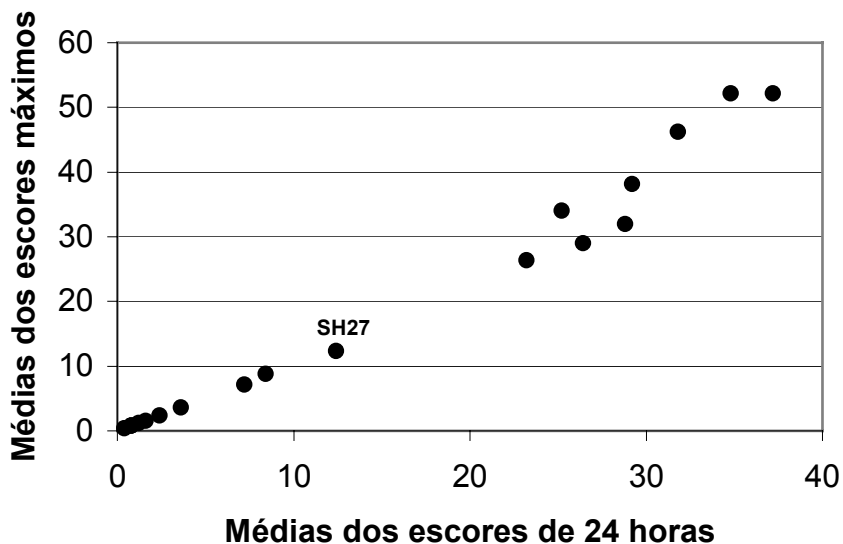


Fig. 12 Correlação entre as médias dos escores máximos e as de 24 horas. Coeficiente de correlação de **Pearson** $r = 0,987$ e $p = 0,000$

Concernente aos tensoativos analisados, o **Quadro 4** nos mostra o poder de toxicidade destes agentes quando aplicados no olho do animal, em concentrações selecionadas a partir de dados da literatura : (i) Dodecil sulfato de sódio (aniônico) a 16%; (ii) Lauril éter sulfato de sódio (aniônico) a 10%; (iii) Cocoamido propil betaina (anfotérico) a 10% e (iv) Cloreto de benzalcônio (catiônico) a 1%.

Quadro 4.- Classificação do potencial de irritação de tensoativos resultante de Teste *in vivo* de Draize usando 5 coelhos por amostra

Tensoativo	MEM/estrutura			MEM	Média de 24h/estrutura			Escore 24h	TRL	
	Córnea	Iris	Conjuntiva		Córnea	Iris	Conjuntiva		Dias	Classificação
T.1	0	0	4.8	4.8	0	0	4.8	4.8	7	IL
T.2	0	0	3.2	3.2	0	0	2.8	2.8	7	IL
T.3	25.6	6.4	12.8	38.8	12.8	0.8	12.8	29.6	>7	IS
T.4	30.4	4	13.2	46.4	4	1.6	10.8	16.4	>7	IS

T.1 – Cocoamido propil betaina (Anfotérico); T.2 – Lauril éter sulfato de sódio (Aniônico); T.3 – Dodecil sulfato de sódio (Aniônico); T.4 – Cloreto de benzalcônio (Catiônico).

IL – Irritante Leve; **IS** – Irritante Severo;

Escore **córnea** : Opacidade(0 – 4) x área(0 – 4) x 5 = 80(valor máximo)

Escore **íris** : graduação (0 – 2) x 5 = 10 (valor máximo)

Escore **conjuntiva** : Hiperemia{(0 – 3) + quimose(0 – 4) + secreção(0 –3)} x 2 = 20(valor máximo).

TRL – Tempo de regressão das lesões.

O **Quadro 4** e a **Figura 13** ressaltam o comportamento das três categorias de tensoativos, mostrando com bastante evidência que: (i) – o catiônico (**T.4**) apresenta uma agressividade superior a dos aniônicos (**T.2** e **T.3**); (ii) – a córnea é a estrutura que mais sofre com a ação dos tensoativos. Além disso, os dois tensoativos classificados como **Irritantes Leves (T.1 e T.2)**, independentemente da sua natureza química, isto é seja ele iônico ou anfótero, não se diferenciam quanto ao poder de irritabilidade. Notar que: (i) – **T₁** e **T₂** são inócuos para córnea e íris e com baixo poder irritante na conjuntiva; (ii) – os **T₃** e **T₄** causam lesões indistintamente nas 3 estruturas, porém com maior severidade na córnea, seguida da conjuntiva e da íris.

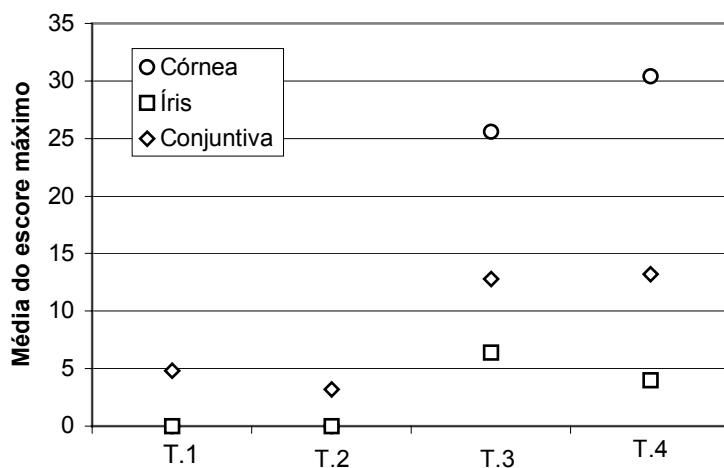


Fig. 13 Representação gráfica das lesões induzidas por tensoativos nas 3 estruturas oculares.

Natureza das lesões observadas

A **Figura 14** mostra o globo ocular de um coelho normal e as demais figuras (**Figuras 15 a 18**) ilustram as alterações encontradas com maior frequência em animais tratados com os produtos cosméticos estudados.

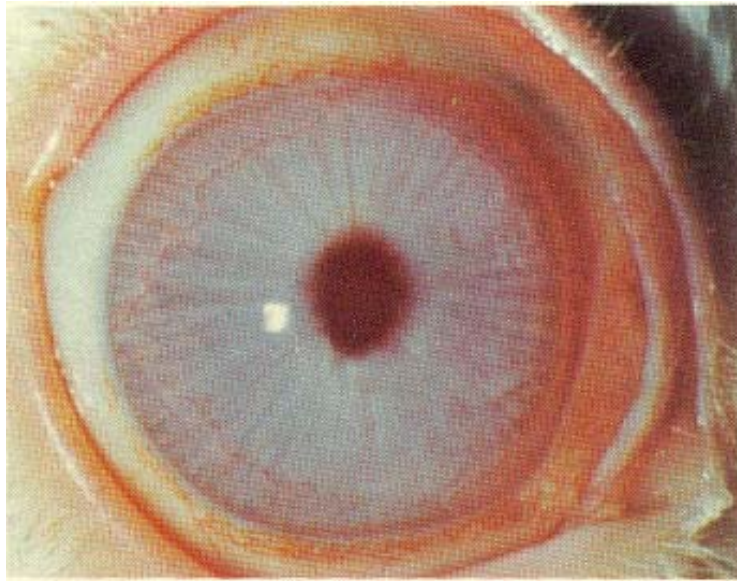


Fig. 14 Olho de coelho preservado em sua forma íntegra .

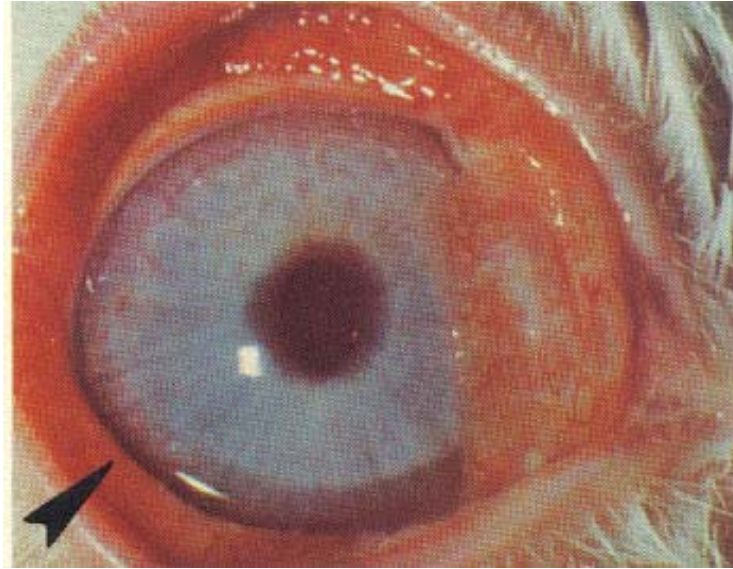


Fig. 15 Olho apresentando **HIPEREMIA** de grau 2, conforme indicado pela ponta da seta.

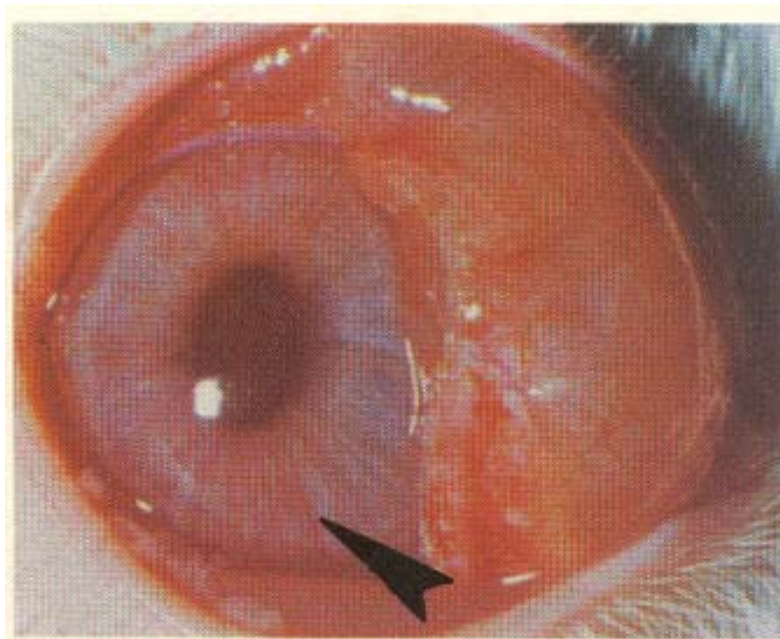


Fig. 16 Olho apresentando **IRITE** de grau 1, mostrando as raias da íris bem definidas, conforme indicado pela ponta da seta.

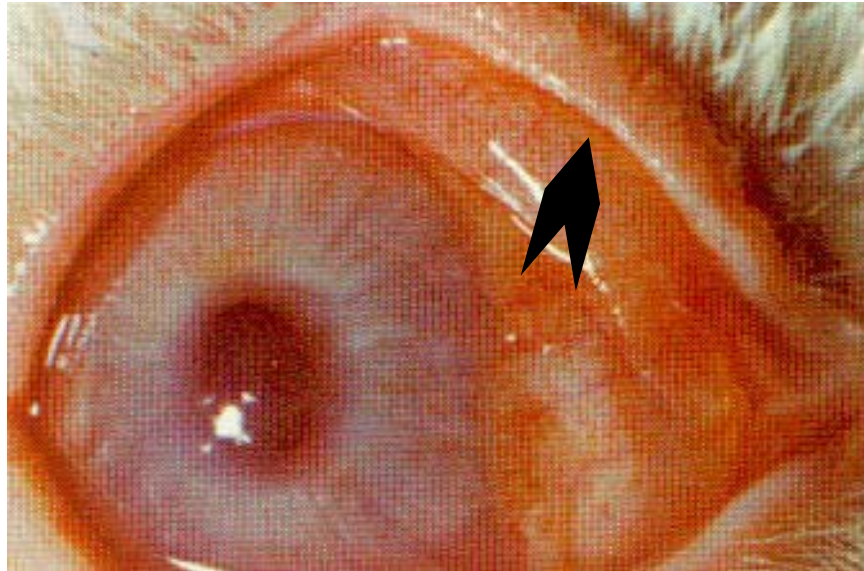


Fig. 17 Olho apresentando **QUIMOSE** (edema) de grau 2 na conjuntiva palpebral conforme indicado pela ponta da seta.

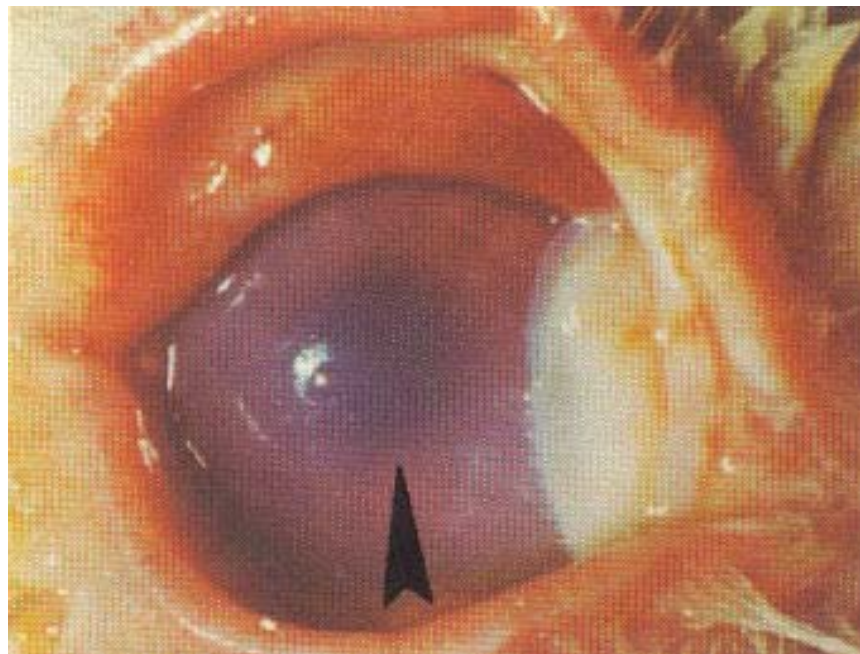


Fig. 18 Olho de coelho apresentando **OPACIDADE** de grau 2 na córnea, conforme indicado pela ponta da seta.

4.2 Experimentos *in vitro*

Os valores das IC₅₀, isto é das doses que causam 50% de hemólise (H₅₀), dos Índices de Desnaturação (ID) e da razão H₅₀/ID a qual possibilitará elaborar uma possível classificação do potencial de irritação de cada substância – teste, estão registrados nas **Tabelas 5 e 6**. A determinação das H₅₀ foi feita através de curvas dose resposta. Na primeira curva, trabalhamos com 8 concentrações e, na segunda, com o mínimo, 6 concentrações. Os tensoativos e os produtos em análise, foram testados usando as soluções mães de 1mg/mL e 10mg/mL respectivamente, para a determinação da concentração que causa 50% de hemólise.

Tabela 5. Valores das H₅₀, dos ID e da razão H₅₀/ID de tensoativos avaliados por diferentes analistas.

Tensoativos	Experimento	Analista 1			Analista 2		
		H ₅₀ ug/mL	ID (%)	H ₅₀ /ID	H ₅₀ ug/mL	ID (%)	H ₅₀ /ID
T.1	1	62,56	2,56	24,44	71.21	2,56	27,82
	2	68,83	2,56	26,89	63.34	2,56	24,74
	3	61,88	2,56	24,17	61.74	2,56	24.12
T.2	1	70,07	12,82	5,47	63.81	15.38	4.15
	2	65,77	15,38	4,28	67.58	15.38	4.39
	3	61,66	17,95	3,44	58.04	15.38	3.77
T.3	1	24,72	100	0,25	24.14	100	0,24
	2	24,57	100	0,25	22.62	100	0,23
	3	20,57	100	0,21	21.69	100	0,22
T.4	1	29,30	100	0,29	29.53	100	0,29
	2	29,46	100	0,29	27.59	100	0,28
	3	25,83	100	0,25	25.67	100	0,26

T.1 – Cocoamido propil betaína, T.2 – Lauril éter sulfato de sódio

T.3 – Lauril sulfato de sódio, T.4 – Cloreto de benzalcônio.

H₅₀ - dose efetiva que causa 50% de hemólise.

ID – Índice de Desnaturação.

H₅₀/ID – razão utilizada para classificação do potencial de irritação.

Tabela 6. Valores das H₅₀ , dos ID e da razão H₅₀/ID de produtos cosméticos avaliados por diferentes analistas.

Produtos	Experimento	Analista 1			Analista 2		
		H ₅₀ ug/mL	ID (%)	H ₅₀ /ID	H ₅₀ ug/mL	ID (%)	H ₅₀ /ID
SH.1	1	2.002,50	2,56	782,23	1.974,53	2,56	771,30
	2	1.992,80	2,56	778,44	1.960,45	2,56	765,80
	3	1.360,22	2,56	531,34	1.661,36	2,56	648,97
SH.2	1	1.227,88	12,82	95,78	1.136,86	12,82	88,68
	2	1.122,53	12,82	87,56	1.096,02	12,82	85,49
	3	1.026,27	12,82	80,05	943,33	12,82	73,58
CO.13	1	>10.000,0	N.D	N.D	>10.000,0	N.D	N.D
	2	>10.000,0	N.D	N.D	>10.000,0	N.D	N.D
	3	>10.000,0	N.D	N.D	>10.000,0	N.D	N.D
CO.14	1	>10.000,0	N.D	N.D	>10.000,0	N.D	N.D
	2	>10.000,0	N.D	N.D	>10.000,0	N.D	N.D
	3	>10.000,0	N.D	N.D	>10.000,0	N.D	N.D
CO.15	1	>10.000,0	N.D	N.D	>10.000,0	N.D	N.D
	2	>10.000,0	N.D	N.D	>10.000,0	N.D	N.D
	3	>10.000,0	N.D	N.D	>10.000,0	N.D	N.D
CO.16	1	>10.000,0	N.D	N.D	>10.000,0	N.D	N.D
	2	>10.000,0	N.D	N.D	>10.000,0	N.D	N.D
	3	>10.000,0	N.D	N.D	>10.000,0	N.D	N.D
CO.17	1	>10.000,0	N.D	N.D	>10.000,0	N.D	N.D
	2	>10.000,0	N.D	N.D	>10.000,0	N.D	N.D
	3	>10.000,0	N.D	N.D	>10.000,0	N.D	N.D

N.D – Não determinado

H₅₀ - dose efetiva que causa 50% de hemólise.

ID – Índice de Desnaturação.

H₅₀/ID – razão utilizada para classificação do potencial de irritação.

Tabela 6. Complementar. Valores das H₅₀, dos ID e da razão H₅₀/ID de produtos avaliados por diferentes analista.

Produtos	Experimento	Analista 1			Analista 2		
		H ₅₀ ug/mL	ID (%)	H ₅₀ /ID	H ₅₀ ug/mL	ID (%)	H ₅₀ /ID
CO.18	1	>10.000,0	N.D	N.D	>10.000,0	N.D	N.D
	2	>10.000,0	N.D	N.D	>10.000,0	N.D	N.D
	3	>10.000,0	N.D	N.D	>10.000,0	N.D	N.D
CO.19	1	>10.000,0	N.D	N.D	>10.000,0	N.D	N.D
	2	>10.000,0	N.D	N.D	>10.000,0	N.D	N.D
	3	>10.000,0	N.D	N.D	>10.000,0	N.D	N.D
SH.21	1	91,88	61,50	1,49	94,89	67	1.42
	2	83,95	64,10	1,31	71,24	62	1.15
	3	87,35	66,67	1,31	74,11	59	1.27
SH.22	1	282,20	23,07	12,26	317,50	22	14.43
	2	273,98	20,51	13,35	315,04	21	15.00
	3	269,35	23,68	11,37	269,70	26	10.37
SH.23	1	135,77	79,49	1,71	131,81	85	1.55
	2	127,01	74,35	1,71	151,88	64	2.37
	3	131,70	74,36	1,77	127,01	74	1.72
SH.24	1	113,04	76,90	1,46	123,19	72	1.71
	2	97,99	74,36	1,32	91,15	59	1.54
	3	114,99	72,97	1,57	90,27	46	1.96
SH.25	1	136,00	47,36	2,87	173,91	41	4.24
	2	138,75	46,15	3,00	129,21	38	2.94
	3	134,69	60,53	2,23	129,90	44	2.95
SH.26	1	70,30	56,40	1,25	99,11	62	1.60
	2	87,54	58,97	1,48	92,19	59	1.56
	3	59,87	59,46	1,01	61,33	62	0.99
SH.27	1	141,95	53,84	2,64	162,56	51	3.18
	2	141,55	53,85	2,63	145,85	49	2.97
	3	156,58	54,05	2,90	138,89	49	2.83
SH.28	1	251,83	38,46	6,54	270,48	41	6.60
	2	223,14	51,28	4,35	242,97	38	6.39
	3	244,94	45,94	5,33	207,09	44	4.71
SH.29	1	235,06	33,30	7,05	260,10	36	7.23
	2	222,43	38,46	5,78	231,94	36	6.44
	3	229,03	35,14	6,52	169,72	36	4.71
SH.30	1	383,52	25,64	14,95	383,52	23	16.67
	2	405,34	25,64	15,80	377,28	21	17.97
	3	397,81	27,02	14,72	390,60	27	14.47

N.D – Não determinado

H₅₀ - dose efetiva que causa 50% de hemólise.

ID – Índice de Desnaturação.

H₅₀/ID – razão utilizada para classificação do potencial de irritação.

Os valores obtidos no Ensaio RBC para os tensoativos e para os produtos analisados e a classificação do potencial de irritação são apresentados de forma sumarizada, nas **Tabelas 7 e 8**. Os valores das concentrações que causam 50% de hemólise não foram determinados para 7 produtos, isto é, para os condicionadores CO13, CO14, CO15, CO16, CO 17, CO18 e CO19, pelo fato destes interferirem no processo espectrofotométrico de medida da hemoglobina na faixa de 540nm. Isto decorre, em virtude desses produtos serem opacos. Não obstante, podemos considerar que, seguramente, a **H₅₀** dessas substâncias-teste atingem valores acima de 10,0mg/mL.

Tabela 7. Classificação do potencial de irritabilidade de tensoativos pelo ensaio **RBC *in vitro*** e sua comparação com a classificação pelo Teste de **Draize *in vivo***.

Tensoativos	H ₅₀ ug/mL	ID (%)	H ₅₀ /ID	Classificação	
				In vitro	In vivo
T.1	64,42	2,56	25,17	IL	IL
T.2	65,83	15,38	4,40	IM	IL
T.3	23,87	100,00	0,24	IS	IS
T.4	28,20	100,00	0,28	IS	IS

T.1 – Cocoamido propil betaina (Anfotérico); T.2 – Lauril éter sulfato de sódio (Aniônico); T.3 – Dodecil sulfato de sódio (Aniônico); T.4 – Cloreto de benzalcônio (Catiônico).

IL – Irritante Leve; **IM** – Irritante Moderado; **IS** – Irritante Severo;

H₅₀ - dose efetiva que causa 50% de hemólise.

ID – Índice de Desnaturação.

H₅₀/ID – razão utilizada para classificação do potencial de irritação.

Tabela 8. Classificação do potencial de irritabilidade de produtos cosméticos pelo ensaio **RBC *in vitro*** e sua comparação com a classificação pelo Teste de **Draize *in vivo***.

Produtos	H ₅₀ ug/mL	ID (%)	H ₅₀ /ID	Classificação	
				In vitro	In vivo
SH1	1.785,17	2,56	697,34	NI	NI
SH2	1.125,56	12,82	87,8	IL	IL
CO13	>10.000,0	N.D	N.D	NI	NI
CO14	>10.000,0	N.D	N.D	NI	NI
CO15	>10.000,0	N.D	N.D	NI	NI
CO16	>10.000,0	N.D	N.D	NI	NI
CO17	>10.000,0	N.D	N.D	NI	NI
CO18	>10.000,0	N.D	N.D	NI	IL
CO19	>10.000,0	N.D	N.D	NI	NI
SH21	87,73	64,09	1,37	IM	IM
SH22	275,18	22,42	12,33	IL	IM
SH23	131,49	76,07	1,73	IM	IM
SH24	108,67	74,74	1,45	IM	IS
SH25	136,48	51,35	2,70	IM	IS
SH26	72,57	58,28	1,25	IM	IS
SH27	146,69	53,91	2,72	IM	IM
SH28	239,97	45,23	5,41	IM	IM
SH29	228,84	35,63	6,45	IM	IS
SH30	395,56	26,1	15,16	IL	IL

ND – Não determinado; H₅₀, ID, NI, IL, IM e IS, como indicado nas Tabelas 3

H₅₀ - dose efetiva que causa 50% de hemólise.

ID – Índice de Desnaturação.

H₅₀/ID – razão utilizada para classificação do potencial de irritação.

Correlação entre as médias das H₅₀ (ug/mL) e das razões H₅₀/ID, obtidas no Ensaio RBC e os potenciais de irritabilidade obtidos *in vivo*

Dentre as **23** substâncias-teste analisadas, **7** (SH1, CO13, CO14, CO15, CO16, CO17 e CO19) foram classificadas como **NI** e **16** (SH2, SH21, SH22, SH23, SH24, SH25, SH26, SH27, SH28, SH29, SH30, CO18, T.1, T.2, T.3 e T.4) como **Irritantes**. As **NI** mostraram valores das H₅₀ acima de 1.785 ug/mL e valores das razões H₅₀/ID, quando foi possível a sua determinação, é expresso pelo valor 697,34. Pelo contrário, as classificadas como **Irritantes**, os valores das H₅₀ e das razões H₅₀/ID, estão respectivamente compreendidos entre 72,0 - 1.126 ug/mL e 1,25 – 87,8. Como única exceção, o produto **CO18** que, embora evidenciasse uma H₅₀ acima de 10.000,0 ug/mL bem como nenhum poder tóxico

no ensaio *in vitro*, apresentou um leve grau de irritabilidade no ensaio *in vivo* sendo, portanto, considerado um falso negativo. Para os 4 tensoativos esses valores se encontram entre 23 – 65 ug/mL e a razão H₅₀/ID (0,24 – 25,17) como podem ser vistos na **Tabela 7** (pág. 42).

Análise dos coeficientes de correlação entre os valores *in vitro* das H₅₀ e do Índice de Irritação (H₅₀/ID) com os resultados dos Ensaio *in vivo*

Os coeficientes de correlação empregados, de Pearson e Spearman, que correlacionam os valores das H₅₀, H₅₀/ID com os os escores do ensaio *in vivo* são mostrados na **Tabela 9** (pág. 46). A correlação gráfica usando dados convertidos em log H₅₀ e log H₅₀/ID são apresentados nos **Figuras 19 e 20**.

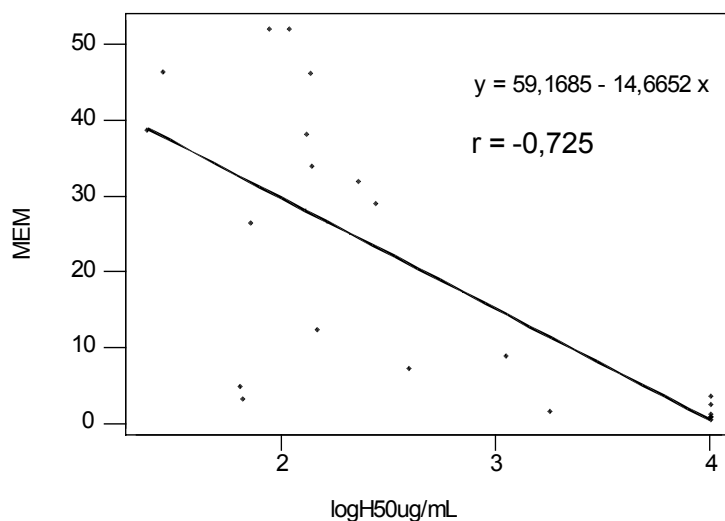


Fig. 19 Análises de regressão e correlação de Pearson entre as médias dos escores máximos (MEM) e os log das concentrações das H₅₀ das substâncias-teste.

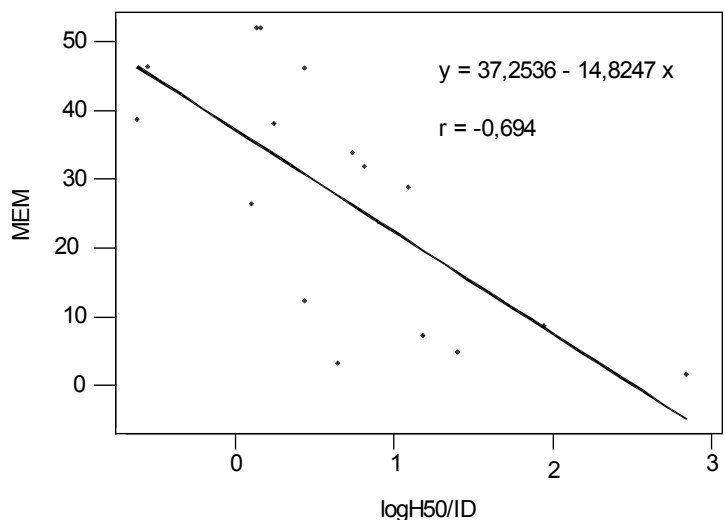


Fig. 20 Análises de regressão e correlação de Pearson entre as médias dos escores máximos (MEM) e a razão $\log H_{50}/ID$ das substâncias-teste

Os coeficientes de correlação de Pearson e Spearman, entre os valores das H_{50} e das razões H_{50}/ID , do ensaio *in vitro* e os escores das três estruturas oculares, do ensaio *in vivo*, se afiguram de bom calibre, principalmente quando os valores obtidos *in vivo* são representados pelas médias dos escores máximos, como evidencia a **Tabela 9** (pág. 46).

Tabela 9. Coeficientes de correlação (Pearson e Spearman) relacionando os valores das H_{50} , e H_{50}/ID dos ensaios *in vitro* e os escores das estruturas oculares dos ensaios *in vivo*.

		N=23		N=16	
		Correlação de Pearson	Correlação de Spearman	Correlação de Pearson	Correlação de Spearman
		log H_{50}	H_{50}	log H_{50}/ID	H_{50}/ID
Média dos escores máximos	Total (MEM)	-0,725 ¹	-0,750	-0,694 ⁹	-0,716
	Córnea	-0,679 ²	-0,657	-0,666 ¹⁰	-0,730
	Iris	-0,626 ³	-0,591	-0,638 ¹¹	-0,616
	Conjuntiva	-0,814 ⁴	-0,758	-0,735 ¹²	-0,681
Escore 24 horas	Total	-0,705 ⁵	-0,705	-0,694 ¹³	-0,716
	Córnea	-0,607 ⁶	-0,571	-0,474 ¹⁴	-0,518
	Iris	-0,491 ⁷	-0,473	-0,382 ¹⁵	-0,350
	Conjuntiva	-0,797 ⁸	-0,736	-0,698 ¹⁶	-0,622

Valores de p (1; 2; 4; 5 e 8 p = 0,000; 3 p = 0,001; 6 p = 0,002 e 7 p = 0,02) (9; 13 e 16 p = 0,003; 10 p = 0,005; 11 p = 0,008; 12 p = 0,001; 14 p = 0,06 e 15 p = 0,1)

Preditibilidade do Ensaio

A preditibilidade do Ensaio RBC (hemólise e desnaturação) em relação ao Teste de Draize-Irritação Ocular, foi avaliada utilizando a regressão linear que compara os valores dos log H_{50} e H_{50}/ID com as MEM para 23 e 16 substâncias-teste para as quais os valores da H_{50} e H_{50}/ID puderam ser estimados, como mostram, respectivamente, as **Figuras 19 e 20**. No ensaio *in vivo* o valor “cut-off” foi 3.2, valor discriminatório entre a substância-teste **não irritante** e a **irritante leve**. As substâncias-teste foram consideradas positivas para irritação ocular quando o valor da MEM fosse igual ou maior que o valor “cut-off”.

Os resultados obtidos para as 23 substâncias-teste analisadas estão descritos na **Tabela 10**. O valor do “cut-off” para a H_{50} foi 1126 μ g/mL, enquanto que para o Índice de Irritação foi 90. Dentre as 23 substâncias-teste, somente uma foi falso negativa, trata-se da CO18 que pertence à categoria dos condicionadores.

Tabela 10. Preditibilidade do Ensaio RBC

		In Vitro			
		Valores do H ₅₀		Valores H ₅₀ /ID	
In vivo		Irritante ≤ 1126µg/mL	Não Irritante > 1126µg/mL	Irritante ≤ 90	Não Irritante > 90
Irritante MEM ≥ 3.2	SH2, SH21, SH22 SH23, SH24, SH25 SH26, SH27, SH28 SH29, SH30, T.1, T.2, T.3, T.4		Falso negativo CO18	SH2, SH21, SH22 SH23, SH24, SH25 SH26, SH27, SH28 SH29, SH30, T.1, T.2, T.3, T.4	
Não Irritante MEM < 3.2			SH1, CO13, CO14, CO15, CO16, CO17, CO19		SH1

Reprodutibilidade do Ensaio RBC

A reprodutibilidade da H₅₀ das substâncias-teste foi avaliada através da comparação dos valores médios dos Coeficientes de Variações (CV) obtidos por cada analista. Os valores dos CV foram 6,19% e 9,86% para os tensoativos e produtos, respectivamente, valores que indicam uma ótima reprodutibilidade. A reprodutibilidade dos valores das H₅₀ dos tensoativos e dos produtos estão representados sob a forma de distribuição no intervalo interquartil (Box-plot), ilustrados nas **Figuras 21 e 22**.

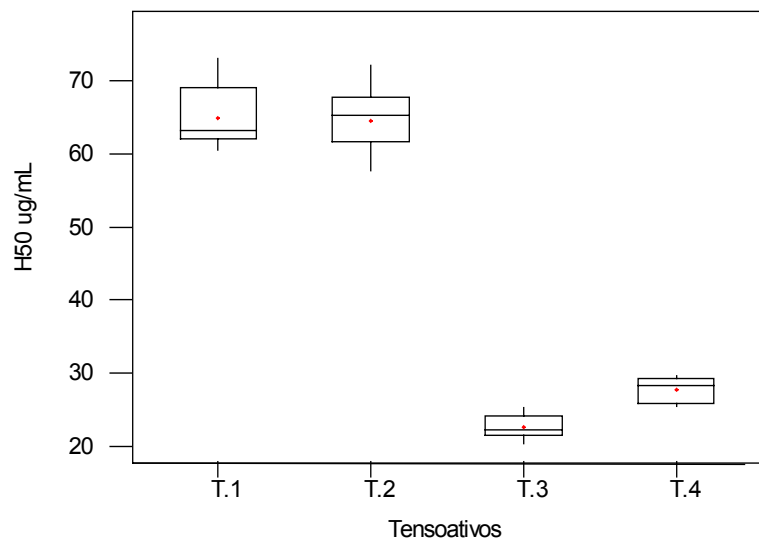


Fig. 21 Distribuição no intervalo interquartil dos tensoativos analisados.

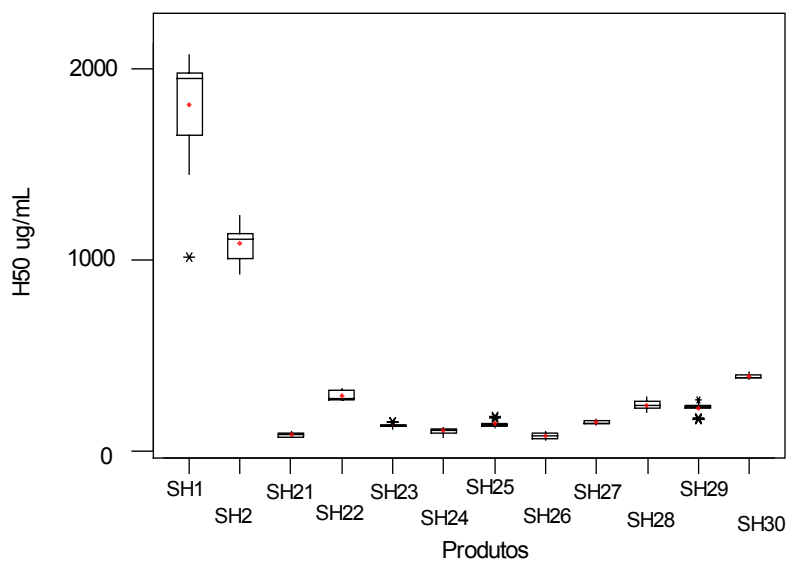


Fig. 22 Distribuição no intervalo interquartil dos produtos estudados.

A **Figura 23** mostra a freqüência de observações de concordância e discordância entre os ensaios *in vivo* e *in vitro*, baseados nas médias dos escores máximos e as razões H₅₀/ID das substâncias-teste analisadas.

		In Vivo	
		I	NI
In vitro	I	15 a	0 b
	NI	1 c	7 d

Fig. 23 Freqüência de observações de concordância e discordância entre os ensaios “*in vitro* (H₅₀/ID) e *in vivo* (MEM). Substância-teste Irritante tem MEM ≥ 3.2 e H₅₀/ID < 100. **Sensibilidade** = a/(a+c)x100%; **Especificidade** = d/(b+d)x100%; Valor preditivo = a/(a+b)x100%; Precisão = (a+d)/(a+b+c+d)x100%. I (Irritante), NI (Não Irritante).

Utilizando este método podemos dizer que obtivemos: (i). 94% de sensibilidade, isto é, capacidade de identificar corretamente os agentes irritantes; (ii). 100% de especificidade, isto é, capacidade de identificar corretamente os agentes não irritantes; (iii). 100% de valor preditivo, isto é, percentagem de substâncias-teste verdadeiramente irritante e (iv). 96% de precisão, relativo ao percentual de acertos, isto é, total de irritantes e não irritantes verdadeiros em relação ao total de substâncias-teste analisadas.

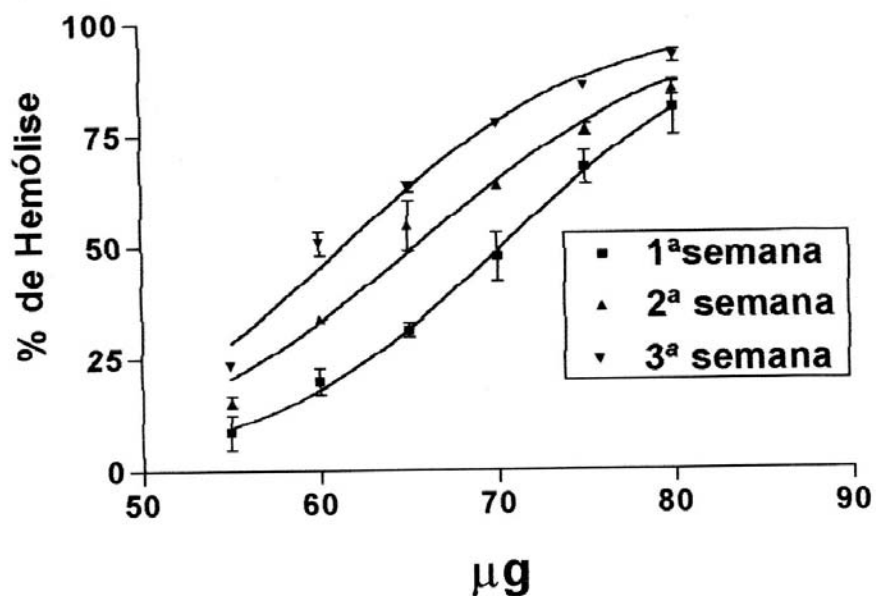
Correlação entre os valores das H₅₀ nas diferentes semanas de armazenamento e manutenção do sangue.

Foram realizados ensaios em eritrócitos com diferentes tempos de manutenção, isto é, com 1, 2 e 3 semanas após coleta. Para verificarmos se este

procedimento não interfere no poder de toxicidade dos tensoativos isto é, se os eritrócitos tornam-se mais frágeis com o aumento do período de armazenamento, utilizamos o Teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Este teste nos permite testar a hipótese de que duas populações têm a mesma distribuição entre amostras independentes. Com alfa de 5% a análise estatística nos demonstrou que não houve diferença significativa entre os valores das H_{50} nas diferentes semanas com todas as substâncias-teste empregadas no presente trabalho.

Embora o número reduzido de estimativas induzisse ao emprego de teste não-paramétrico, decidimo-nos pela aplicação também de método paramétrico quantitativo que correlaciona a concentração das substâncias-teste com o respectivo efeito, obtendo-se as características curvas sigmóides proporcionadas pelo programa computacional Graph-Pad-Prism. Além de confirmarmos os resultados obtidos com o teste não-paramétrico, com valores de H_{50} praticamente superponíveis, os deslocamentos das curvas para a esquerda, embora não significativos, que esta metodologia possibilitou evidenciar, revelou que tais deslocamentos são paralelos não só em relação, obviamente, aos princípios ativos isolados, isto é, os tensoativos, como também com os produtos cosméticos estudados, sugerindo que os demais componentes da fórmula farmacêutica desses produtos, não parecem interferir na atividade farmacológica do tensoativo. A guisa de exemplos, são ilustrados nas **Figs. 24 e 25**, respectivamente, curvas resultantes da ação de um único princípio ativo, isto é, o tensoativo e curvas representativas da relação concentração-efeito de produtos cosméticos que, além do tensoativo, apresentam outros componentes na sua fórmula farmacêutica.

Lauril éter sulfato de sódio



DODECIL SULFATO DE SÓDIO

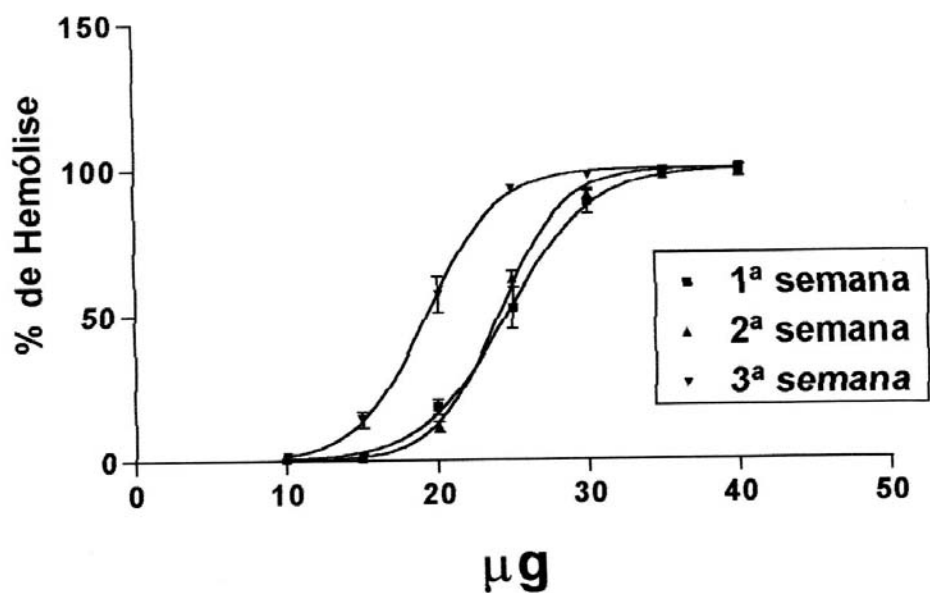


Fig. 24 Curvas Concentração-Resposta de hemólise induzida por tensoativos em hemácias de carneiro. Notar o deslocamento, embora não significativo dessas curvas para a esquerda a partir da 2ª ou 3ª semanas. Os valores das H_{50} estão transcritos na **Tabela 5** (pág. 39).

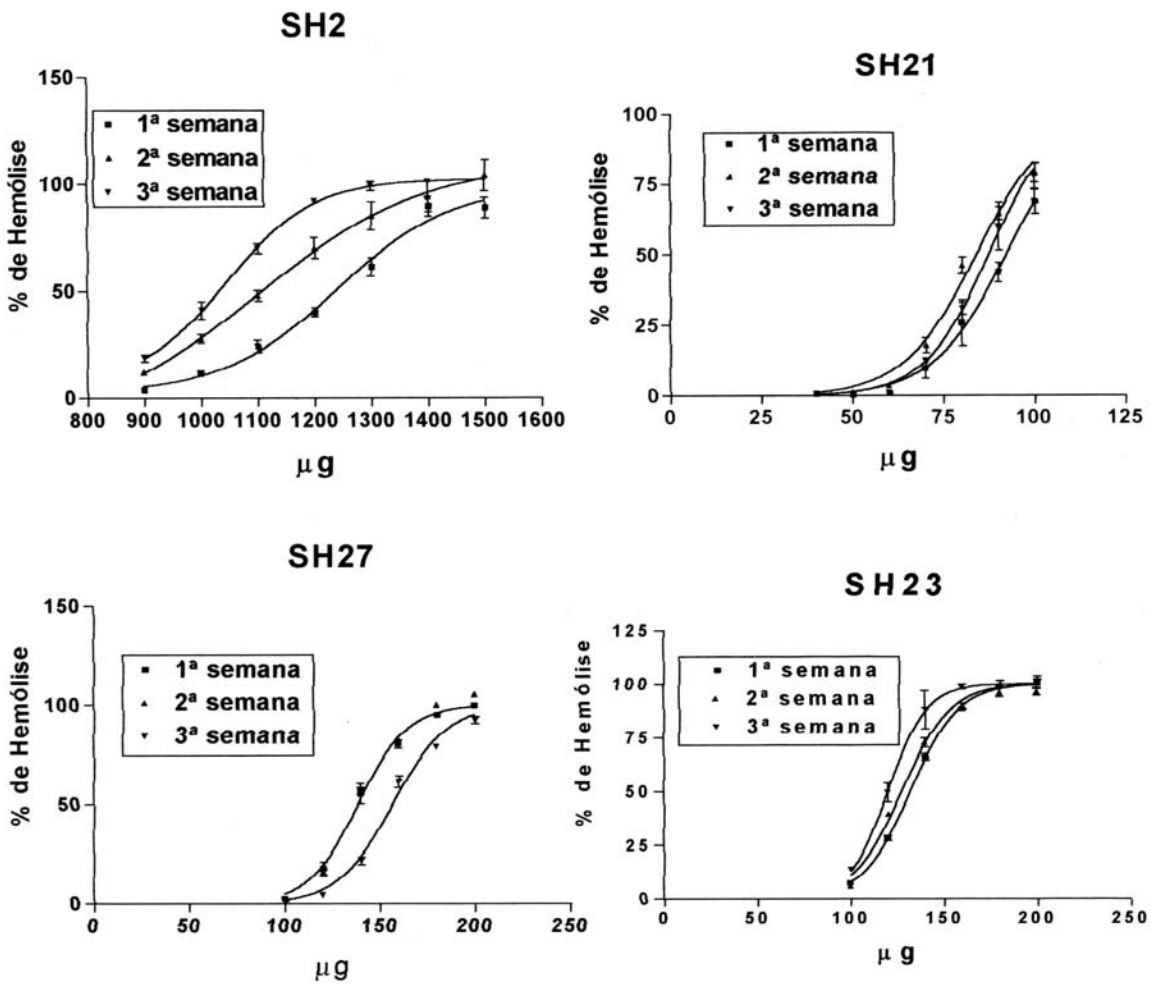


Fig. 25 Curvas Concentração-Resposta como descrito na Fig 24 , porém em relação a **produtos cosméticos codificados**. Os valores das H_{50} , estão transcritos na **Tabela 6** (pág. 40 e 41).

5. DISCUSSÃO

O objetivo primordial do presente estudo, foi o de comparar os nossos resultados, obtidos nos ensaios *in vivo* envolvendo o globo ocular de coelhos, com os observados *in vitro*, empregando-se eritrócitos de ovinos, com a finalidade de não só de validar este último, como um **Teste Preliminar** capaz de selecionar os produtos mais irritantes excluindo-os da avaliação pelo **Teste de Draize-Irritação Ocular**, mas também de considerar o Teste *in vitro* como possível ou eventual substituto do Teste *in vivo*.

Para cumprir tais objetivos, inicialmente padronizamos o Teste *in vitro*, uma vez que ambos os fenômenos analisados no mesmo, isto é, a **hemólise** e a **desnaturação protéica**, vem sendo avaliados sob diferentes condições experimentais, por vários grupos de pesquisadores (PERUTZ, 1974; GLOXHUBER, 1974; KONDO, 1976; WOLFGANG, 1990; MacDONALD, 1994; HAYASHI, et al., 1995; HATOA et al., 1999; OKAMOTO et al., 1999). Dentre os diferentes procedimentos descritos, selecionamos o preconizado por WOLFGANG et al., (1987), que avalia a citotoxicidade de agentes tensoativos, bem como de produtos que os contenham, através da indução de hemólise em combinação com os danos causados às proteínas celulares liberadas no decorrer do processo toxicológico, cotejando os nossos resultados obtidos pela aplicação deste teste *in vitro* com os verificados *in vivo*, em coelhos, para estabelecer o **potencial de irritabilidade oftálmica**.

No presente trabalho, aplicamos os princípios estabelecidos por WOLFGANG et al., (1987), porém com algumas modificações, dentre as quais destacamos: (i) o emprego do sangue desfibrinado de carneiro, em substituição ao de bovino citratado e (ii) a elaboração de mais de uma curva dose-resposta no sentido de selecionar a seqüência de concentrações mais adequadas para cada substância-teste. Além disso, em termos de reprodutibilidade do ensaio, foi incluído um segundo analista para a avaliação adequada dos dois fenômenos em estudo, isto é, o Teste de hemólise e da Desnaturação de proteínas.

O Teste de **hemólise**, que é representado pelos valores das H_{50} , embora se afigure relativamente simples na sua execução e altamente reprodutível na sua comprovação, apresenta, segundo OKAMOTO et al., (1999), algumas limitações em termos de avaliação de determinados ingredientes cosméticos, que envolvem: (i) a presença de substâncias coloridas e/ou turvas, fatores que interferem com a medida da absorbância da hemoglobina; (ii) o emprego de diferentes solventes que podem causar variações nas potências tóxicas das substâncias-teste; (iii) a baixa preditibilidade do teste na presença de álcoois e (iv) a presença de meio ácido que pode interferir na medida da hemoglobina liberada devido à sua desnaturação. Dentre tais aspectos, nas nossas condições experimentais, somente ocorreu a interferência das soluções turvas dos condicionadores. Este fato, entretanto, não impossibilitou a determinação das H_{50} desses produtos, cujos valores atingiram concentrações elevadas, superiores a 10mg/mL.

Além disso, merece ser assinalado que eritrócitos oriundos de diferentes espécies de mamíferos, tais como, bovinos, ovinos, coelhos, ratos, cobaias e humanos, vem sendo utilizados no Ensaio RBC (GOLDBERG e McCULLEY, 1987; WOLFGANG et al., 1987; HAYASHI et al.; 1995), aspecto este que poderia interferir, em termos de comparação de resultados, entre os diferentes grupos. Isto, entretanto, não ocorreu em relação aos nossos experimentos pois não verificamos diferenças substanciais entre as H_{50} obtidas utilizando sangue de ovino com os dados da literatura referentes a esses valores obtidos com sangue de bovino (WOLFGANG et al.; 1987 e 1990), o mais representativo do Teste RBC.

A esse propósito, deve ser mencionado que o mecanismo pelo qual os tensoativos ou produtos cosméticos que os contenham, agem sobre as estruturas do olho, desempenha um papel significativo no tipo de ensaio *in vitro*. Com efeito, segundo HARBELL et al., (1997) os tensoativos, por causarem danos à membrana celular *in vitro*, provam indiretamente a sua capacidade para danificar as células da conjuntiva e córnea, aspecto este de relevante significado, uma vez que o fenômeno de hiperemia é um dos primeiros sinais de irritabilidade, o qual poderá também estar presente nas substâncias-teste destituídas de poder de

irritabilidade, embora, neste caso, com regressão precoce no período de 24 horas.

Cabe assinalar que, confirmando resultados semelhantes aos descritos por WOLFGANG et al.,(1987, 1990), verificamos que o curto período de 10 minutos, de incubação das hemácias com a substância-teste, terminado por uma rápida centrifugação, nos mostrou uma boa diferenciação do poder hemolítico das substâncias-teste.

Por outro lado, embora seja fato notório que a hemoglobina liberada e medida pela H_{50} , se constitua num excelente parâmetro para avaliar a integridade da membrana celular, devemos ter sempre em mente que as proteínas celulares liberadas, podem ser afetadas por agentes tóxicos, em particular os tensoativos os quais podem inativá-las, cujo fenômeno é medido pelo índice de desnaturação, que analisaremos a seguir.

O segundo parâmetro, a **desnaturação**, avaliada através do Índice de Desnaturação (**ID**), introduzido por WOLFGANG et al.; (1987), que o definiu como valor igual a 100% para o Dodecil sulfato de sódio (**SDS**) na concentração de 3,47mmol/l, revelou-se nas nossas condições experimentais, também um teste simples e reprodutível. A desnaturação da oxiemoglobina foi avaliada por espectrofotometria com absorvância de 540nm e 575nm e sendo o ID expresso como uma razão, definida pela equação $ID(\%) = (R_1 - R_i) / (R_1 - R_2) \times 100$, onde (R_1 , R_2 e R_i são as razões entre as leituras da absorvância a 575nm e 540nm das hemoglobinas liberadas dos eritrócitos quando em contato com: (i) água destilada; (ii). Dodecil sulfato de sódio a 1mg/mL; (iii). substância-teste a 1mg/mL ou 10mg/mL, respectivamente. Entretanto, estes autores não definem qual deveria ser o menor valor da razão, $abs.575nm/abs5.40nm$, para afirmar que houve alteração na estrutura da oxiemoglobina. Segundo OKAMOTO et al., (1999) este valor deveria ser menor que 0,9. Neste estudo, entretanto, definimos que o valor desta razão deveria ser menor que 1,05 valor este, relacionado com o hemolisado resultante do contato com água destilada, usada como controle positivo.

Na primeira parte do presente trabalho, testamos 4 tensoativos pertencentes às classes anfótera, aniônica e catiônica. O potencial hemolítico,

determinado através do valor da H_{50} , revelou que os dois tensoativos (T.1 e T.2) com baixo poder de irritação ocular, apresentaram este valor na faixa de 60 μ g/mL a 70 μ g/mL, enquanto que os que demonstraram alto poder de irritabilidade *in vivo* apresentaram, obviamente valores contidos numa faixa menor, de 20 μ g/mL a 30 μ g/mL, resultados estes que corroboram com os WOLFGANG et al.; 1987 e 1990, HAYASHI et al.; 1994, GETTINGS et al.; 1996 e OKAMOTO et al.; 1999., fato que nos leva a concluir que os tensoativos com poder hemolítico (10 - 100 μ g/mL), invariavelmente, produzem algum grau de irritação ocular podendo ou não atingir todas as estruturas do olho, isto é, córnea, íris e conjuntiva,

Quando se utilizam eritrócitos de bovinos, WOLFGANG et al.; 1987 e 1990, mostraram valores de H_{50} próximos aos por nós obtidos para os tensoativos **T.3** e **T.4**, usando sangue de carneiro. A marcada diferença entre os nossos resultados e os apresentados por esses autores em relação às H_{50} dos tensoativos **T.1** e **T.2**, evidenciada na **Tabela 11**, deve-se, seguramente, às diferentes concentrações desses princípios ativos nas soluções mães usadas nos dois Laboratórios. De fato, ao contrário das soluções contendo 100% dos princípios ativos, no presente caso, os tensoativos, como ocorreu com **T.3** e **T.4**, os tensoativos **T.1** e **T.2**, nos foram fornecidos já preparados nas concentrações de, respectivamente, 30 e 27% de princípios ativos.

Tabela 11. Valores das H_{50} de 4 tensoativos comparativamente aos encontrados por WOLFGANG et al.; (1987 e 1990.)

Tensoativos	WOLFGANG et al			Nosso laboratório		
	H_{50} (μ g/mL)	ID(%)	H_{50}/ID	H_{50} (μ g/mL)	ID(%)	H_{50}/ID
T1	34	12	2,83	64	2,56	25
T2	21	60	0,35	66	15	4,4
T3	28	100	0,28	24	100	0,24
T4	32	100	0,32	28	100	0,28

T.1 a T.4 como **T.1 a T.4** :soluções com **100%** **T.1(30%), T.2(27%) e T.3 e T.4 (100%)**
no **Quadro 4** de **tensoativos** de **tensoativos**

T.1 – Cocoamido propil betaína, T.2 – Lauril éter sulfato de sódio, T.3 – Lauril sulfato de sódio
T.4 – Cloreto de benzalcônio.

Por outro lado, segundo, OKAMOTO et al.; 1999, os valores das H_{50} obtidos com sangue de carneiro citratado foram de $19\mu\text{g/mL}$ para o tensoativo **T.3** e ii. $7\mu\text{g/mL}$ para o tensoativo **T.4**. As diferenças desses valores quando comparados com os observados em nosso laboratório poderiam ser explicadas pelas diferentes metodologias utilizadas por cada laboratório. Assim, a duração de 30 minutos e a temperatura de 37°C empregados por OKAMOTO et al.; (1999) no processo de incubação dos eritrócitos com os tensoativos, ambos valores superiores a 10 minutos e 25°C usados em nossos experimentos, levam-nos a concluir serem tais fatores responsáveis pelas assinaladas discrepâncias.

Em relação à desnaturação protéica, expressada como Índice de Desnaturação (ID), fator que contribui para a obtenção do parâmetro fundamental para prever o **potencial de irritação**, isto é a razão entre H_{50}/ID , os resultados obtidos em nosso laboratório mostram que os tensoativos com baixo potencial de desnaturação (2 a 15%) e H_{50}/ID maior que 1, causam leve irritação ocular, afetando somente a conjuntiva, enquanto os com alto poder de desnaturação ($>15\%$) e H_{50}/ID menor que 1, determinam severa irritabilidade ocular com comprometimento da córnea, íris e conjuntiva, como ilustra de forma global a **Fig. 26**.

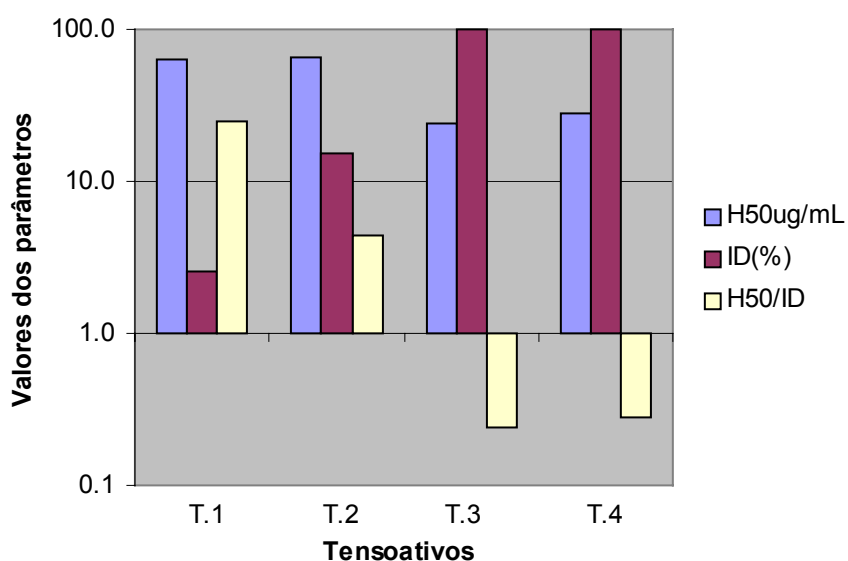


Fig. 26 Comportamento dos tensoativos em relação aos parâmetros *in vitro* estimados: H_{50} , ID e H_{50}/ID , como indicados na **Tabela 7** (pág. 42).

Confirmando dados da literatura, referentes aos coeficientes de correlação de Pearson e Spearman descritos na **Tabela 12**, nossos resultados, ilustrados na **Tabela 13**, se afiguram análogos, mesmo frente ao valor do “cut-off” utilizado em nosso estudo (**MEM** \leq 3,2) ser diferente dos apresentados por WOLFGANG et al.; 1987 (**MIOI** $<$ 5), OKAMOTO et al.; 1999 e HATAO et al.; 1999 (**MEM** $<$ 15). A avaliação entre os coeficientes de Pearson e Spearman e os escores máximos e de 24 horas, obtidos em nossos experimentos, correlacionando as diferentes estruturas do olho em relação aos valores do logH₅₀ e ID, descritos na Tabela 13 e representados graficamente nas **Figs. 27 a 35**, revelam que (i.) há uma boa correlação entre as médias dos escores máximos em relação a cada estrutura ocular; (ii.) quando a correlação é baseada nos escores de 24 horas a conjuntiva é a estrutura que demonstra maior correlação, isto devendo-se ao fato de que as lesões vasculares tem uma grande incidência nas primeiras 24 horas e (iii.) quanto ao coeficiente de Spearman não houve diferença entre os escores máximo e de 24 horas em relação ao parâmetro ID. Incluímos como dado novo que tais correlações ocorrem também em relação aos valores das razões H₅₀/ID, valores estes, utilizados em nosso estudo para classificar as substâncias-teste quanto ao seu poder de irritabilidade.

Tabela 12. Valores dos coeficientes de correlações de Pearson e Spearman, relatados em literatura entre os resultados *in vitro* e *in vivo* para tensoativos.

In vivo	WOLFGANG(1987)		OKAMOTO(1999)		HATAO(1999)		HAYASHI(1994)		
	Spearman		Pearson	Spearman	Pearson	Spearman	Pearson		
	Log H ₅₀	ID(%)	H ₅₀ /ID	Log H ₅₀	H ₅₀	ID(%)	ID(%)	H ₅₀	ID
MEM _{total}	-0,571	0,811	-0,808	-0,651	-0,674	0,671	0,579	-0,635	0,744
MEM _{córnea}				-0,635	-0,653	0,663	0,541	-0,631	0,761
MEM _{conjuntiva}				-0,661	-0,752				
MEM _{íris}				-0,579	-0,636				

Tabela 13. Coeficientes de correlação entre os parâmetros *in vitro* e os escores do ensaio *in vivo* dos tensoativos.

		Correlação de Pearson			Correlação De Spearman		
		LogH ₅₀	ID(%)	logH ₅₀ /ID	H ₅₀	ID(%)	H ₅₀ /ID
MEM	Total(MEM)	-0,966	0,982	-0,960	-0,800	0,738	-0,600
	Córnea	-0,970	0,988	-0,969	-0,738	0,889	-0,738
	Íris	-0,981	0,946	-0,942	-0,949	0,889	-0,949
	Conjuntiva	-0,982	0,974	-0,947	-0,800	0,738	-0,600
Escore 24h	Total	-0,945	0,886	-0,882	-1,000	0,738	-0,800
	Córnea	-0,870	0,800	-0,808	-0,949	0,889	-0,949
	Íris	-0,845	0,900	-0,872	-0,738	0,889	-0,738
	Conjuntiva	-0,987	0,948	-0,623	-1,000	0,738	-0,800

Representações gráficas das correlações entre os três parâmetros estimados no ensaio *in vitro* e as estruturas do olho, córnea, íris e conjuntiva *in vivo*.

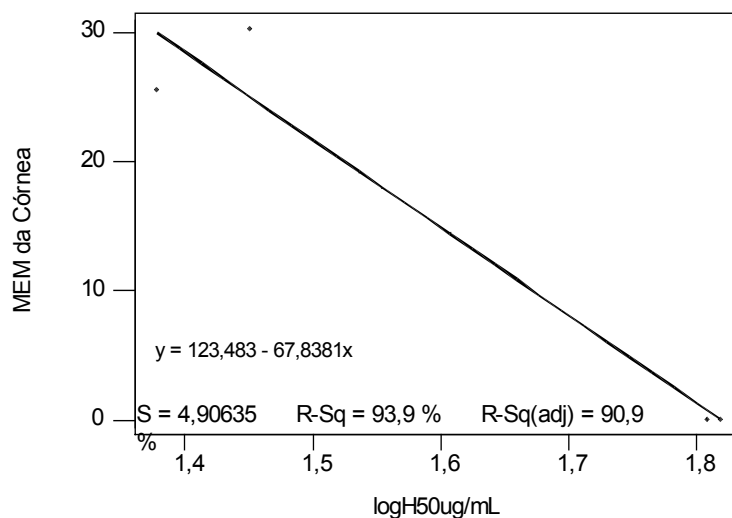


Fig. 27 Análises de regressão e correlação entre as médias dos escores máximos (MEM) da **córnea**, obtidas *in vivo*, e o logH₅₀ug/mL obtidas *in vitro*

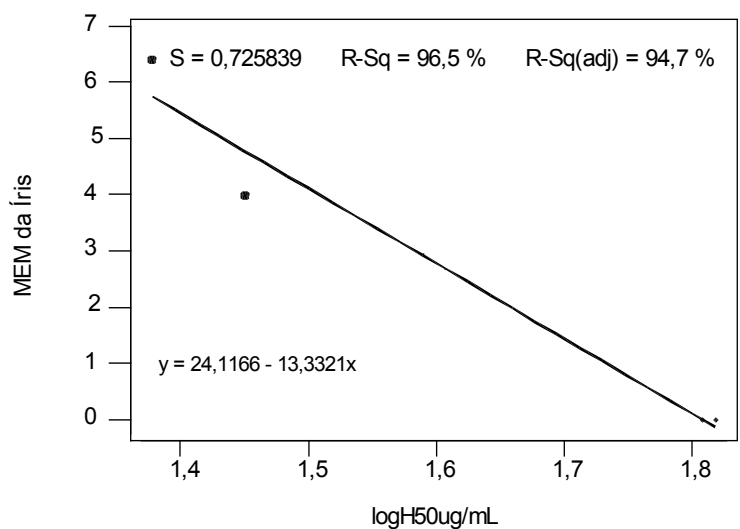


Fig. 28 Análises de regressão e correlação entre as médias dos escores máximos (MEM) da **íris**, obtidas *in vivo*, e o logH₅₀ug/mL obtidas *in vitro*.

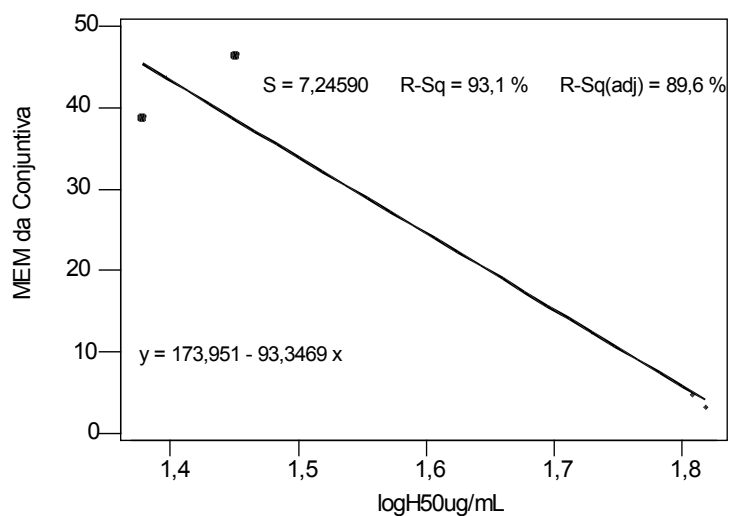


Fig. 29 Análises de regressão e correlação entre as médias dos escores máximos (MEM) da **conjuntiva**, obtidas *in vivo*, e o logH₅₀ug/mL obtidas *in vitro*.

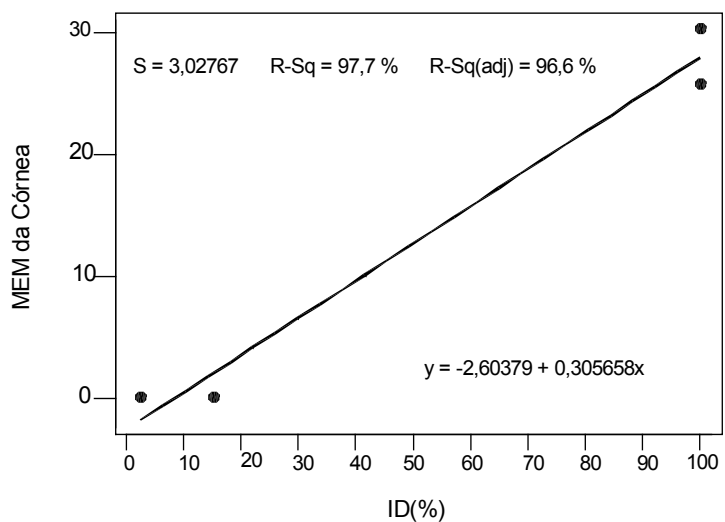


Fig. 30 Análises de regressão e correlação entre as médias dos escores máximos (MEM) da **córnea** obtido *in vivo* e os valores de ID, obtidos *in vitro*. .

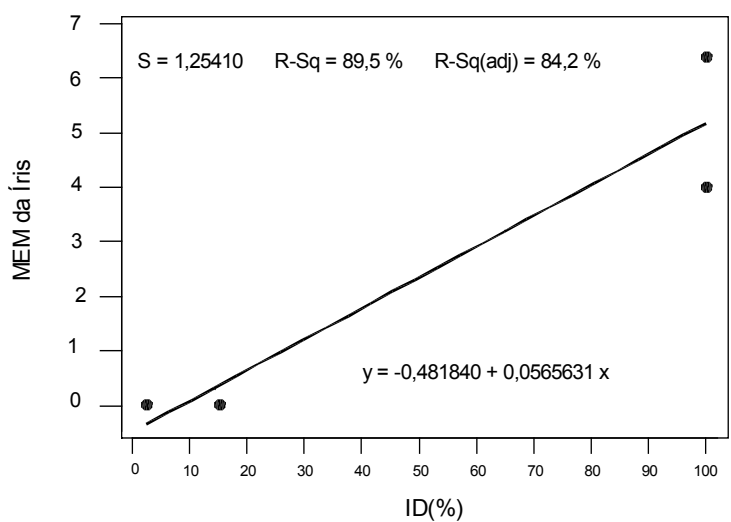


Fig. 31 Análises de regressão e correlação entre as médias dos escores máximos (MEM) da **íris** obtido *in vivo* e os valores de ID, obtidos *in vitro* .

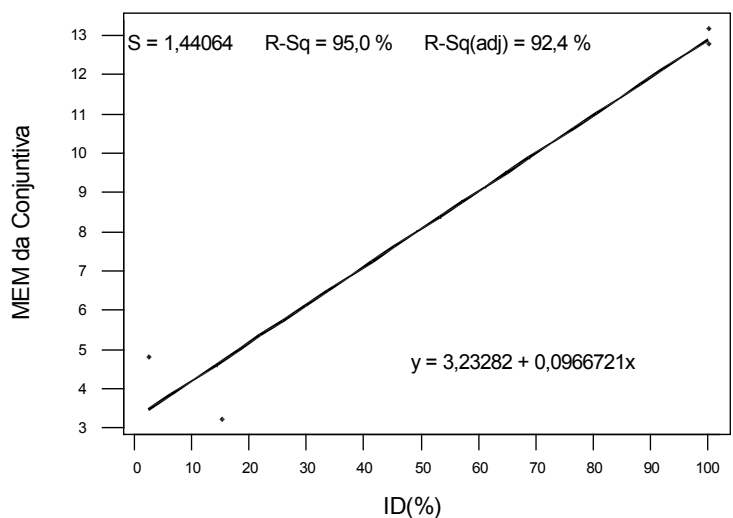


Fig. 32 Análises de regressão e correlação entre as médias dos escores máximos (MEM) da **conjuntiva** obtido *in vivo* e os valores de ID, obtidos *in vitro* .

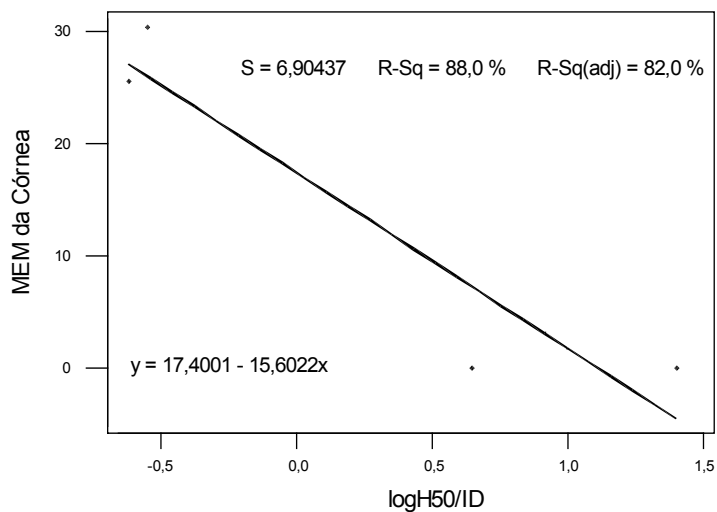


Fig. 33 Análises de regressão e correlação entre as médias dos escore máximos (MEM) da **córnea**, obtidas *in vivo* e os valores dos $\log H_{50}/ID$ obtidos *in vitro*.

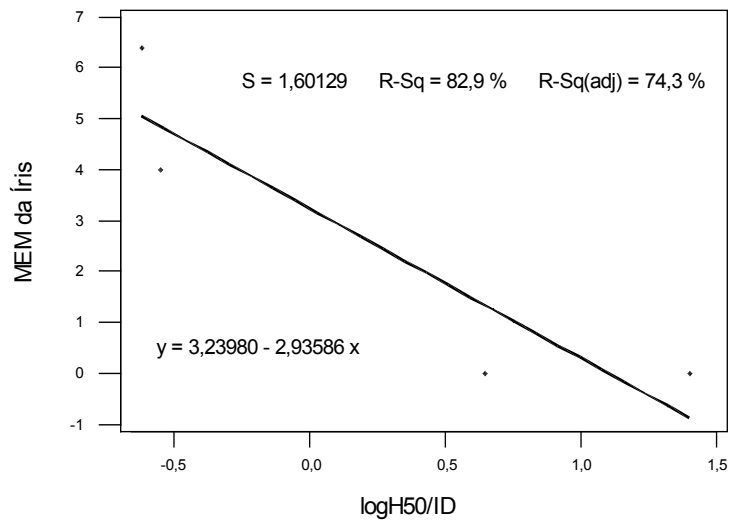


Fig. 34 Análises de regressão e correlação entre as médias dos escore máximos (MEM) da íris, obtidas *in vivo* e os valores dos logH₅₀/ ID obtidos *in vitro*.

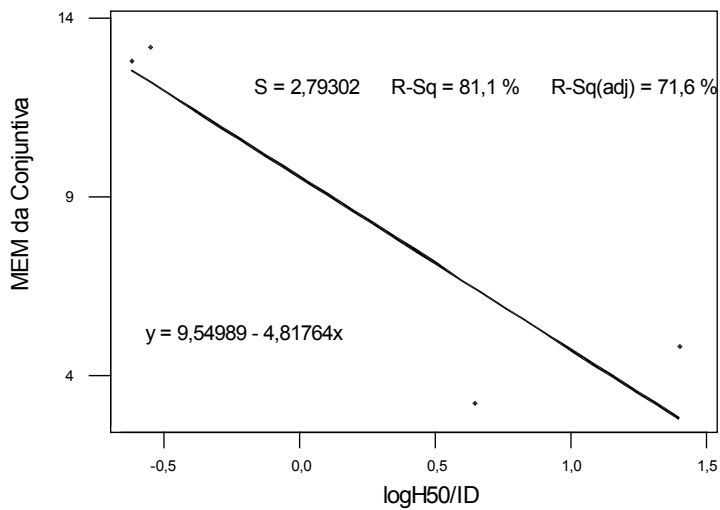


Fig. 35 Análises de regressão e correlação entre as médias dos escore máximos (MEM) da conjuntiva, obtidas *in vivo* e os valores dos logH₅₀/ ID obtidos *in vitro*.

Confirmando dados de WOLFGANG et.al.; 1987 e 1990, a análise dos valores das razões H_{50} / ID , referentes aos nossos resultados, mostram que as substâncias com baixo potencial de irritação ocular, encontram-se na faixa logarítmica de 10 –100, enquanto que a faixa logarítmica de 1 – 0,1 caracterizam as substâncias com alta irritabilidade oftálmica, como evidencia a **Fig. 26**. Embora, somente 4 tensoativos tenham sido analisados, a **Tabela 14** resume uma tentativa de classificação do potencial de irritação ocular.

Tabela 14. Classificação do potencial de irritação ocular (H_{50}/ID) de 4 tensoativos.

Irritação Ocular in vivo	MEM	In vitro (H_{50}/ID)
Irritante Leve (IL)	< 5	< 100 / > 10
Irritante Severo (IS)	> 30	< 1 / > 0,1

IL – T.1 e T.2

IS – T.3 e T.4

Na segunda parte do trabalho, analisamos 19 produtos cosméticos, 12 dos quais, xampus e 7 condicionadores. Para estes últimos, as concentrações capazes de determinar 50% de hemólise atingiram valores acima de 10mg/mL. Pelo contrário, os xampus mostraram valores sensivelmente menores, numa faixa de 70µg/mL a 1800µg/mL, valores estes compatíveis aos descritos por GETTINGS et al.,(1996), referentes a 18 formulações, cujas H_{50} variaram entre 11,6 e 182 ug/ml. Os produtos com baixo poder hemolítico (395 – 10.000µg/mL) determinaram leve ou nenhuma irritabilidade ocular e os com alto poder de hemólise(<280,0µg/mL), revelaram valores de potencial de irritação ocular variáveis de moderado a severo. Em relação à desnaturação protéica, observou-se que os produtos com baixa ou nenhuma capacidade de determinar irritabilidade ocular *in vivo* mostraram também baixo poder de desnaturação na faixa de 2,56 a 26,1%, ao passo que os produtos que apresentaram alto potencial de irritabilidade ocular seu índice de desnaturação atingiu valores acima de 35% com exceção do **SH22**, que teve um valor de 22,4%. GETTINGS et al.; 1994, descrevem esses valores incluindo-os em uma ampla em uma faixa, de 9,7 a 79%. Assim, analogamente aos tensoativos, a razão H_{50}/ID , obtida com os produtos cosméticos, foi também utilizada para predizer o potencial de irritação, revelando-

se bem discriminativa pois os produtos destituídos de poder de irritação mostram valores superiores a 100; ao passo que, os com baixo poder, os valores se inserem entre 10 – 100 e os com alto potencial de irritabilidade esta razão é menor que 10. A **Figura 36** retrata globalmente o comportamento dos produtos diante dos três parâmetros analisados *in vitro* e a **Tabela 15** resume a relação entre a MEM e a razão H_{50}/ID . WOLFGANG et al.; 1987 e GETTINGS et al.; 1996, relatam em seus estudos valores para a razão (H_{50}/ID), compreendidos nas faixas de 0,12 – 10,6 e 0,14 – 144,4 respectivamente, enquanto que, em nosso estudo esta faixa foi mais ampla (1,25 – 697,34), podendo-se concluir que as formulações dos produtos cosméticos nacionais mostram uma tendência de menor grau de toxicidade

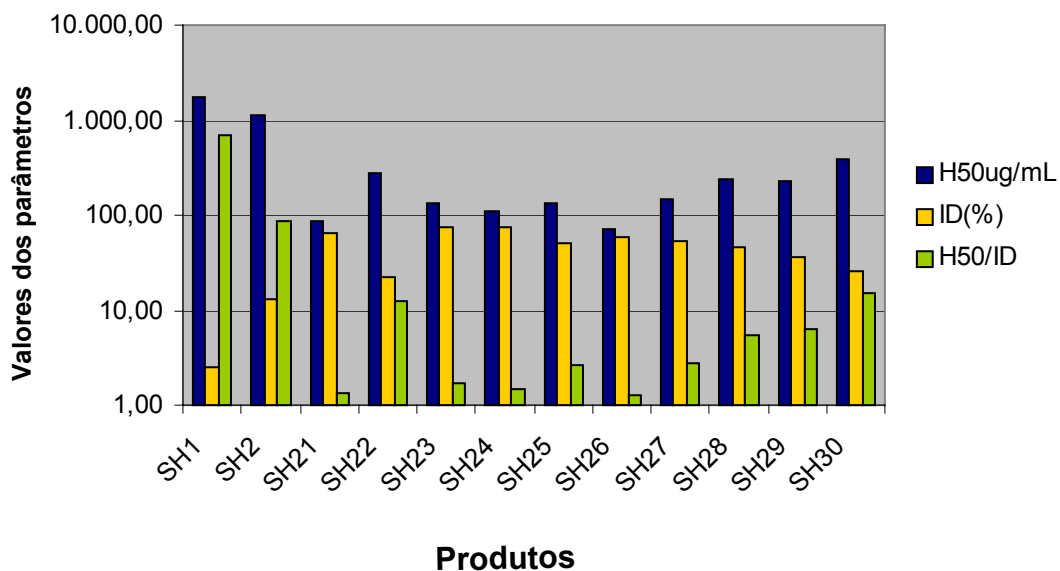


Fig. 36 Comportamento dos produtos analisados frente aos parâmetros *in vitro*, H_{50} , ID e H_{50}/ID .

Tabela 15. Classificação do potencial de irritação ocular dos 19 produtos cosméticos analisados.

Irritação in vivo	MEM	In vitro(H₅₀/ID)
Não Irritante	< 2,4	> 100
Irritante Leve	< 10	> 10
Irritante Moderado	>10	> 1
Irritante Severo	> 10	> 1

No que se refere às correlações entre as médias dos escores máximos (MEM) e as médias de 24 horas, com as diferentes estruturas do olho, quando relacionados aos parâmetros estimados no ensaio *in vitro*, descritos na **Tabela 16** e a análise de regressão e correlação nas **Figs. 37 a 45** as quais mostram que (i.) os três parâmetros *in vitro* se correlacionam de forma evidente com os valores totais de MEM e dos escores de 24 horas, obtendo-se os melhores resultados com a correlação de Pearson; (ii). dentre as três estruturas do globo ocular, as que mostraram correlação mas expressivas frente aos 3 parâmetros *in vitro* foram a córnea e a conjuntiva, embora isto ocorresse fundamentalmente em relação ao coeficiente de Pearson, Com relação ao coeficiente de Spearman, estas correlações se afiguram de menor expressão, sendo a córnea a que teve melhor expressividade; (iii.) já a íris, apresentou menor índice de correlação frente aos três parâmetros *in vitro*, destacando-se a razão H₅₀/ID com os menores valores e (iv). o coeficiente de correlação de Pearson proporciona uma melhor especificidade da correlação entre as estruturas do olho e os parâmetros estimados *in vitro*. Ao analisarmos dados da literatura, o estudo realizado por WOLFGANG et al.; 1987, relatam uma boa correlação entre este parâmetro e a **MIOI** do ensaio *in vivo*, sendo representada por $r_s = 0,911$

Tabela 16. Coeficientes de correlação entre os parâmetros “in vitro” e os escores do ensaio “in vivo” dos produtos analisados.

		Correlação de Pearson			Correlação de Spearman		
		logH ₅₀	ID(%)	logH ₅₀ /ID	H ₅₀	ID(%)	H ₅₀ /ID
MEM	Total(MEM)	-0,753	0,764	-0,752	-0,718	0,739	-0,705
	Córnea	-0,728	0,741	-0,716	-0,768	0,740	-0,761
	Íris	-0,513	0,519	-0,512	-0,494	0,501	-0,440
	Conjuntiva	-0,772	0,682	-0,788	-0,601	0,594	-0,571
Escore 24h	Total	-0,753	0,764	-0,752	-0,718	0,739	-0,705
	Córnea	-0,766	0,720	-0,740	-0,765	0,664	-0,740
	Íris	-0,484	0,540	-0,429	-0,440	0,528	-0,429
	Conjuntiva	-0,767	0,685	-0,779	-0,621	0,642	-0,592

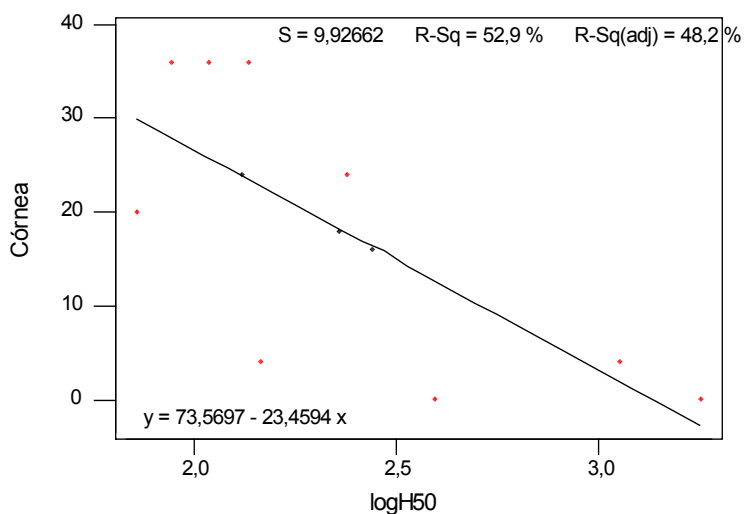


Fig. 37 - Análises de regressão e correlação entre os escores máximos da córnea, obtidos *in vivo* e as logH50µg/mL obtidas *in vitro*.

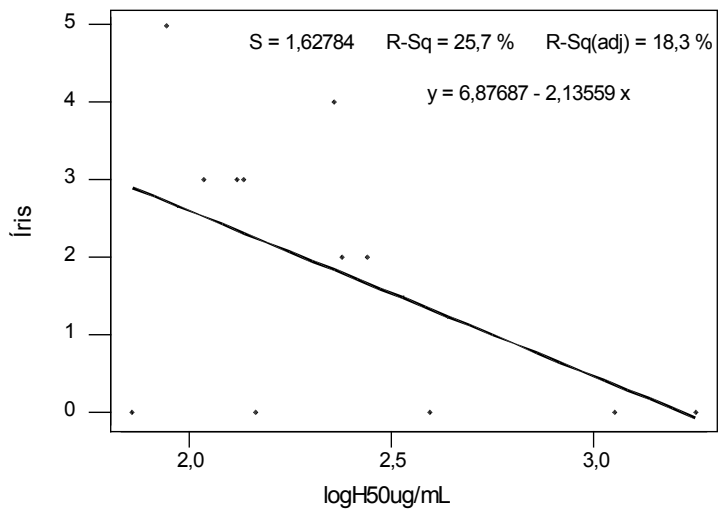


Fig. 38 Análises de regressão e correlação entre os escores máximos da **íris**, obtidos *in vivo* e as logH50µg/mL obtidas *in vitro*.

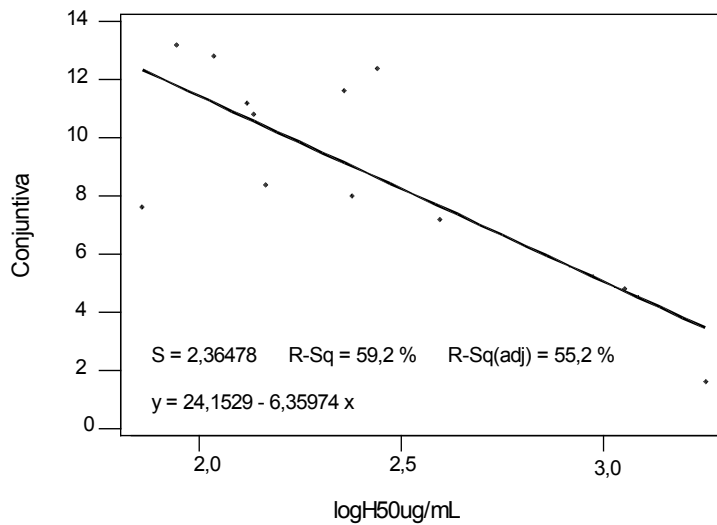


Fig. 39 - Análises de regressão e correlação entre os escores máximos da **conjuntiva**, obtidos *in vivo* e as logH50µg/mL obtidas *in vitro*.

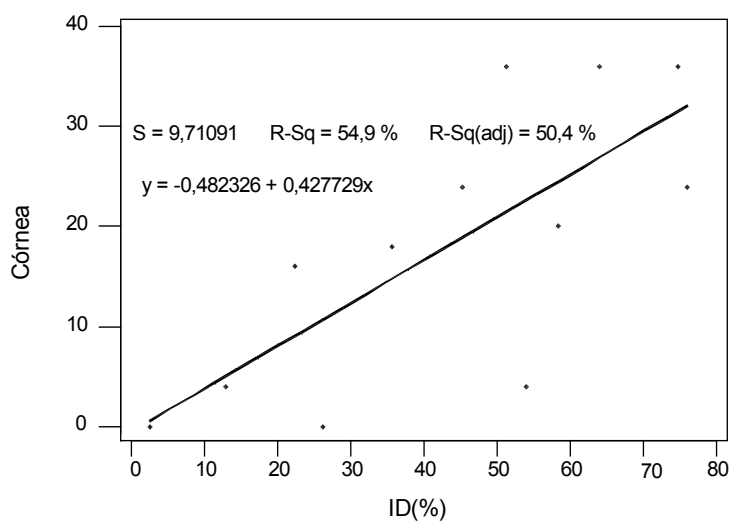


Fig. 40 Análises de regressão e correlação entre os escores máximos da *córnea*, obtidos *in vivo* e os valores de ID obtidos *in vitro*.

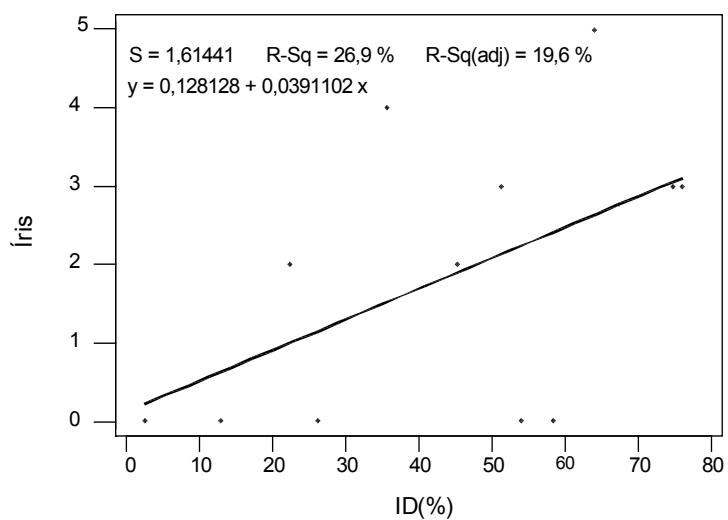


Fig. 41 Análises de regressão e correlação entre os escores máximos da *íris*, obtidos *in vivo* e os valores de ID obtidos *in vitro*.

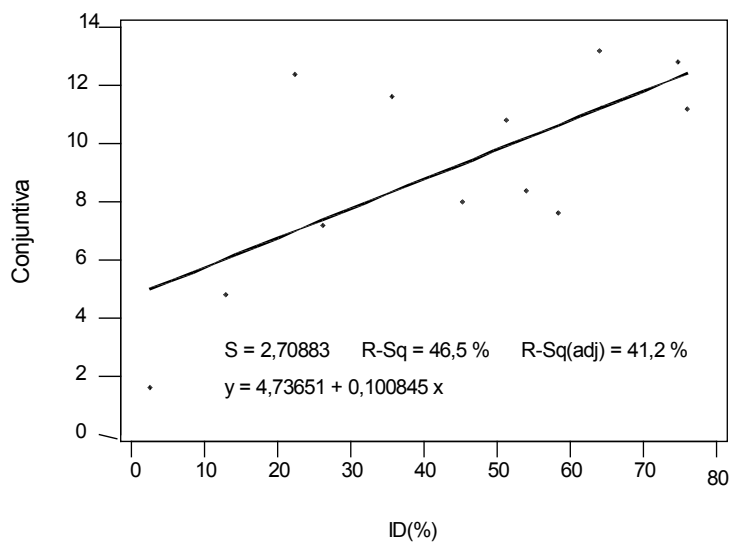


Fig. 42 Análises de regressão e correlação entre os escores máximos da conjuntiva, obtidos *in vivo* e os valores de ID obtidos *in vitro*.

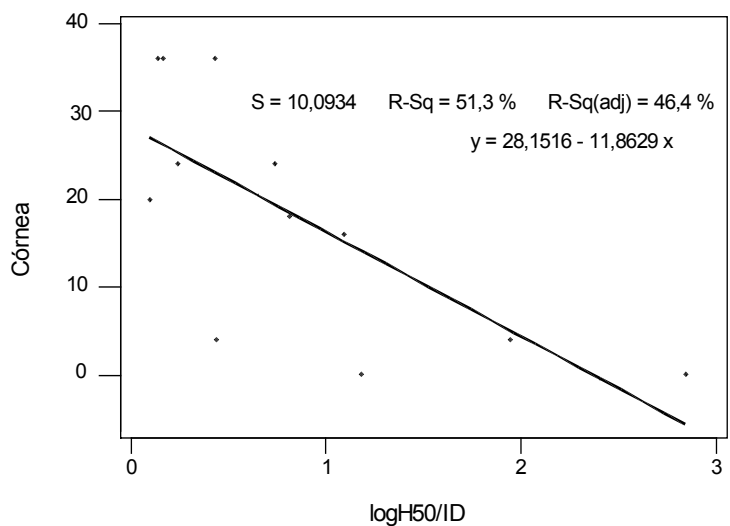


Fig. 43 Análises de regressão e correlação entre os escores máximos da córnea, obtidos *in vivo* e os $\log H_{50}/ID$, obtidos *in vitro*.

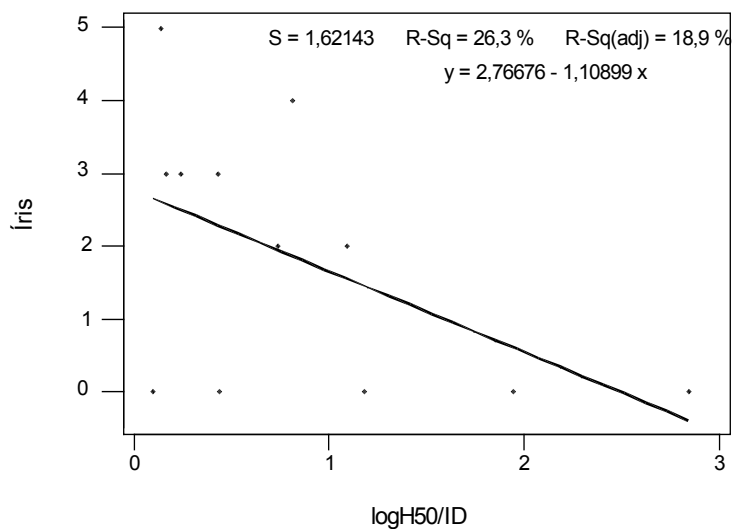


Fig. 44 Análises de regressão e correlação entre os escores máximos da **íris**, obtidos *in vivo* e os logH₅₀/ID, obtidos *in vitro*.

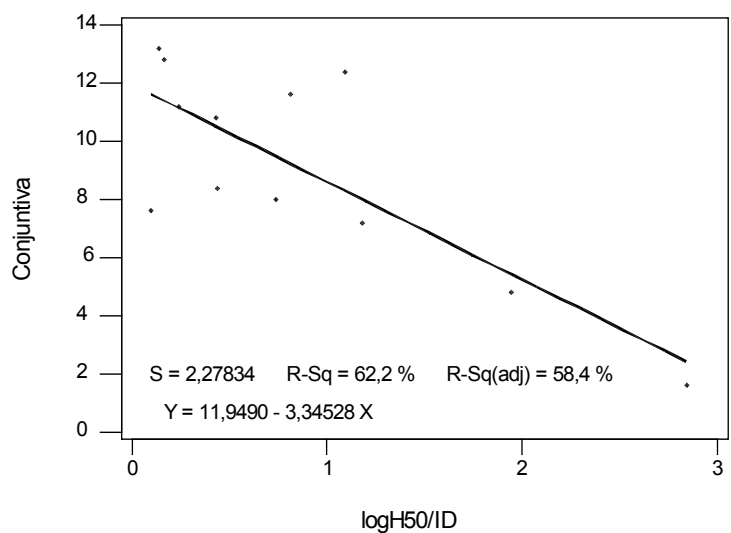


Fig. 45 Análises de regressão e correlação entre os escores máximos da **conjuntiva**, obtidos *in vivo* e os logH₅₀/ID, obtidos *in vitro*.

A reprodutibilidade dos nossos resultados entre os dois analistas, avaliada usando a média dos CV obtida para cada substância-teste, foram 6,19% e 9,86% respectivamente, para os tensoativos e os produtos, valores que indicam um ótimo índice de reprodutibilidade.

Com base no supra exposto, podemos concluir que o ensaio RBC, que avalia injúrias da membrana citoplasmática e alterações das proteínas, aplicado para predizer o grau de toxicidade induzido por 4 tensoativos e 19 produtos cosméticos estudados, revelou que o coeficiente de correlação de Pearson entre os valores da razão H_{50}/ID e o MEM_{total} foi de $-0,960$ e $-0,752$ respectivamente e de $-0,694$ para o conjunto. Os dois primeiros valores são altamente expressivos e o último embora se afigure de menor expressão é considerado relevante para uma análise desta natureza, isto é, que relaciona parâmetros *in vitro* com lesões de tecidos ocorridas *in vivo*. Além disso, merecem ser assinalados os valores limites $1126\mu\text{g/mL}$, para a H_{50} , e 90 , para a H_{50}/ID e a precisão de 96% . Das 23 substâncias-teste, somente uma (CO18) se apresentou como falso negativo, indicando, portanto, um bom nível de preditibilidade.

A metodologia empregada mostrou uma elevada capacidade de predizer o poder de irritabilidade, quando o mesmo é comparado com os escores do ensaio *in vivo* evidenciando, 94% de sensibilidade e 100% de especificidade.

Portanto, os resultados apresentados no presente estudo, indicam que o Ensaio RBC tem uma boa confiabilidade na avaliação do potencial de irritação ocular, confirmando dados fornecidos pela ampla literatura sobre o desenvolvimento de alternativas ao Ensaio de Draize-Irritação Ocular como pode ser visto nos trabalhos descritos por especialistas no tema, tais como: BALLS et al.; 1991, HAYASHI et al.; 1994, BALLS et al.; 1995, HARBELL et al.; 1997, BRANTOM et al.; 1997, BALLS et al.; 1999 e 2002.

Por outro lado, como relata a literatura, as dificuldades no emprego de um único método alternativo para predizer o potencial de irritabilidade oftálmica, reside no fato de não ser possível reproduzir todos os efeitos observados e avaliados *in vivo* havendo a necessidade de utilizar outros testes que sejam complementares, de modo a fornecer resultados que realmente apresentem correspondência direta

com os obtidos no testes *in vivo*, como ocorreu em boa escala no Ensaio RBC através do qual foi possível relacionar os dados obtidos *in vitro* com os dados *in vivo*, envolvendo vascularização, opacidade e permeabilidade celular.

A esse propósito, BALLS et al.; 1995, LIEBSCH et al.; 2002, INDANS et al.; 2002 e WORTH et al.; 2002, descrevem que nenhum dos métodos alternativos para o Ensaio de Draize-Irritação Ocular até o momento apresentados mostraram-se capacitados em substituir o teste em animal. Entretanto, alguns ensaios mostraram ser promissores como screening, dentre estes estão incluídos: (i)- Teste em Olho Isolado de Galinha (ICE); (ii)- Teste de opacidade e permeabilidade em córnea bovina (BCOP); (iii)- HET-CAM; (iv)- Captação de vermelho neutro (NRU) e (v)- RBC- teste de hemólise. A **Tabela 17**, resume os métodos alternativos mais amplamente utilizados.

Dentre os citados na **Tabela 17**, merece destaque o ensaio RBC, que segundo nossos resultados, que confirmam os publicados recentemente por BALLS et al.; 2002, apresentou resultados confiáveis para predizer o potencial de irritação para tensoativos bem como confirma também o ponto de visto de BRADLAW et a.l.; 1997, no que se refere à boa correlação com todos os parâmetros *in vivo*.

Assim, o presente estudo, associado aos dados da literatura, mostrou que o Ensaio RBC pode ser usado na rotina como teste preliminar e tendo como vantagens: (i) a capacidade de predizer o potencial tóxico de tensoativos e de produtos que os contenham; (ii) ser um ensaio simples e objetivo; (iii) ser de baixo custo e não requerer equipamentos especiais; (iv) necessitar somente 1h/amostra, para sua realização e (v) poder ser utilizado como um rápido ensaio de screening, na bateria dos teste *in vitro*

Tabela 17. Apresentação dos métodos alternativos mais utilizados para irritação ocular.

Método	Sistema teste	Endpoint
Bovine corneal opacity and permeability (BCOP) test	cornea isolada de bovino	opacidade e permeabilidade da córnea
Hen's egg test-chorioallantoic membrane (HET-CAM)	ovo de galinha	danos na membrana corion-alatóide
Chorioallantoic membrane-trypan-blue staining (CAM-TBS)	ovo de galinha	danos na membrana corion-alantoide
Isolated rabbit eye (IRE) test	olho isolado de coelho	edema corneal, opacidade corneal e retenção de fluoresceína
Isolated chicken eye (ICE) test	olho isolado de galinha	edema corneal, opacidade corneal e retenção de fluoresceína
Fluorescein leakage (FL) test	Mardin-Darby canine kidney (MDCK) cells	danos causados nas junções das células
Neutral red release (NRR)	células SIRC, 3T3-L1	dano na membrana celular
Neutral red uptake (NRU) test	3T3-L1	viabilidade celular
Red Blood Cell (RBC) haemolysis test	amostra de sangue de bovino	dano a membrana citoplasmática em combinação com dano as proteínas celulares (desnaturação)
Agarose diffusion method	Fibroblastos de camundongo (L-929)	morte celular
EpiOcular	Epitélio corneal humano reconstituído	viabilidade celular, liberação de mediadores inflamatórios, permeabilidade celular

6. CONCLUSÕES

Com base em nossos resultados e nas considerações tecidas a respeito do seu cotejamento com os dados da literatura, podemos sugerir ou concluir que:

6.1 Confirmando dados da literatura, o Método *in vitro* - RBC (teste de hemólise) revelou-se:

a. Um teste capaz de prever, com elevado nível de precisão (96%), a irritabilidade ocular de produtos cosméticos, cuja formulação contenha tensoativos. Isto possibilita a seleção, e consequente exclusão de produtos de elevado poder tóxico, na eventualidade do emprego prévio do teste *in vitro* em associação ao Teste de Draize-Irritação Ocular. Com efeito, dentre as 23 substâncias-teste (19 produtos cosméticos e 4 tensoativos) estudadas, somente um falso negativo foi registrado pelo teste *in vitro* (CO18);

b. um teste de elevado grau de sensibilidade e especificidade, com índices da ordem de 94 e 100%, respectivamente;

c. um teste relativamente simples na execução e de alta reprodutibilidade;

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

6.2 Complementando dados de literatura, demonstramos que o Teste RBC revelou:

a. Uma boa correlação entre os parâmetros H_{50} , ID e H_{50}/ID , avaliados *in vitro*, com as médias dos escores máximos obtidos *in vivo*; para cada estrutura do olho, isto é, córnea, conjuntiva e íris. Na avaliação dos produtos cosméticos, esta correlação persiste somente em relação à córnea e conjuntiva, fato este que não invalida a importância do teste *in*

in vitro em prever a potência tóxica de produtos cosméticos que contenham tensoativos em sua formulação;

- b. que em termos da avaliação de tensoativos, que o coeficiente de correlação de Spearman mostrou-se mais representativo, comparando-se as médias dos escores de 24 horas para cada estrutura ocular com os parâmetros observados *in vitro*, resultado este, que não ocorreu na avaliação dos produtos cosméticos analisados;
- c. que em relação a avaliação de tensoativos, verificou-se uma boa correlação entre a MEM total e os 3 parâmetros avaliados *in vitro*, quando o coeficiente de correlação aplicado foi o de Pearson. Entretanto, na vigência da aplicação do coeficiente de correlação de Spearman, verificou-se que esta correlação mostrou-se menos expressiva com o parâmetro H₅₀ / ID frente à conjuntiva e a MEM total. No que se refere à análise dos produtos cosméticos, os valores encontrados em ambos os coeficientes de correlação, mostraram um elevado grau de homogeneidade entre a MEM total e os parâmetros analisados *in vitro*, com exceção da conjuntiva que apresentou valores menos expressivos em relação ao Coeficiente de Spearman;
- d. que ambas correlações (Pearson e Spearman) tornam-se menos evidentes quando são avaliados globalmente os resultados obtidos com os tensoativos e os produtos cosméticos;
- e. que, face ao exposto acima, pode-se dizer que o teste *in vitro*, revelou-se adequado para prever o potencial de irritabilidade oftálmica;
- f. que, apesar de ser questionável se as reações *in vitro* são compatíveis com as lesões *in vivo*, podemos considerar que os 3 parâmetros avaliados no ensaio *in vitro* em estudo, refletem os efeitos observados na córnea e conjuntiva. Com a íris, o mesmo ocorreu somente em relação aos tensoativos;
- g. que o tempo de armazenamento dos eritrócitos para um período de 4 semanas, não apresentou alterações quanto à fragilidade da membrana citoplasmática em relação aos tensoativos e aos produtos cosméticos.

6. 3 Complementando dados da literatura referentes ao Ensaio *in vivo* verificamos que:

- a. Das 23 substâncias-teste avaliadas no Teste de Draize-Irritação Ocular, 07 foram classificadas com **NI** e 16 com **I** , estas últimas abrangendo 04 **IL**, 06 **IM** e 06 **IS**;
- b. quanto maior foi a agressividade das substâncias-teste sobre as estruturas do olho, maior foi o tempo necessário para a regressão das lesões observadas;
- c. as substâncias-teste de alto poder de irritação tendem, a causar lesões nas três estruturas do olho, isto é, córnea, íris e conjuntiva, enquanto que as com baixo ou nenhum potencial de irritabilidade comprometem na maioria das vezes, apenas uma dessas estruturas, atingindo preferencialmente, a conjuntiva;
- d. a subjetividade na avaliação da graduação das lesões oculares no Teste de Draize-Irritação Ocular, se constitui na principal razão da impossibilidade de estabelecer, de forma satisfatória a comparação dos resultados “*in vitro*” com os dados obtidos *in vivo*;
- e. embora o valor limite entre as substâncias-teste Não Irritantes e as Irritantes estabelecido no presente trabalho se afigure menos amplo do descrito na literatura, consideramos a necessidade de torná-lo ainda menor.

6. 4 Complementando dados da literatura referentes à escolha do(s) ensaio(s) *in vitro* como coadjuvante(s) do teste *in vivo*, os nossos resultados permitem-nos confirmar que:

- a. há necessidade de se utilizar uma bateria de, pelo menos 3 testes alternativos para avaliar globalmente a irritação ocular, devido aos múltiplos mecanismos que regem essa irritação bem como pelo fato de que os teste *in vitro* reproduzem parcialmente a complexa resposta *in vivo*;

- b.** a seleção do sistema *in vitro* deve ser baseada em: (i) – sua reprodutibilidade dentro e entre laboratórios e (ii) – retenção de alguns sistemas metabólicos, que sejam essenciais para avaliar os parâmetros *in vivo* escolhido;
- c.** o sangue de carneiro desfibrinado, usado no modelo experimental *in vitro* do presente trabalho, não interferiu no potencial tóxico das substâncias-teste analisadas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALLS, M.; ZELLER, A. M.; HALDER, M. **Progress in the reduction , refinement and replacement of animal experimentation proceedings of the 3rd World Congress on Alternatives and Animal use in the Life Sciences**, 2000, 31A, 1ed, Netherlands, Elsevier, 886p.

BALLS, M. et al. International Validation Study on Alternatives to the Draize Eye Irritation Test. **Toxicology In Vitro**, v.9, n.6, p. 871-929, 1995.

BRADLAW, J. A.; WILCOX, N. L. Workshop on Eye Irritation Testing: Practical applications of non-whole animal alternatives. **Food Chemical Toxicology**, v. 35, p. 1-11, 1997.

BRANTON, P. G. et al. A summary report of the COLIPA International Validation Study on Alternatives to the Draize Rabbit Eye Irritation Test. **Toxicology In Vitro**, v. 11, p. 141-179, 1997.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC 79, de 31 de agosto de 2000. Estabelece normas e procedimentos para registro de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes e adota a definição de produto cosmético. Diário Oficial [**da República do Brasil**]. Brasília, DF, 31 de agosto de 2000, n. 169-E, seção 1, p 34.

BRASIL. 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, saneante e outros. Diário Oficial [**da República do Brasil**]. Brasília, DF, 07 de janeiro, seção 1, p. 11.

CFR. Code of Federal Regulation-Hazardous Substances Act Regulations United States Federal, Title 16, 38FR: 27012, september 27, 1973.

COSTA, E. A.; ROZENFELD, S. Constituição da Vigilância Sanitária no Brasil. IN: **Fundamentos da Vigilância Sanitária**. ROZENFELD, S. 20ed, Rio de Janeiro, Editora Fiocruz, 304p, p. 15-40, 2000.

DRAIZE, J. H.; WOODARD, G.; CALVERY, O. H. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. **J. Pharm. Expt. Ther.**, v. 83, p. 377-390, 1944.

FRAME. Cosmetics and their ingredients: Animal testing. Disponível em : <http://www.frame.org.uk/Cosmetics.htm>. Acesso em 30 de abril de 2002.

GLOXHUBER, Ch. Toxicological Properties of Surfactants. **Arch. Toxicol.** v. 32, p. 245-270, 1974.

GOLDBERG, A.; McCULLEY, J. P. **Alternative Methods in Toxicology**. 1ed, New York, Mary Ann Liesbert, 1987. 4v. il.

HARBELL, J. W. et al. IRAG working group 4: Cell cytotoxicity assays. **Food and Chemical Toxicology**, v. 35, n. 1, 1997.

HATAO, M. et al. Interlaboratory validation of the in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients.(4) Haemoglobin denaturation test. **Toxicology In Vitro**, v. 13, p. 125-137, 1999.

HAYASHI, T. et al. Hemoglobin denaturation caused by surfactants. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 18, n. 4, p. 540-543, 1995.

INVITTOX PROTOCOL –37. Red Blood Cell test system, England, 1992.

ISO. International Standardization Organization. Biological evaluation of medical devices. ISO 10993-10 , Test for Irritation and Sensitization. 1ed, Suiça, 1995.

INDANS, I. The use and interpretation of in vitro data in regulatory toxicology: cosmetics, toiletries and household products. **Toxicology Letters**. V. 127, p. 177-182, 2002.

KLAASSEN, C. D.; WATKINS, J. B. **Casarett & Doull`s Toxicology- The basic science of poisons**. 5ed. USA: The McGraw-Hill companies, 1999.

KONDO, T.; TOMIZAWA, M. Hemolysis by nonionic surface-active agents. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 57, n.7, p. 1246-1248, 1968.

_____. Mechanism of hemolysis by cationic surface-active agents. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 58, n.11, p. 1378-1381, 1969.

KONDO,T. Mechanisms of hemolysis by surface-active agents. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.6, p. 139-172, 1976.

LEHNINGER, A.L.; DAVID, L. N.; KOX, M. M. **Princípios da Bioquímica**. 2ed. Rio de Janeiro, Sarvier Editora, 1995.

LEWIS, R. W.; McCALL, J. C.; BOTHAN, P. A. A comparison of two cytotoxicity tests for predicting the ocular irritancy of surfactants. **Toxicology In Vitro**, v.7, n. 2, p. 155-158, 1993.

LIEBSCH, M.; SPIELMANN, H. Currently available in vitro methods used in the regulatory toxicology. **Toxicology Letters**, v. 127, p. 127-134, 2002.

MAcDONALD, V. W. Measuring relative rates of hemoglobin oxidation and desnaturation. **Methods in Enzymology**, v. 231, p. 481-490, 1994.

MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: **Ensaio de Irritação Ocular**, seção 10(65.3330.004), INCQS/FIOCRUZ.

OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. Guideline for testing of chemicals. **OECD 405 – Acute eye irritation**. Paris, 1987.

OHNO, Y. et al. First phase validation of the in vitro eye irritation test for cosmetic ingredients. **In Vitro Toxicology**, v. 7, p. 89-94, 1994.

OKAMOTO, Y. et al. Interlaboratory validation of the in vitro eye irritation tests for cosmetics ingredients. (3) Evaluation of the haemolysis test. **Toxicology In Vitro**, v. 13, p. 115-124, 1999.

PERUTZ, M. F. Mechanism of denaturation of haemoglobin by alkali. **Nature**, v. 247, n. 8, p. 341 – 344, February 1974.

REZA, D. M. et al. Inhibition of human hemoglobin autoxidation by sodium n-dodecyl sulphate. **Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35, n. 4, p. 364-370, July 2002.

ROWAN, A. D. The three r's [reduction, refinement & replacement] of animals in experimentation: a historical perspective. **Americaa Anti-Vivisection Society**, Jenkintown. PA, p. 6-12, 1997.

SCCNFP. The Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products Intended for Consumers. SCCNFP/0119- Notes of Guidance for Testing of cosmetic ingredients for their safety evaluation. 3ed, 1999.

SILVA, A. C. P. O Laboratório Oficial na Avaliação Analítica. IN: **Fundamentos da Vigilância Sanitária**. ROZENFELD, S. 20ed, Editora Fiocruz, p. 271-303, 2000.

SPIELMANN, H. et al. Results of a validation study in Germany on two in vitro alternatives to the Draize Eye Irritation Test – The HET-CAM test and 3T3 NRU cytotoxicity test. **ATLA**, v. 24, p. 741-858, 1996.

_____. IRAG working group 2 report CAM-based assays. **Food and Chemical Toxicology**, v. 35, p. 39-66, 1997.

SPIELMANN, H. Ocular Irritation. IN: **In Vitro Methods in Pharmaceutical Research**. CASTELL, J. V.; GÓMEZ-LECHÓN, M. J. California, Academic Press Ltd. P. 265-285, 1997.

VILLELA, G. G.; BACILA, M.; TASTALDI, H. **Bioquímica**. 2ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A, 1996.

VOET, D.; VOET, J. G. **Biochemistry**. 2ed. Toronto, John Wiley & Sons INC, 1995.

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

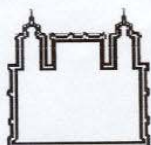
_____. Standardization of in vitro Red Blood Cell Test for evaluation the acute cytotoxic potential of tensides. **Arzneimittel-Forschung/Drug Research**, v. 40(I), n. 4, p. 498-502, 1990.

WORTH, A. P.; BALLS, M. Alternative (Non-animal) methods for chemicals testing: Current status and future prospects. **ATLA**, v. 30, sup. 1, 2002.

ZENECA. Central Toxicology Laboratory. Cheshire(UK): Red Blood Cell Lysis and Protein Denaturation. IP-99, 1994.

ANEXOS

Anexo 1



**Comissão de Ética no Uso de Animais
Fundação Oswaldo Cruz - CEUA-FIOCRUZ**

Recibo de protocolo

Acusamos o recebimento, em 28/11/2002, do projeto intitulado: "**Ensaio RBC (Red Blood Cell): Uma Alternativa ao Teste de Draize**" sob a responsabilidade da Dra. Eloísa Nunes Alves, e que foi protocolado com o No. **P0148-02**.

A Comissão informará o resultado da análise através de carta enviada diretamente ao proponente, no prazo mais breve possível.

Obrigado por submeter seu projeto à CEUA-Fiocruz.

Atenciosamente,

Dr. Marco Aurélio Martins
Coordenador da CEUA-FIOCRUZ

Av. Brasil, nº 4365 - Manguinhos - CEP 21045-900 - Rio de Janeiro - Brasil
Tel: (+55) 21.2598-4395 - FAX: (+55) 21. 2590-9490 E. mail: mmartins@ioc.fiocruz.br

Anexo 2

Fórmula e pH dos produtos estudados.

Código	Composição/nome	Concentração(g) ou (mL)	pH
SH1	Lauril sulfosuccinato dissódico Lauril sulfato de sódio PEG-80 monolaurato de sorbitan Lauril sarcosinato de sódio PEG-150 Água	NC	6,6
SH2	Tridecet sulfato de sódio Decilglicosídeo Cocoamido propil betaína PEG-150 distearato PEG-120 dioleato de metil glicose Água q.s.p	12,5 5,0 2,5 2,0 1,3 100	6,8
SH21	Lauril éter sulfato de amônio Lauril sulfato de amônio Álcool estearílico Xileno sulfonato de amônio Água q.s.p	15,37 5,12 0,18 2,0 100	5,6
SH22	Lauril éter sulfato de sódio Alquil poliglicosídeo (plantaren) Dietanolamida de ácido graxo de coco Dioleato de metilglicose etoxilado Cocoamido propil betaína Água q.s.p	14,4 5,0 2,9 0,1 1,0 100	6,24
SH23	Lauril éter sulfato de sódio Lauril sulfato de amônia Cocoamido 90 Água	10,8 7,2 0,16 75,13	4,9
SH24	Lauril éter sulfato (69-71%) Cocoamido propil betaína (30%) Suspensão (22%) de diestearato de etienoglicol, lauril éter sulfato de sódio e cocoamido propil betaína Formaldeído Água q.s.p	15,38 3,28 9,09 0,04 100	6,2
SH25	Lauril éter sulfato de sódio Cocoamido propil betaína Diestearato de etilenoglicol Dietanolamida de ácido graxo de coco Poliquaternio 44 Água	NC	6,17
SH26	Lauril sulfato de sódio Cocoamido betaína Hidroxiestearil cetil éter + álcool cetílico Cetearil sulfato de sódio 2 oleamido-1,3-octadecanodiol Água q.s.p	22,18 8,0 2,5 0,75 0,01 100	6,82

NC – Não consta

Anexo 2

Fórmula e pH dos produtos estudados.

Código	Composição/nome	Concentração(g) ou (mL)	pH
SH27	Lauril éter sulfato de sódio (25%) Poliquartenium-7 Cocoamido propil betaína Formaldeido Hidra-silic (poliquaternium-7, lauril éter sulfato de sódio) Água	NC	6,16
SH28	Lauril éter sulfato de sódio Dietanolamida de ácido graxo de coco Lauril poliglucose Cocoamido propil betaína Monestearato de etilenoglicol Água	29,12 2,32 1,8 0,5 0,24 62,58	6,72
SH29	Lauril éter sulfato d sódio Cocoamido propil betaína Diestearato de etilenoglicol Dietanolamida de ácido graxo de coco Água q.s.p	26,25 2,0 2,0 3,0 100	5,0
SH30	Lauril éter sulfato de sódio Dietanolamida de ácido graxo d coco Diestearato de polietilenoglicol 6000 Água	NC	6,91
CO13	Cloerto de diestearil diamônio Álcool estearílico Polietilenoglicol Laurato de sorbitano	NC	4,23
CO14	Álcool ceto estearílico Álcool ceto estearílico etoxilado Diazolidinil uréia Iodo propil butil cabarmato	NC	3,18
CO15	Metossulfato de dicocoiletil hidroxietil amônia Propilenoglicol Ácool ceto estearílico Cetoestearoma-c'ogol-20 Éter dicaprílico Água	NC	4,26

Anexo 2

Fórmula e pH dos produtos estudados.

Código	Composição/nome	Concentração(g) ou (mL)	pH
CO16	Álcool ceto estearílico Cloreto de cetil trimetil amônio Álcool de lanolina Álcool de lanolina acetilado Água	NC	3,76
CO17	Álcool ceto estearílico Álcool ceto estearílico etoxilato Diazolidinil uréia Iodo propil bulticarmato Água	NC	3,98
CO18	Álcool cet estearílico Cloreto de cetil trimetil amônio Cocoamido propil betaína Água	NC	3,82
CO19	Álcoois graxos Quaternário de amônia Diquaternário Água	NC	4,67

Anexo 3

Cálculo para determinação da classificação do potencial de irritação da substância-teste.

Coelho	24 Horas	48 Horas	72 Horas	7 dias
1	2	2	0	0
2	2	0	0	0
3	0	0	0	0
4	2	2	0	0
5	2	2	0	0
MÉDIA	1,6	1,2	0	0

$$ME_{Max} = 1,6$$

$$Fc = ME_{Max} \pm 5$$

$$Fc = 1,6 \pm 5 \rightarrow -3,4 - 6,6$$

O valor encontrado da maior média entre as leituras de 24, 48 e 72 horas pode ser considerado, pois há pelo menos 2 valores de L_{xt} dentro da faixa de confiança.

Seguindo-se a classificação prévia, conforme Tabela 2, tem-se o seguinte:

a. o produto é classificado previamente como **Não Irritante**;

b. para confirmar esta classificação, utiliza-se a Tabela 3, verificando o valor da M_{24h} . Como esta média é menor que 2.4, o produto é classificado como **Não Irritante**.

Resumindo temos:

Classificação Prévia - **Não Irritante**

Classificação Final - **Não Irritante**