

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE INDUZIDA POR PRODUTOS COSMÉTICOS  
PELO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS EM CÉLULAS 3T3

Clarice Lima do Canto Abreu

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

Orientadora: Isabella Fernandes Delgado

Rio de Janeiro

2008

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE INDUZIDA POR PRODUTOS COSMÉTICOS  
PELO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS EM CÉLULAS 3T3

Clarice Lima do Canto Abreu

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:

\_\_\_\_\_(INCQS/FIOCRUZ)  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira

\_\_\_\_\_(INCQS/FIOCRUZ)  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosaura de Faria Presgrave

\_\_\_\_\_(UFF)  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rita Leal Paixão

\_\_\_\_\_(INCQS/FIOCRUZ)  
Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dra. Isabella Fernandes Delgado

Rio de Janeiro  
2008

Abreu, Clarice Lima do Canto

Avaliação da citotoxicidade induzida por produtos cosméticos pelo método de Quantificação de Proteínas Totais em células 3T3/Clarice Lima do Canto Abreu. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2008.

xiii, 104 p., il., tab.

Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2008. Orientador: Isabella Fernandes Delgado

1. Quantificação de Proteínas Totais 2. Métodos alternativos 3. Teste de citotoxicidade 4. Irritação ocular 5. Produtos cosméticos

Evaluation of cytotoxicity induced by cosmetics products utilizing Total Protein Quantification Method with 3T3 cell lineage.

Dedico este trabalho aos animais, que doaram suas vidas ao conhecimento científico.  
Dedico aos meus pais, presentes em todos os momentos de minha vida.  
Dedico aos meus familiares e amigos, que me apoiaram durante a confecção deste trabalho.

*“Human truths, however valuable they seem, are always open to challenge, revision, to refinement, to refutation, to repeal. Only the question is eternal.”*

(Andre Geurard)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que iluminou e guiou meus passos, em sua infinita sabedoria.

Agradeço aos meus pais Gláucia Lima do Canto Abreu e Jair do Canto Abreu Jr, por serem meus eternos companheiros de jornada, meus eternos anjos da guarda. Obrigada por estarem ao meu lado nos momentos mais importantes de minha vida!

Ao meu marido Marko Olavi Suomela, pelo companheirismo, carinho e compreensão;

A minha orientadora, Dra. Isabella Fernandes Delgado, sem a qual, jamais teria chegado até aqui. Isabella, serei eternamente grata pelo apoio, incentivo, paciência e carinho de sempre;

Aos meus queridos amigos de laboratório Anna Guimarães, Ana Cristina (Tininha), Isis, Letícia e Daniel Machado pela colaboração na confecção deste trabalho;

Ao amigo Rodrigo Costa, pela inestimável ajuda durante a realização deste estudo e por dividir comigo, seus resultados *in vitro*;

Aos queridos amigos Octávio e Rosaura Presgrave e Eloísa Alves, por compartilharem seus profundos conhecimentos e resultados de seus estudos sobre irritação *in vivo*;

Ao colega Wlamir Moura pela grande ajuda na parte estatística do projeto;

Aos meus queridos amigos, Cristiane Caldeira, Ludmila Bergstein e João Carlos (Profeta), pelo incentivo e apoio;

A toda equipe do Departamento de Farmacologia e Toxicologia e do Departamento de Imunologia do INCQS que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste estudo;

A Coordenação de Pós Graduação do INCQS, pela organização do curso de Mestrado Acadêmico em Vigilância Sanitária;

A Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela colaboração financeira para a realização deste projeto.

## RESUMO

A sociedade científica mundial vem sofrendo pressão para que seja efetuada a substituição de ensaios *in vivo* por ensaios *in vitro*, sendo o teste de irritação ocular de Draize um dos testes *in vivo* mais fortemente combatidos pelos setores ativistas que lutam pela promoção e preservação do bem estar animal. Como a substituição do teste de Draize por metodologia alternativa se mostrou tarefa mais difícil do que se imaginava inicialmente, sobretudo devido ao grande número de desfechos que esta metodologia quantifica, as agências internacionais de validação de metodologia alternativas adotaram como conduta a busca por uma bateria de ensaios *in vitro* que possam servir de triagem para avaliação do potencial irritante ocular de produtos e ingredientes. Neste caso, o uso de animais só é recomendado, quando os resultados obtidos *in vitro* sugerem um baixo potencial irritante. Neste contexto, o presente estudo objetivou avaliar o grau de preditibilidade do método de Quantificação de Proteínas Totais (QPT) na avaliação do potencial citotóxico de tensoativos (N=6) e produtos cosméticos acabados (xampus e condicionadores, N=19). Todos os produtos avaliados no presente estudo foram previamente analisados quanto ao seu potencial irritante pela metodologia *in vivo*. O teste *in vitro* foi realizado utilizando linhagem celular proveniente de fibroblasto de embrião de camundongo (3T3) e o corante Azul Brilhante de Coomassie R-250. A avaliação do coeficiente de variação do teste de QPT em células 3T3 mostrou um valor de CV% global de 30,00%. Para a comparação entre os resultados *in vivo* (MEM) e *in vitro* (IC<sub>50</sub>) utilizamos o coeficiente de correlação de Pearson. Obtivemos o valor de -0,420 ( $p=0,022$ ) para a correlação entre os métodos. A análise entre os valores de IC<sub>50</sub> e MEM das diferentes estruturas oculares mostrou uma melhor correlação do método *in vitro* com lesões ocorridas na conjuntiva, do que na íris e córnea. Além disso, observou-se valores de correlação de melhor calibre para tensoativos do que para produtos acabados. Para a avaliação da preditibilidade do teste *in vitro* em relação ao teste *in vivo*, estabeleceu-se um ponto de corte (*cut-off*) para a diferenciação de substância irritantes (IC<sub>50</sub><1,000 mg/ml) de não-irritantes (IC<sub>50</sub>>1,000 mg/ml) no teste *in vitro*. Assim, nas condições experimentais do presente estudo, a precisão do ensaio foi de 80%, a sensibilidade de 94% e a especificidade de 43%. Com base nos resultados obtidos, podemos concluir que o método de QPT, utilizando o corante Azul Brilhante de Coomassie R-250 e linhagem celular 3T3, apresenta melhor capacidade de predizer o potencial irritante de produtos isolados (tensoativos), do que de produtos acabados (xampus e condicionadores). Embora o valor de CV% global seja considerado adequado, segundo a OMS, para ensaios conduzidos com linhagens celulares, a comparação de nossos resultados com dados da literatura demonstra que a utilização de células SIRC é mais vantajosa em termos de precisão inter-ensaio. Também em termos de sensibilidade, especificidade e precisão observamos resultados mais promissores quando da utilização de células SIRC. Concluímos ainda, que o teste proposto tem maior capacidade em predizer o efeito irritante ocorrido na conjuntiva do que nas outras estruturas oculares (íris e conjuntiva). Por fim, vale ressaltar que o método apresenta alto grau de sensibilidade e grau moderado de especificidade e sua utilização pode ser útil como teste adicional à bateria de ensaios com aplicação na avaliação de toxicidade induzida por produtos sujeitos à ação da Vigilância Sanitária.

## ABSTRACT

The world scientific community is under pressure to find effective ways to substitute *in vivo* by *in vitro* tests. The Draize Eye Test is one of the most disapproved *in vivo* tests by the animal welfare activists. Since the substitution of the Draize Eye Test by an alternative method turned out to be a more difficult issue than it was first thought, mainly due to the great number of endpoints that this assay is able to quantify, the international validation agencies for alternative methods adopted, as a conduct, the search for a set of *in vitro* assays, which might work as a screening for the evaluation of the ocular irritant potential of products and ingredients. The use of animals would only be recommended if the results obtained with the *in vitro* screening tests indicate a low irritant potential for a determined substance. In this context, the main goal of the present study was to evaluate the degree of predictability of the Total Protein Quantification Methodology (QPT) in the evaluation of the citotoxic potential of surfactants (n=6) as well as in cosmetics (shampoos and hair conditioners, n=19). All the evaluated products in this study were previously analyzed *in vivo*, regarding their irritant potential. The *in vitro* test was performed using a cellular lineage derived from embryo mouse fibroblast (3T3) and the dye Blue Brillant of Coomassie – R 250. The evaluation of the test variation coefficient (CV%) in 3T3 cells demonstrated a global CV% of 30%. In order to compare the *in vivo* (MMS) results with the ones obtained *in vitro* (IC<sub>50</sub>), we applied the Pearson's coefficient of correlation. The value obtained for the correlation between the two methods was -0.420 (p=0.022). The analysis of the IC<sub>50</sub> and MMS values of the different ocular structures showed a better correlation of the *in vitro* method with the injuries on the conjunctive, than with the damage found on the iris or cornea *in vivo*. Furthermore, an enhanced correlation of the *in vitro versus in vivo* method was observed for surfactants, when compared to whole products. In order to evaluate the predictability of the *in vitro* test in regard to the *in vivo* method a cut-off point was established, where substances with values of IC<sub>50</sub><1 mg/ml were determined as irritant and substances with levels of IC<sub>50</sub> higher then 1mg/ml were considered as non-irritant. Hence, under the experimental conditions of the present study, the assay accuracy was of 80%, the sensibility was 94% and the specificity was of 43%. Based on the results obtained we conclude that the QPT method, using Dye Blue Brilliant of Comassie R-250 and the cellular lineage 3T3, shows a better ability to predict the irritant potential of isolated products (surfactants) than of entire products. Even though the global CV% value found with our *in vitro* method, according to WHO, is considered suitable for assays performed with cell lines, the comparison of our results with the published data shows that the SIRC cell line is more interesting once considering inter-assay accuracy. We also conclude that the proposed assay has a better capacity to predict the irritant effect on the conjunctive than on the other ocular structures. At last, it is worth pointing out that this method shows a high sensibility degree and moderate level of specificity, and the application of the QPT assay may be useful to add the screening set assays for the evaluation of toxicity induced by products under the scope of Sanitary Surveillance.



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- 3T3 - Células de embrião de camundongo
- ABIHPEC - Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- ATTC - American Type Tissue Collection.
- BCOP – Opacidade e Permeabilidade de Córnea Bovina
- BSS.CMF – Solução salina balanceada livre de cálcio e magnésio
- CBB.R250 – Corante Azul Brilhante de Coomassie
- CPSC - Consumer Product Safety Commission
- CSHHIB - Chemical Safety and Hazard Investigation Board
- CV% – Coeficiente de variação
- DFT – Departamento de Farmacologia e Toxicologia
- DL<sub>50</sub> – Dose letal 50
- D.O – Densidade óptica
- ECVAM – European Centre for Validation of Alternative Methods
- EEC –Economic European Community
- e.g – *exempli gratia* (por exemplo)
- ELISA –Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
- EPA - Environmental Protection Agency. Agência de Proteção Ambiental
- ESAC - Scientific Advisory Committee
- FDA - Food and Drug Administration
- FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz
- FRAME – Fund for Replacement of Animals in Medical Experiments
- GH – Geneticamente modificado
- HET-CAM – Teste em Membrana Cório-Alantóide de Ovo Embrionado de Galinha
- IC<sub>50</sub> – Concentração inibitória<sub>50</sub>
- ICCVAM - Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods
- IL – Irritante Leve
- IM – Irritante moderado
- IMáx – Irritante máximo
- IS – Irritante severo

ICH - *International* Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use

ILAR – Institute for Laboratory Animal Research

INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

IRE – Isolated Rabbit Eye

JaCVAM - Japanese Center for the Validation of Alternative Methods

K-S – Teste estatístico *Kolmogorov-Smirnov*

LACENS - Laboratórios centrais de Saúde Pública

LDH – Enzima Lactato Desidrogenase

LLNA - Local Lymph Node Assay

L929 – Linhagem celular proveniente de fibroblasto de camundongos

MEM – Média dos escores máximos

MTT – Ensaio de captação do corante Tetrazolium (atividade metabólica mitocondrial)

NI – Não irritante

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

OSHA: Occupational Safety and Health Administration

OECD: Organization for Economic Co-operation and Development

PBS – solução tampão

POP – Procedimento operacional padrão

QPT – Ensaio de Quantificação de Proteínas Totais

*q.s.p* – Quantidade suficiente para

RBC – Red Blood Cell Test

REBLAS - Laboratórios da Rede Brasileira de Laboratórios Analíticos em Saúde

RSPA: Research and Special Programs Administration.

SFB – Soro fetal bovino

SINITOX – Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas

SIRC – linhagem celular proveniente de córnea de coelho

ToBI – Teste de Inibição da Ligação da Toxina

WHO – World Health Organization

VSQ – Vaccine and Sera Quality –

ZEBET - Centre for Documentation and Evaluation of Alternatives to Animal Experiments

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista dos produtos avaliados: uso, classificação <i>in vivo</i> , fabricante, marca e composição	33
Tabela 2 - Classificação <i>in vivo</i> dos produtos acabados	49
Tabela 3 - Relação dose-resposta entre os escores (MEM) obtidos <i>in vivo</i> e a concentração de tensoativos aplicados nos olhos dos animais	50
Tabela 4 - Categorização do potencial irritante ocular dos tensoativos avaliados	52
Tabela 5 - IC <sub>50</sub> média dos produtos/tensoativos	54
Tabela 6 - Comparação dos resultados <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> obtidos com tensoativos	56
Tabela 7 - Precisão inter-ensaio do teste <i>in vitro</i>	57
Tabela 8 - Valores utilizados para o cálculo dos coeficientes de correlação de Pearson: médias aritméticas das IC <sub>50</sub> , valor global de MEM e das estruturas oculares (MEM de córnea, íris e conjuntiva)	64
Tabela 9 - Coeficientes de correlação de Pearson relacionando os valores de IC <sub>50</sub> com os escores das estruturas oculares dos ensaios <i>in vivo</i>	65
Tabela 10 - Comparação entre as classificações obtidas no ensaio <i>in vivo</i> e o valor médio de IC <sub>50</sub> <i>in vitro</i>	67
Tabela 11 - Tabela de Contingência.	68
Tabela 12: Casos registrados de intoxicação humana por agente tóxico	71
Tabela 13: Avaliação comparativa dos CV% globais do método de QPT com diferentes linhagens celulares.	81
Tabela 14: Avaliação comparativa da preditibilidade do método de QPT com diferentes linhagens celulares	82
Tabela 15: Avaliação comparativa dos valores de IC <sub>50</sub> obtidos com tensoativos no presente estudo em comparação com modelos descritos na literatura	85

Tabela 16: Comparação dos valores de coeficiente de correlação de Pearson em diferentes ensaios de citotoxicidade

86

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Cartazes da campanha de Henry Spira contra a realização do teste de Draize para a avaliação da segurança de produtos cosméticos	06
Figura 2 - Exemplo de bateria de métodos alternativos propostos para avaliação da irritação ocular	09
Figura 3 - Ilustração divulgada pelo FDA no ano de 1933	13
Figura 4 - Publicações da década de 1930 com registros dos agravos à saúde induzidos por produtos de uso comum, tais como medicamentos, alimentos e cosméticos	14
Figura 5 - John H. Draize, farmacologista do FDA que desenvolveu o teste de irritação ocular de Draize em 1944	15
Figura 6 - Células 3T3	27
Figura 7 - Esquema resumido do procedimento do ensaio <i>in vitro</i>	43
Figura 8 - Esquema da aplicação das amostras diluídas na placa de 96 poços	44
Figura 9 - Distribuição normal dos valores de MEM Global ( <i>in vivo</i> )	60
Figura 10 - Distribuição normal dos valores de média aritmética da IC <sub>50</sub>	60
Figura 11 - Distribuição normal dos valores de MEM de córnea	61
Figura 12 - Distribuição normal dos valores de MEM de íris	61
Figura 13 - Distribuição normal dos valores de MEM de conjuntiva	62
Figura 14: Estratégia para teste de irritação ocular de novas substâncias químicas de acordo com procedimentos de países membros da Comunidade Européia.	78

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Exemplos de metodologias alternativas validadas/aceitas para fins regulatórios na Europa.	03
Quadro 2: Legislações internacionais e a preconização do teste de irritação ocular de Draize.	16
Quadro 3: Prazos estimados - segundo a Directiva 2003/15/EEC - para a proibição definitiva do uso de animais na avaliação de alguns desfechos toxicológicos comumente investigados pela indústria de cosméticos	18
Quadro 4: Principais testes alternativos usados na avaliação da toxicidade ocular	20
Quadro 5: Registro do FDA: reclamações de consumidores quanto a reações adversas provocadas por produtos cosméticos nos EUA, entre 1987 e 1995	73

## SUMÁRIO

Resumo	iv
Abstract	v
Lista de Siglas e abreviaturas	vi
Lista de Tabelas.	ix
Lista de Figuras	xi
Lista de Quadros	xii
I.INTRODUÇÃO	
1.1 Considerações Gerais	01
1.2 Princípio dos 3R's	04
1.3 Exemplos de aplicações da regra dos 3R's no controle da qualidade de produtos sujeitos à Vigilância Sanitária	07
1.4 Da origem do Teste de Draize à proibição do uso de animais no processo de avaliação de segurança de produtos cosméticos	09
1.5 Métodos alternativos ao Teste de irritação ocular de Draize	18
1.6 Ensaios de citotoxicidade	23
1.7 Ensaio da Quantificação de Proteínas Totais (QPT)	24
1.7.1 Células 3T3	26
1.8 Justificativa.	28
II OBJETIVOS	30
III MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 Produtos acabados e tensoativos	31
3.2 Ensaio <i>in vitro</i>	
3.2.1 Linhagem celular	37
3.2.2 Soluções	37
3.2.3 Equipamentos	39
3.2.4 Descongelamento celular	41
3.2.5 Procedimento	41

3.3 Ensaio <i>in vivo</i>	45
3.4 Análise Estatística	45
IV. RESULTADOS	48
4.1 Resultados <i>in vivo</i>	48
4.1.1 Produtos infantis	48
4.1.2 Produtos da linha adulta	48
4.1.3 Tensoativos	49
4.2 Resultados <i>in vitro</i>	53
4.2.1 Precisão Inter.- ensaio	56
4.3 Comparação entre os ensaios <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	58
4.3.1 Coeficiente de correlação de Pearson	59
4.3.2 Grau de preditibilidade do ensaio <i>in vitro</i>	66
V.DISSCUSSÃO	69
5.1 Toxicologia de Produtos Cosméticos	69
5.2 Avaliação integrada: combinação de testes <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> na avaliação do potencial irritante ocular	75
5.3 Uso de métodos alternativos na avaliação do potencial irritante de cosméticos	79
5.4 Confronto com dados da literatura	80
VI. Conclusões	90
VII. Referências Bibliográficas	92



# I. INTRODUÇÃO

---

## 1.1 Considerações Gerais

A pressão política exercida por setores ativistas que lutam em defesa dos direitos dos animais tem gerado grande impacto na pesquisa científica, sobretudo na área biomédica. Neste contexto, pode-se dizer que diversos setores da indústria, *e.g.* cosméticos, imunobiológicos, fármacos entre outros, assim como órgãos governamentais de regulamentação e controle da qualidade de produtos, estão sob crescente pressão para - sempre que possível - substituir a experimentação animal por metodologias alternativas.

Embora a comunidade científica, em sua maioria, concorde com o fato de que metodologias *in vitro* podem representar uma opção promissora para a pesquisa na área biomédica e que em algum ponto do futuro, essas alternativas podem vir a substituir um número considerável de métodos *in vivo* hoje preconizados em compêndios oficiais (*e.g.* métodos farmacopeicos), há de se considerar que o processo de desenvolvimento e validação de novos métodos alternativos é laborioso e requer grande investimento de tempo, dinheiro e pessoal capacitado. Assim alguns países, percebendo a complexidade de tal processo, se organizaram e criaram centros de pesquisa e fomento para o desenvolvimento e validação de metodologias alternativas ao uso de animais, como é o caso do *European Centre for Validation of Alternative Methods* (ECVAM) em Ispra na Itália, o *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods* (ICCVAM) nos EUA, o *Japanese Center for the Validation of Alternative Methods* (JaCVAM) no Japão, o *Fund for Replacement of Animal Medical Experiments* (FRAME) na Inglaterra e o *Centre for Documentation and Evaluation of Alternatives to Animal Experiments* (ZEBET) na Alemanha, entre outros. Dentre os principais objetivos destes centros de estudos, destacam-se: *i.* o desenvolvimento de novos métodos alternativos em consonância com o princípio dos 3Rs, *ii.* o estabelecimento da base de dados sobre métodos alternativos ao uso de animais, *iii.* o fomento de projetos de pesquisa relacionados aos métodos alternativos e a cooperações com outras agências de fomento nacionais e internacionais e centros de validação, *iv.* a coordenação de estudos inter-

laboratoriais de validação; e por fim, v. a promoção de fóruns de discussão sobre métodos alternativos ao uso de animais.

Como resultado deste esforço mundial no desenvolvimento/validação de metodologias alternativas, existe hoje um número considerável de ensaios validados e aceitos para fins regulatórios (Quadro 1). Tais métodos são aplicáveis ao controle da qualidade de produtos sujeitos à ação da Vigilância Sanitária e - via de regra - apresentam boa especificidade, sensibilidade e precisão. Além disso, são considerados vantajosos quando comparados aos ensaios *in vivo* que pretendem substituir. Dentre as principais vantagens quando consideramos tais metodologias alternativas, podemos citar:

1. **Questões éticas**: embora a utilização de animais em experimentos científicos ocorra há milhares de anos (RAYMUNDO & GOLDIM, 2002) e sejam inegáveis os benefícios alcançados para o desenvolvimento da ciência e de novas tecnologias, principalmente na área da saúde, é necessário o comprometimento do meio científico pela busca, sempre que possível, de modelos alternativos.
2. **Maior rapidez de resposta**: ensaios alternativos apresentam - em sua grande maioria - menor duração que ensaios *in vivo*.
3. **Maior precisão de resultados**: muitos ensaios *in vivo* apresentam desfechos subjetivos, que muitas vezes dependem de um treinamento criterioso dos técnicos envolvidos na análise final dos resultados (*e.g.* análise qualitativa de alterações da pele ou olho após aplicação de um determinado produto). Estes desfechos podem ser hoje substituídos por ensaios automatizados e cuja análise final é objetiva (*e.g.* quantificação de citocinas por ELISA ou estabelecimento da IC<sub>50</sub> - concentração inibitória 50% - em testes de citotoxicidade).

Quadro 1: Exemplos de metodologias alternativas validadas/aceitas para fins regulatórios na Europa.

Teste	Desfechos Avaliados	Modelo Usado	Ensaio a ser substituído	Validação	Aceito para fins regulatórios
Teste de Irritação Dérmica	Potencial irritante de produtos acabados ou ingredientes	Modelos de pele reconstituída (EPISKIN®, EPIDERM®). Análise através de citotoxicidade (redução de MTT)e/ou liberação de IL.	Teste de irritação dérmica em coelhos	2007	Não
Teste de Pirogênio <i>in vitro</i> (LAL)	Pirogênicidade mediada por endotoxinas de origem bacteriana (Gran-neg.)	Ensaio gel-clot – gelificação de amebócito sanguíneos de carangueijo <i>Limulus</i>	Teste e Pirogênio em coelhos	1985	Sim. Farmacopéia (Americana)
Teste de Pirogênio <i>in vitro</i>	Pirogênicidade - pirogênios em geral	Quantificação de IL-1 ou IL-6 em sangue total humano fresco ou criopreservado, ou quantificação de IL-6 em linhagem celular Mono-Mac 6 ou em células monocíticas isoladas de sangue humano periférico	Teste de pirogênios em coelhos	2006	Não
Ensaio do Linfonodo Local Murino	Potencial sensibilizante de xenobióticos	Quantificação de 3H-timidina nos linfonodos auriculares de camundongos tratados com substância teste	Teste de maximização e Buehler em cobaias	2000	2002 (OECD test guideline 429)
Ensaio de Fototoxicidade (3T3-NRU)	Potencial fototóxico de ingredientes de produtos preconizados para pele humana (exposição a luz solar)	Utilização de linhagem celular 3T3 e corante Vermelho Neutro	Teste de Fototoxicidade <i>in vivo</i> (cobaias)	1998	2002 (Directiva 67/548/EEC; Draft OECD test guideline 432)
Teste de Potência do componente tetânico	Potência do componente tetânico presente em vacinas de uso humano como DTP, DT, dT e DTP acelular e no soro anti-tetânico	Teste <i>in vitro</i> de inibição de ligação da toxina (ToBI)	Teste de potência em camundongos	2000	2003, EDQM*/Farmacopéia Européia

\*: The European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare

Fonte: ECVAM

4. **Menor custo:** apesar dos altos custos envolvidos no processo de desenvolvimento/validação de uma nova metodologia, pode-se dizer que, uma vez validadas, as metodologias alternativas apresentam um custo menor do que aquelas relacionadas à manutenção de animais e infra-estrutura de biotérios. O cumprimento das normas internacionais de bioterismo exige cuidados especiais com o ambiente (controle de temperatura, umidade, luminosidade, troca de ar etc.), com os animais (frequência de trocas, limpeza de caixas e gaiolas etc.) bem como o treinamento e atualização dos técnicos que manipulam esses animais (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2003), o que eleva muito o custo destes ensaios.
  
5. **Maior facilidade de disseminação para outros laboratórios de saúde pública,** e.g. laboratórios centrais de Saúde Pública (LACENS), Laboratórios da Rede Brasileira de Laboratórios Analíticos em Saúde (REBLAS) e universidades, pois eliminam a necessidade de infra-estrutura para a criação e manutenção de animais de experimentação.

## 1.2 O Princípio dos 3R's

Em 1959, Willian Russel e Rex Burch apresentaram à comunidade científica o livro *Principles of Humane Experimental Technique*, definindo os 3R's, cuja sigla representa “*refinement*”, “*reduction*” e “*replacement*”, que significam respectivamente: (1) refinamento: a modificação de algum procedimento operacional com animais, objetivando minimizar a dor e/ou o estresse. A experiência da dor e do estresse tem, como resultado, mudanças psicológicas que interferem nos resultados obtidos. Sendo assim, o interesse dos cientistas é assegurar que as condições ambientais para os animais sejam as melhores possíveis; (2) redução: um menor número de animais sendo utilizado para obter a mesma qualidade de informação, ou maximização da informação obtida, utilizando-se mesmo número de animais utilizados no teste clássico; e (3) substituição, dos testes *in vivo* por testes *in vitro* (HENDRIKESSEN *et al.*, 1994; PRESGRAVE, 2002; CORRADO, 2007; ANVISA, 2003).

Apesar da pouca atenção da comunidade científica durante a década de 1960 à regra dos 3R's, este conceito evoluiu como uma tendência mundial durante os anos seguintes, iniciando uma forte pressão quanto a implicações éticas para a não utilização de animais em pesquisas científicas e a mobilização de várias entidades e órgãos regulatórios no árduo trabalho da validação de métodos alternativos na área biomédica.

Nas décadas de 1970 e 1980 a discussão sobre o uso de animais em pesquisa científica tornou-se mais abrangente e madura. Estas décadas viveram a discussão de temas, tais como: meios para reduzir tanto o número de animais de laboratório utilizados por experimento, quanto o número de experimentos realizados; otimização das condições que promovessem um maior bem-estar de animais em experimentação; desenvolvimento de métodos de refinamento das técnicas convencionais, além de, sempre que possível, a tentativa de substituir modelos *in vivo* por modelos *in vitro*.

Em 1975, o filósofo australiano Peter Singer lançou o livro intitulado *Animal Liberation* (SINGER, 1975), despertando o movimento de proteção aos animais e apontando o teste de irritação ocular de Draize (teste preditivo para a determinação da irritabilidade oftálmica induzida por drogas, cosméticos e substâncias químicas descrito por John Draize e colaboradores - DRAIZE *et al.*, 1944), como um importante alvo de combate para os ativistas (WILHELMUS, 2001; CORRADO, 2007). A partir de então, o teste de Draize gerou muitos protestos, principalmente contra a indústria de cosméticos, que o utilizava em grande escala. Uma grande campanha deflagrada por ativistas dos direitos civis contra a indústria de cosméticos REVLON culminou com a publicação dos seguintes anúncios no jornal *The New York Times*: “Cego pela beleza” e “Quantos coelhos a REVLON cega em nome da beleza?” (Figura 1). Após estes protestos a REVLON providenciou fundos para pesquisas em métodos alternativos ao uso de animais. Outras companhias, como AVON e Bristol-Myers, seguiram o mesmo caminho e colaboram no fomento as pesquisas afins (RAYMUNDO & GOLDIM, 2002)

Apesar da década de 1970 ter sido de amadurecimento, como dito anteriormente, no que se refere à discussão de questões éticas em experimentação animal, a primeira publicação oficial sobre a aplicação dos 3R's só surgiu em meados de 1980, quando foi

criada na Europa a Directiva 86/906/EEC que descreve as leis que regem a proteção de animais usados em experimentação científica (ROWAN, 1997).



Figura 1: Cartazes da campanha de Henry Spira contra a realização do teste de Draize para a avaliação da segurança de produtos cosméticos publicada pelo *The New York Times* na década de 1980.

Fonte: <http://pages.cthome.net/pageone/commdesign.html> (Acessado em 20/Fevereiro/2008)

Assim, pode-se dizer que foi somente nos anos 1980 que o interesse pela busca de novas metodologias alternativas à utilização de animais na pesquisa científica se consolidou. Novas legislações passaram a aderir ao conceito dos 3R's e as pesquisas em métodos alternativos aumentaram consideravelmente (ROWAN & ANDRUTIS, 1990; PAIXÃO, 2001). Como resultado deste processo, pôde-se observar em alguns países uma diminuição significativa do número de animais utilizados em pesquisa científica. Na Alemanha, por exemplo, após a fundação do ZEBET em 1989, o número de animais de laboratório utilizados anualmente diminuiu de 2,7 milhões em 1989 para 1,6 milhões em 1999 (SPIELMANN, 2002). Uma análise mais detalhada destes números revela que esta diminuição foi devida - predominantemente - à redução do número de animais usados em pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de novos fármacos. Neste setor, a redução foi

de mais de 50%, *i.e.* de 1,4 para 0,6 milhões de animais/ano, no mesmo período de tempo compreendido entre 1989 e 1999. Tecnologias modernas, como *e.g.* técnicas físico-químicas, cultura de células, tecidos e órgãos - aliadas ao investimento financeiro da indústria farmacêutica - permitiram a concepção de modelos mais adequados de triagem (tanto no estabelecimento do perfil toxicológico como na avaliação de eficácia) das moléculas candidatas ao desenvolvimento de novos fármacos. Além disso, a utilização de ferramentas de informática, bases de dados contendo informações sobre matérias-primas, a harmonização de diretrizes internacionais através do ICH (*International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*) contribuíram enormemente para a elaboração de bancos de informações e tornaram possível a eliminação da duplicidade desnecessária de trabalho com animais.

Apesar de notarmos um aumento na utilização de animais na pesquisa básica a partir do ano 2000 (*e.g.* desenvolvimento de animais geneticamente modificados –GM), percebemos, a partir da mesma época, uma diminuição do número de animais utilizados em pesquisa aplicada (*e.g.* análises toxicológicas), em decorrência principalmente de benefícios oferecidos pelo governo às indústrias para a implementação da filosofia dos 3 R's (HUDSON, 2007).

### **1.3 Exemplos de aplicações da regra dos 3R's no controle da qualidade de produtos sujeitos à Vigilância Sanitária**

Além de tentar validar novos métodos, cabe a comunidade científica o bom senso de excluir de seus compêndios oficiais metodologias obsoletas, que pouco contribuam no fornecimento de dados relevantes para a ciência e que utilizem um grande número de animais ou provoquem dor, angústia ou sofrimento aos mesmos. Um exemplo desta conduta é a exclusão do método de dose letal 50% (DL<sub>50</sub>) em 2001, da Directiva 67/548/EEC e das *guidelines* da OECD.

Alguns métodos alternativos recentemente validados podem substituir por completo o uso de animais (*e.g.* modelos de pele reconstituída para avaliação da irritabilidade dérmica induzida por xenobióticos e testes *in vitro* para detecção da presença de contaminantes pirogênicos em imunobiológicos, fármacos, parenterais de grande volume etc). Em outras situações, a substituição plena ainda não é possível. No entanto, é

importante destacar que toda pesquisa na área de métodos alternativos é válida e recomendada pelas agências de validação internacionais, havendo diversos exemplos de estudos que geraram importantes contribuições em termos de refinamento das técnicas e/ou redução do número de animais por desfecho toxicológico avaliado (ALVES & COLLI, 2006).

Para alguns desfechos, embora permaneça a situação de utilização de animais de laboratório, alcançou-se importante grau de refinamento na técnica previamente preconizado. Como exemplo podemos citar o ensaio do linfonodo local murino (LLNA, da sigla em inglês *Local Lymph Node Assay*), que é realizado em camundongos e se baseia na resposta imune celular (*i.e.* na ativação e proliferação específica de linfócitos) que é característica da fase de indução (1ª fase) do processo de hipersensibilidade dérmica. Das vantagens deste teste em relação aos seus precursores, listam-se: *i.* o parâmetro final analisado é quantitativo (incorporação de <sup>3</sup>H-timidina), *ii.* o teste se passa na fase de indução, e por isso tem a duração de 5 dias, enquanto os ensaios anteriores duravam em média 35 dias, *iii.* características referentes a natureza da substância, tal como cor, não interferem com desfecho do teste, *iv.* o número de animais utilizados por substância-teste é cerca de 50% menor do que nos testes mais antigos, e por fim, *v.* os animais são poupados da dor e do desconforto decorrentes das reações de fase 2 (processo inflamatório) (BASKETEER *et al.*, 2007; BASKETEER & KIMBER, 2007).

Um outro bom exemplo da aplicação da regra dos 3R's no laboratório de controle da qualidade é o uso dos métodos *in vitro* para avaliação da potência de imunobiológicos de uso humano. A potência dos componentes diftérico e tetânico, presentes em vacinas como DTP, DT, dT e DTP acelular, por exemplo, é determinada a partir de um teste de duas etapas (imunização e soroneutralização) que utiliza cobaias e/ou camundongos. A etapa de soroneutralização é a que envolve maior número de animais, cerca de 80 a 90% do total utilizado no ensaio. Alguns métodos alternativos foram propostos a fim de substituir os animais utilizados na etapa de soroneutralização. Destaca-se, neste contexto, o recém validado teste de inibição de ligação da toxina (ToBI) realizado *in vitro* (ESAC/ECVAM, 2000). Assim, mesmo que permanecendo a necessidade de animais na etapa de imunização, a implementação de ensaios *in vitro* para avaliação da soroneutralização permite uma redução significativa do número de animais utilizados (*i.e.* cerca de 70 animais por lote de cada produto analisado).



Nas circunstâncias em que o teste em animais não possa ser substituído por um único método alternativo (o que parece hoje ser a situação para o teste de irritação ocular de Draize), o desenvolvimento de esquema de avaliação que envolva uma bateria de testes deve ser levado em consideração, podendo também ser desenvolvido um sistema hierárquico no qual os animais somente sejam utilizados para a confirmação da ausência de toxicidade, reduzindo ao máximo o risco desses animais sofrerem quaisquer efeitos tóxicos (Figura 2). Desta forma, é de enorme relevância a busca por novas metodologias que possam compor tal esquema de avaliação.

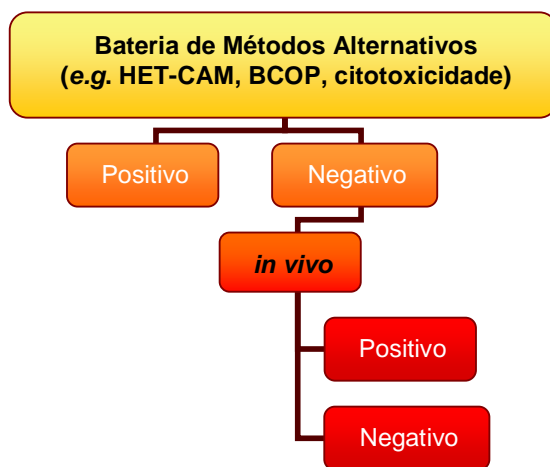


Figura 2: Exemplo de bateria de métodos alternativos propostos para avaliação da irritação ocular.

#### **1.4 Da origem do Teste de Draize à proibição do uso de animais no processo de avaliação de segurança de produtos cosméticos**

Até meados do século XX, mesmo em países europeus e nos Estados Unidos, não era incomum a comercialização de uma diversidade de produtos que, além de não serem testados quanto a sua eficácia, colocavam em risco a saúde de seus consumidores. A necessidade de um maior controle por parte das agências regulatórias internacionais foi tornando-se evidente, conforme denúncias sobre agravos à saúde associados à utilização de determinados produtos foram tornando-se públicas. Foi exatamente neste contexto que surgiu, em meados da década de 1940, o teste de irritação ocular de Draize (DRAIZE *et al.*, 1944).

Seguem abaixo alguns exemplos de marcos históricos relacionados à utilização inadequada de produtos que ganharam o mercado sem antes terem sido devidamente avaliados sob o ponto de vista toxicológico, deixando assim vítimas, como veremos a seguir:

##### **Elixir de Sulfanilamida:**

O primeiro, ou pelo menos um dos primeiros registros, sobre o surgimento de efeitos adversos associados ao consumo de medicamentos ocorreu no final da década de 1930, mais especificamente em 1937, em um episódio que ficou conhecido como a Tragédia do Elixir de Sulfanilamida. O Elixir de Sulfanilamida foi considerado à época um promissor agente anti-infeccioso, tendo sido desenvolvido principalmente para uso pediátrico, no combate às infecções de garganta. Após a ingestão do Elixir, observou-se o aparecimento de manifestações clínicas típicas dos quadros de falência renal aguda que, como se sabe hoje, se deu devido ao alto teor de dietilenoglicol contido em sua formulação (solução de sulfanilamida em uma mistura aquosa contendo 72% de dietilenoglicol). Os sintomas incluíam náuseas, vertigens, oligúria e anorexia e levaram à morte de cerca de 105 norte-americanos, a maioria crianças. Dentre as vítimas do Elixir de Sulfanilamida, destaca-se a morte do farmacêutico responsável pela formulação, que ao perceber a dimensão da tragédia, suicidou-se ainda em 1937 (BALLENTINE, 1981).

Este trágico episódio fez com que já no ano seguinte, as autoridades americanas competentes publicassem a primeira Lei Federal voltada para a garantia de segurança de Alimentos, Medicamentos e Cosméticos (*Food, Drug and Cosmetics Act*, 1938).

### **Radithor:**

Preconizado como terapia fortificante, o *Radithor*® era comercializado pela Bailey Radium Laboratories de New Jersey na década de 1930. O fabricante - na tentativa de provar a eficácia do produto em questão - garantia que em cada frasco de *Radithor*® havia pelo menos 1 microcurie de Ra-226 e/ou Ra-228. Como parte da campanha publicitária, o laboratório Bailey Radium usava frases de impacto do tipo: “*terapia absolutamente segura, em todos os aspectos*”, e desafiava o público, oferecendo U\$1.000,00 a qualquer indivíduo capaz de provar que o produto contivesse quantidade menor de Radio do que a anunciada.

Pelo menos uma morte foi comprovadamente relacionada à terapia a base de Ra, entre 100 indivíduos acometidos pelos efeitos adversos desta terapia, que incluíam queda generalizada de pêlos e dentes, enfraquecimento ósseo, insuficiência renal e da medula óssea, entre outros sintomas (MACKLIS, 1990).

### **Talidomida:**

Foi desenvolvida pela indústria alemã *Chemie Grünenthal* e introduzida no mercado europeu em meados da década de 1950 como um potente e seguro medicamento sedativo/hipnótico, com o nome comercial de *Contergan*®. A talidomida foi lançada através de um marketing agressivo. Um dos motes da campanha da nova droga era: “*tão segura, que seria impossível alguém ter êxito em tentativas de suicídio com a talidomida*”. De fato, sob o ponto de vista de sua toxicidade aguda, a talidomida não representa risco importante. No entanto, como se observou poucos anos após o início de sua comercialização, a talidomida apresenta potente ação teratogênica, induzindo malformações específicas, tais como focomelia e amelia quando ingerida entre a 6<sup>a</sup> e a 7<sup>a</sup> semana de gravidez. O aumento da incidência destas graves malformações, até aquele momento bastante raras, e que chamam à atenção logo ao nascimento, possibilitou o

pronto estabelecimento da relação causal entre a ingestão na talidomida no primeiro trimestre de gestação e o nascimento de crianças malformadas. Na Alemanha e na Austrália constatou-se de forma independente, que as mães de crianças com estas anomalias apresentavam em comum o fato de terem feito uso da talidomida no primeiro trimestre de gravidez. Assim, em 1961, o *Contergan*<sup>®</sup> foi retirada do mercado. Estima-se que ao redor do mundo a talidomida tenha feito cerca de 10.000 vítimas (TRUETA, 1962).

A lista de produtos, cuja comercialização levou a severos danos à saúde da população em geral, não era restrita aos medicamentos. Produtos cosméticos foram igualmente responsáveis pelo surgimento de sérios efeitos adversos, como veremos a seguir:

#### **Linha de cosméticos *Lash Lure*<sup>®</sup>:**

Cosméticos da linha *Lash Lure*<sup>®</sup> eram aplicados em salões de beleza da época e se apresentavam como corantes permanentes para cílios e sobrancelhas. Continham em sua formulação parafenileno de amina, substância com alto potencial dermo-sensibilizante, que causou severa alteração - geralmente bilateral - de córnea em mulheres que fizeram uso destes produtos semanas após tê-los aplicado. Estima-se que os produtos da Linha *Lash Lure*<sup>®</sup> tenham deixado pelo menos 12 mulheres cegas e causado a morte de uma pessoa na década de 1930 nos EUA (WILHELMUS, 2001). O FDA divulgou o caso, com cartazes como o ilustrado na Figura 3, alertando a população para o risco associado ao uso do produto.



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

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

Fonte: <http://www.fda.gov/oc/history/historyoffda/section2.html> (acessado em 28/Fevereiro/2008).

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

No final da década de 1930 eram tantos os casos de agravos à saúde e óbitos induzidos por produtos de uso comum nos EUA, que coleções conhecidas como “*The American Chamber of Horrors: the truth about food and drugs*”, organizada pela FDA – “*Food and Drug Administration*”, e o best-seller americano “*100.000.000 Guinea pigs: dangers in everyday foods, drugs, and cosmetics*” (Figura 4) foram publicadas com a finalidade de alertar a opinião pública para tal fato (Calver, 1936). Estes registros

culminaram na publicação, do “*The Federal Food, Drug, and Cosmetic Act*”, uma importante lei que pela primeira vez na história regulamentou os produtos cosméticos e trouxe inovações para o campo de medicamentos, como por exemplo, a exigência de comprovação de eficácia/segurança de novos produtos numa etapa prévia a comercialização.

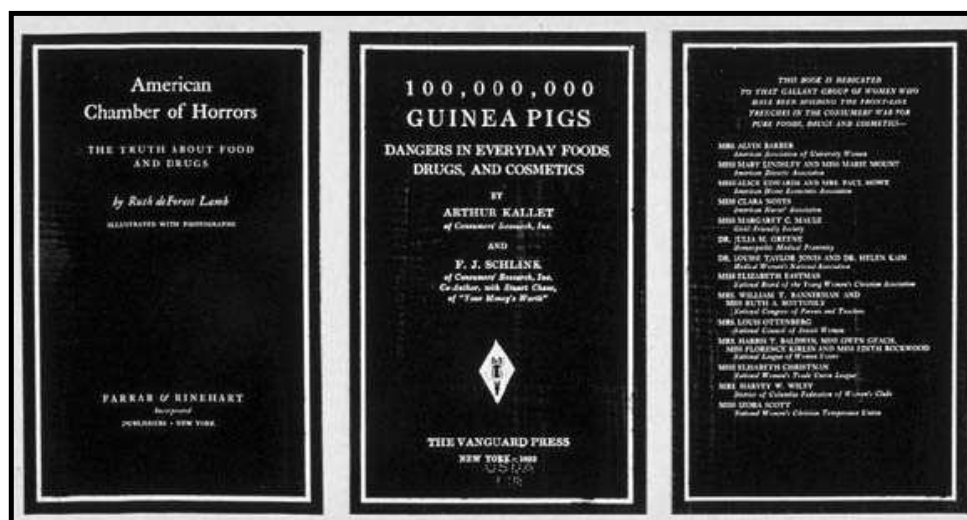


Figura 4: Publicações da década de 1930 com registros dos agravos à saúde induzidos por produtos de uso comum, tais como medicamentos, alimentos e cosméticos.

Fonte: [http://www.fda.gov/oc/history/slideshow/Slide\\_158.html](http://www.fda.gov/oc/history/slideshow/Slide_158.html) (acessado em 28/Fevereiro/2008)

Como mencionado anteriormente, o teste de irritação ocular de Draize surgiu exatamente neste momento de crise do sistema de saúde pública americano, como fruto da necessidade detectada pelos órgãos regulatórios competentes de se controlar adequadamente aspectos relacionados à segurança de produtos cosméticos, antes mesmo, destes ganharem o mercado consumidor (KURIAN,1998). O teste foi desenvolvido em 1944 pelo farmacologista John H. Draize (Figura 5) do FDA e seus colaboradores, com o propósito de se avaliar o potencial tóxico de produtos que pudessem vir a entrar em contato com o olho humano.

O teste de irritação ocular de Draize foi preconizado durante muito tempo como procedimento padrão universal para avaliação da irritação ocular e o potencial de risco de substâncias químicas manufaturadas em vários tipos de indústrias (*e.g.* cosméticos, fármacos, produtos de uso agrícola e domissanitários, entre outros), como mostra o Quadro 2. Ao longo dos anos, desde sua criação, o teste sofreu diversas alterações. Algumas versões modificadas do teste foram apresentadas pela comunidade científica (DRAIZE *et al.*, 1944; DRAIZE, 1959; KAY & CALANDRA, 1962; DASTON & FREEBERG, 1991; CHAMBERS *et al.*, 1993 e CHAN & HAYES, 1994) e diversos protocolos foram objeto de discussão em fóruns técnico-científicos no mundo todo (WILHELMUS, 2001).



Figura 5: John H. Draize, farmacologista do FDA que desenvolveu o teste de irritação ocular de Draize em 1944.

Fonte: Wilhelmus 2001

**Quadro 2: Legislações internacionais e a preconização do teste de irritação ocular de Draize.**

<b>Legislação/ano da primeira versão</b>	<b>Agência regulatória</b>	<b>Produto</b>
<i>Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act / 1947 e Federal Environmental Pesticide Control Act / 1972</i>	EPA*	Pesticidas
<i>Federal Hazardous Substances Act /1964 e Toxic Substances Control Act / 1977</i>	EPA*	Químicos de uso agrícola e industrial
Occupational Safety and Health Act / 1970	OSHA**	Produtos que oferecem risco ocupacional
Consumer Product Safety Act / 1972	CPSC#	Produtos de uso doméstico
<i>Hazardous Materials Transportation Act / 1974</i>	RSPA##	Químicos transportados comercialmente
<i>Clean Air Act Amendment/ 1990</i>	CSHHIB*	Produtos que oferecem risco ambiental
<i>OECD Guidelines for testing of chemicals / 2002</i>	OECD**	Substâncias químicas em geral

\*EPA: Environmental Protection Agency.

\*\* OSHA: Occupational Safety and Health Administration.

# CPSC: Consumer Product Safety Commission

##RSPA: *Research and Special Programs Administration*

\*: CSHHIB: Chemical Safety and Hazard Investigation Board

\*\* :OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development



Hoje, apesar das duras críticas e de existirem controvérsias quanto à validade de seus resultados, o teste de irritação ocular de Draize permanece preconizado em diretrizes internacionais para avaliação de segurança de substâncias químicas (OECD, 2002) e é o único teste aceito pela entidade regulatória brasileira, *i.e.* ANVISA, para a avaliação do efeito irritante ocular de produtos sujeitos à ação da Vigilância Sanitária.

Na questão específica do controle da qualidade de cosméticos, esta situação gera um importante impasse, que dificulta enormemente a exportação de nossos produtos para outros países. Isto porque, enquanto o Brasil exige a comprovação de segurança de cosméticos através de testes *in vivo*, a Europa já proíbe desde 2004 a comercialização de **produtos acabados** testados em animais e estabelece novos prazos de proibição do uso de animais na avaliação de segurança de **ingredientes isolados** (*e.g.* tensoativos) utilizados em cosméticos em países membros da Comunidade Econômica Européia (DIRECTIVA 2003/15/EEC), conforme demonstrado no Quadro 3.

**Quadro 3:** Prazos estimados - segundo a Directiva 2003/15/EEC - para a proibição definitiva do uso de animais na avaliação de alguns desfechos toxicológicos comumente investigados pela indústria de cosméticos.

Desfechos toxicológicos	Prazos estimados			
	Proibição definitiva do uso de animais	Proibição definitiva da comercialização de produtos testados por ensaio <i>in vivo</i>	Validação final de ensaios alternativos ao uso de animais	Substituição plena do uso de animais na CEE
Corrosividade cutânea	2009	2009	Já validado	B40 Anexo V Directiva 67/548/EEC, e TG430 e TG 431 da OECD
Efeitos tóxicos induzidos pela UV: fototoxicidade aguda	2009	2009	Já validado	B41 Anexo V Directiva 67/548/EEC, e TG432 da OECD
Absorção/penetração Dérmica	2009	2009	Já validado (2005)	TG428 da OECD
Irritação Dérmica	2009	2009	Já validado (2007)	2008
Irritação Ocular	2009	2009	2008	2009

Fonte: Commission Staff Working Document (Commission of the European Communities), Brussels, 2004

### 1.5 Métodos alternativos ao Teste de irritação ocular de Draize

Embora o teste de irritação ocular de Draize cause grande desconforto e sofrimento aos animais e tenha sido, por esta razão, um dos primeiros testes usados para fins regulatórios pelo qual se procurou abordagens alternativas (PRESGRAVE, 2002), ele permanece na condição de ensaio cujas alternativas ainda não foram plenamente validadas (Quadro 3). Muitos métodos válidos vêm sendo pesquisados (Quadro 4), entre eles: 1.

HET-CAM - membrana cório-alantóide de ovo embrionado de galinha (LUPKE *et al.*, 1985); 2. células 3T3 com NRU - captação de vermelho neutro (VIAN *et al.*, 1995) e MTT – captação de MTT ou ensaio da atividade metabólica mitocondrial (CHIBA *et al.*, 1999); 3. RBC - *red blood cell assay* (PAPE *et al.*, 1999); 4. BCOP - opacidade e permeabilidade de córnea de bovinos (BURDICK *et al.*, 2002); 5. ICE - olho de galinha isolado (BURTON *et al.*, 1981); e 6. IRE - olho de coelho isolado (De TORRES *et al.*, 1997).

Através deste conjunto de métodos *in vitro* agrupam-se informações que oferecem subsídios para garantir a segurança do produto ao nível ocular. Como há mais de um mecanismo indutor de irritação ocular, apenas um ensaio *in vitro* não é suficiente para uma completa avaliação. O ideal é obtermos dados relacionados à vascularização (*e.g.* HET-CAM), opacidade/permeabilização (*e.g.* BCOP) e citotoxicidade (*e.g.* MTT, RBC).

É importante ressaltar que vários destes testes vêm sendo utilizados na avaliação do risco irritativo de ingredientes isolados. Entretanto, como nenhum deles está plenamente validado até o presente momento, os modelos citados acima só podem ser contemplados como modelos experimentais de “triagem”, ou seja, de caráter preliminar.

Quadro 4: Principais testes alternativos usados na avaliação da toxicidade ocular.

<b>ÓRGÃO ISOLADO</b>	BCOP – Opacidade e permeabilidade de Córnea Bovina.
	ICE – Olho Isolado de Galinha – Avalia edema corneal, opacidade corneal e retenção de fluoresceína.
<b>CULTURA DE CÉLULAS</b>	NRU – mede a atividade de retenção do corante vermelho neutro pelos lisossomos de células viáveis ( <i>e.g.</i> SIRC e 3T3).
	MTT – avalia a metabolização de sais de tetrazolium por mitocôndrias de células viáveis ( <i>e.g.</i> SIRC e 3T3).
	AGAROSE DIFFUSION METHOD – realizado em células L929 e avalia a morte celular.
	FLUORESCEIN LEAKAGE - realizado em células MDCK (rins de cão) e avalia injúrias causadas às junções celulares.
	EPIOCULAR – epitélio ocular humano reconstituído – avalia a viabilidade celular, liberação de mediadores inflamatórios e permeabilidade celular.
<b>OVO EMBRIONADO</b>	HET-CAM – teste realizado em membrana cório-alantóide de ovo embrionado de galinha. Avalia danos na membrana cório-alantóide.
	CAM – TBS – OVO DE GALINHA – método quantitativo com corante Azul de Tripán. Avalia danos na membrana cório-alantóide. Hiperemia, Hemorragia e Coagulação.
<b>SANGUE DE MAMÍFEROS</b>	RBC – teste de hemólise – utiliza amostras de sangue bovino. Avalia danos causados à membrana citoplasmática em combinação com danos às proteínas celulares (desnaturação).

A seguir, serão apresentadas breves informações sobre os ensaios mais freqüentemente utilizados para a avaliação *in vitro* da toxicidade ocular (e.g. na avaliação do potencial irritante de xampus, sabonetes líquidos e outros produtos de higiene pessoal, além da avaliação de ingredientes isolados).

#### **HET-CAM (membrana corio-alantóide de ovo embrionado de galinha)**

O objetivo do ensaio HET-CAM é avaliar semi-quantitativamente o potencial irritante de um produto (produtos solúveis, emulsões, géis e óleos), sobre a membrana cório-alantóide de ovo embrionado de galinha, no décimo dia de incubação. O ensaio é baseado na observação dos efeitos irritantes durante 5 minutos após a aplicação do produto, puro ou diluído, sobre a membrana cório-alantóide. A avaliação final é feita a partir de uma escala que considera cada fenômeno observado (hiperemia, hemorragia e coagulação) em função do seu tempo de aparecimento (LIEBSCH & SPIELMANN, 2002).

O método apresenta praticidade de execução, demonstra boa sensibilidade e não requer recursos financeiros altos (LUEPKE, 1985). Porém, como desvantagem, o método não apresenta boa predição do potencial irritante ocular para produtos opacos ou coloridos, pois dificulta a visualização dos efeitos hemodinâmicos ocorridos na membrana cório-alantóide (VINARDELL & MITJANS, 2006)

#### **RBC - Red Blood Cell System**

Este ensaio permite quantificar os efeitos adversos de ingredientes isolados e de produtos acabados sobre a membrana plasmática das hemácias e a conseqüente liberação da hemoglobina (hemólise) e ainda, o índice de desnaturação da hemoglobina, avaliado através de sua forma oxidada, ambos quantificados por espectrofotometria. A relação entre a hemólise e oxidação da hemoglobina fornece um parâmetro de caracterização dos efeitos dessas substâncias *in vitro* (ALVES, 2003).

O teste RBC vem se mostrando bastante útil na avaliação do potencial irritante de tensoativos, gerando resultados confiáveis e reprodutíveis em estudos intra e inter laboratoriais (PAPE *et al.*, 1999; MEHLING *et al.*, 2007)

### **BCOP (Opacidade e Permeabilidade de córnea bovina)**

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

A medida da opacificação da córnea é realizada com o auxílio de um opacitômetro, aparelho que determina a transmissão do fluxo luminoso através da córnea a ser avaliada e fixando um valor numérico de opacidade. Já a medida da permeabilidade da córnea é realizada em função do tempo de contato do produto com o olho, após adição de fluoresceína. A densidade óptica é medida em 490nm. Obtém-se uma escala que considera os fenômenos observados (ANVISA, 2003)

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

### **Citotoxicidade pela difusão em gel de agarose**

Indicado para emulsões e géis com fase contínua aquosa. Aplica-se os produtos à superfície de um gel de agarose em contato com células de tecido conjuntivo de camundongo da linhagem NCTC – clone L929 (ATCC CCL1) onde, a citotoxicidade é avaliada com a ajuda de um corante vital, o MTT ou o NRU, observando-se o diâmetro médio do halo de lise celular revelado pela coloração. O halo reflete a citotoxicidade de um produto testado e a sua capacidade em se difundir no gel de agarose (ANVISA, 2003).

### **Citotoxicidade pelo método MTT**

Utiliza-se cultura de células, como *e.g.* a SIRC (linhagem celular derivada da córnea do coelho) ou outras, adicionadas do corante vital MTT [ou 3-(4,5 dimethyl thiazole-2yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide]. Este método mede a atividade mitocondrial das células viáveis em metabolizar sais de tetrazolium. O parâmetro final de avaliação é o estabelecimento da IC<sub>50</sub> (*i.e.* a concentração da substância-teste que inibe 50% do crescimento celular). Não aplicável a produtos insolúveis em água (ANVISA, 2003).

### **Citotoxicidade pela método NRU**

Assim como no método de citotoxicidade com MTT, neste ensaio utiliza-se cultura de células adicionada de um corante vital, *i.e.* o NR (ou seja, o corante vermelho neutro). O método mede a atividade de retenção do corante pelos lisossomas das células viáveis. A captação do NR pelas células viáveis é quantificada por espectrofotometria, através de um leitor automático de microplacas. O parâmetro final de avaliação também é o estabelecimento da IC<sub>50</sub> (*i.e.* concentração da substância-teste que inibe 50% do crescimento celular). Este método é empregado para todo tipo de formulação, exceto aquelas que possuam propriedades fixadoras, como as formulações alcoólicas (ANVISA, 2003), pois a avaliação da acurácia de álcoois, ácidos fortes e substâncias alcalinas fica dificultada (TANI *et al.*, 1999).

## **1.6 Ensaio de citotoxicidade**

Os ensaios de citotoxicidade têm sido os métodos *in vitro* mais estudados como possíveis alternativas ao teste de irritação ocular de Draize (VIAN *et al.*, 1995; GUILLOT, 1992; RENZI *et al.*, 1993; EUN & SUH, 2000; LAGARTO *et al.*, 2005).

Sabe-se que linhagens celulares quando mantidas em cultura dividem-se e multiplicam-se continuamente. A base dos ensaios de citotoxicidade está exatamente na avaliação da interferência induzida por agentes químicos (*e.g.* tensoativos) nos processos

metabólicos celulares e na investigação a respeito da maneira em que esses processos podem vir a intervir no crescimento/multiplicação celular, ou até mesmo culminar na morte celular, reduzindo, assim o número de células viáveis se comparado com culturas controles não-tratadas. Estes ensaios tendem a simplificar os eventos quantificados, contudo, por serem métodos simples, de baixo custo e reprodutíveis são extensamente empregados em processos de triagem (FRESHNEY, 1994).

Os testes realizados para a medição da viabilidade celular e integridade da membrana citoplasmática (como o NRU, o MTT, o teste de liberação de enzimas citoplasmáticas como a lactato desidrogenase (LDH) ou RBC) têm apresentado uma boa correlação com o potencial de irritação ocular *in vivo* (YANG & ACOSTA, 1994; EUN & SUH., 2000, VIAN *et al.*, 1995; SPIELMANN, 1996; RENZI *et al.*, 1993; GEURTSEN, 1998, DICKSON, 1993; COSTA, 2006; DEBBASCH *et al.*, 2005; HARBELL *et al.*, 1997). Dentre os desfechos que fornecem informações sobre diferentes funções celulares, aqueles que utilizam estimativas quantitativas sobre funções metabólicas (como *e.g.* o NRU e MTT) são os mais usados. Apesar destes ensaios apresentarem vantagens como precisão e serem sujeitos a automação, eles são extremamente dependentes de possíveis alterações fisiológicas celulares, como alterações nas atividades lisossomal (NRU) e mitocondrial (MTT). Estes parâmetros são dependentes das condições da cultura celular, que podem ser modificados por aspectos como densidade celular e secreção celular. Conseqüentemente, somente células crescendo em condições similares podem ser comparadas por estes métodos (MARGIS & BOROJEVICH, 1989).

### **1.7 Ensaio da Quantificação de Proteínas Totais (QPT)**

A metodologia do teste de quantificação de proteínas totais foi descrita em 1986 por Knox e colaboradores. Desde aquela época até os dias de hoje, a metodologia vem sendo refinada e modificada para a utilização de placa com 96 orifícios (CLOTHIER, 1995), além da utilização de esquema de lavagem automatizado de microplacas, conferindo uma maior rapidez e praticidade durante o ensaio (COSTA, 2006).

O método avalia a taxa de crescimento celular através da determinação colorimétrica da quantificação de proteínas totais contidas em cultura celular (SHOPSIS &



ENG, 1985 E VIAN *et al.*, 1995). Assim, o ensaio tem como desfecho final a avaliação do efeito de uma determinada substância sobre o crescimento/proliferação celular, ou seja, o grau de inibição do crescimento celular provocado pela substância em questão fornece um indicativo de sua toxicidade (KNOX *et al.*, 1986; CLOTHIER, 1995).

Apesar de apresentar algumas limitações (*i.* quantifica as células indiretamente, ou seja, de forma relativa à quantidade de proteínas totais e *ii.* os resultados obtidos são dependentes do tipo celular utilizado (EUN & SUH, 2000); este teste é considerado rápido, sensível, reprodutível, possui simplicidade de execução, custo relativamente baixo, requer reagentes com baixa toxicidade, é sujeito a automação e não é tão dependente das modificações fisiológicas celulares como os ensaios de viabilidade através da avaliação do metabolismo celular (SHOPSIS, 1985; KNOX *et al.*, 1986; MARGIS & BOROJEVICH, 1989).

Este método baseia-se na adsorção, eluição e medição de densidade ótica (D.O.) do corante Azul Brilhante de Coomassie (CBB-R250) que cora as proteínas celulares. Há uma relação linear entre o teor de proteínas totais dosadas e o número de células existente na cultura. Os tensoativos existentes na composição dos xampus e condicionadores apresentam ação citolítica sobre a cultura celular. A quantificação do teor de proteínas totais, é realizada após a lavagem das placas e a fixação das células que permaneceram vivas e aderidas após o contato com a substância-teste. Esta metodologia apresenta ainda a vantagem da possibilidade de se estocar as placas para um processamento posterior, além da possibilidade da realização de repetições do ensaio utilizando as mesmas microplacas.

Assim sendo, o método indireto pode ser usado nas mais diversas metodologias, onde a quantificação celular é requerida (MARGIS & BOROJEVICH, 1989). Portanto, é possível utilizá-lo na avaliação da citotoxicidade de compostos, avaliando diferentes doses, produtos e tratamentos aos quais a monocamada celular for submetida. Além disso, o método possibilita o uso de microplacas de 96 cavidades, permitindo a avaliação simultânea de um maior número de diluições e a utilização de lavadores e leitores automáticos de microplacas, agilizando o processo metodológico (SHOPSIS, 1985; RENZI *et al.*, 1993). Por todas as razões citadas acima, este foi o método de escolha para o presente estudo.

### **1.7.1 Células 3T3**

As células 3T3 (Figura 6) são provenientes de uma linhagem celular estabelecida em 1962 por dois cientistas - George Todaro e Howard Green - do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Nova York. Todaro e Green obtiveram as células 3T3 de tecido de embrião de camundongo suíço albino (TODARO & GREEN, 1963). A designação “3T3” se refere ao fato de que esta linhagem celular cresceu originalmente em uma concentração de  $3 \times 10^5$  células por  $\text{cm}^2$  (primeiro “3”), com um intervalo de transferência (“T”) de 3 dias (segundo “3”).

Na década de 1950, Dulbelco e Vogt publicaram importantes artigos (GREEN, 2006) demonstrando que fibroblastos recentemente retirados de animais e cultivados por curtos períodos de tempo poderiam ser transformados pela infecção por poliomavírus. Porém, o pesquisador Howard Green na tentativa de reprodução dos resultados obtidos por Dulbelco e Vogt, encontrou dificuldades na utilização de culturas primárias ou secundárias de fibroblastos, pelo fato de serem estas, culturas bastante heterogêneas, o que dificultava a reprodutibilidade do ensaio. Dessa forma, ficava clara a necessidade do desenvolvimento de culturas celulares mais homogêneas, pois somente uma linhagem celular imortalizada (estabelecida) capaz de realizar propagação indefinida se prestaria de forma adequada à reprodutibilidade destes ensaios (GREEN, 2006).



Figura 6: Células 3T3

**Fonte:** [www.answers.com/topic/3t3-cells](http://www.answers.com/topic/3t3-cells) - acessado em 07/03/2008

Muitas linhagens celulares foram testadas, porém nenhuma apresentava as características desejadas (GREEN, 2006). Assim, como mencionado anteriormente, na década de 1960, George Todaro e Howard Green iniciaram seus trabalhos cultivando fibroblasto embrionado de camundongo, com o objetivo de estabelecer uma linhagem celular imortalizada que atendesse adequadamente às necessidades da pesquisa de transformação celular ocasionada pelo poliomavírus. Assim, percebeu-se que diferentemente da linhagem celular proveniente de fibroblastos humanos, a linhagem celular de fibroblastos proveniente de embrião de camundongo possui uma maior capacidade de se manter estável, mesmo em um alto número de passagens (TODARO & GREEN, 1963)

A 3T3 foi escolhida para o presente estudo por apresentar facilidade de obtenção, manutenção e manipulação, além do fato de que esta possui a capacidade de se manter estável mesmo após muitas passagens, o que facilita o trabalho, nos fornecendo resultados mais confiáveis. Além disso, esta linhagem celular é largamente utilizada em outros

ensaios de avaliação da citotoxicidade (GEURTSSEN, *et al.*, 1998; SPILEMANN, *et al.*, 1996; DICKSON, 1996; WILLSHAW *et al.*, 1994; COSTA, 2006; VIAN *et al.*, 1995; KNOX *et al.*, 1986; CLOTHIER *et al.*, 1988; CLOTHIER *et al.*, 1992; CLOTHIER *et al.*, 2006 ) induzida por produtos e ingredientes de cosméticos (*e.g.* MTT e NRU), o que permite a comparação dos resultados obtidos no presente estudo com os descritos na literatura.

### **1.8 Justificativa**

O ensaio de QPT apresenta características importantes, como rapidez, simplicidade de execução, baixo custo, alto grau de automação; além de não ser tão dependente das modificações fisiológicas celulares como outros ensaios de viabilidade através da avaliação do metabolismo celular (MARGIS & BOROJEVICH, 1989; KNOX *et al.*, 1986; SHOPSIS & ENG, 1985). Vale ressaltar que o método proposto requer reagentes de baixa toxicidade, *e.g.* o corante azul brilhante de comassie, que é sabidamente menos tóxico que os corantes NR e MTT. Além disso, resultados recentes obtidos pelo nosso grupo demonstraram que o ensaio de QPT em células SIRC apresenta resultados promissores, quando comparados aos resultados obtidos pelo teste de irritação ocular de Draize (COSTA, 2006).

Acreditamos ser importante avaliar de forma consistente a aplicabilidade do ensaio de QPT em outra linhagem celular (3T3), investigando o potencial deste ensaio como método *in vitro* para a avaliação do potencial irritante ocular de produtos sujeitos a ação da Vigilância Sanitária. Os estudos existentes sobre o ensaio proposto, utilizando a mesma linhagem celular (3T3) e o mesmo corante (azul brilhante de Coomassie) (*e.g.* VIAN *et al.*, 1995; CLOTHIER *et al.*, 1988; CLOTHIER *et al.*, 2006) avaliam somente ingredientes isolados (*i.e.* tensoativos). Pretendemos, com nossa investigação, avaliar tensoativos e produtos acabados (*i.e.* xampus e condicionadores), onde se concentram as análises realizadas pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS).

Assim, o presente trabalho se propõe a contribuir com uma maior compreensão da aplicabilidade deste método de citotoxicidade, utilizando nova linhagem celular, através da quantificação de proteínas celulares totais na avaliação do potencial de irritação ocular de

tensoativos, xampus e condicionadores, como mais uma possível alternativa ao teste de irritação ocular de Draize.

## II. OBJETIVOS

---

### Objetivo Geral:

Avaliar os efeitos citotóxicos produzidos por tensoativos e produtos acabados (xampus e condicionadores) pelo ensaio QPT utilizando o corante Azul Brilhante de Comassie R-250 em células 3T3; comparando os resultados obtidos nesse ensaio com aqueles obtidos no teste de irritação ocular de Draize

### Objetivos Específicos:

- Avaliar a correlação existente entre achados macroscópicos em cada uma das estruturas oculares (córnea, íris e conjuntiva) estudadas no teste de irritação ocular de Draize e os resultados obtidos no ensaio QPT.
- Estabelecer um ponto de corte (*cut-off*) para a diferenciação de substâncias irritantes e não-irritantes e avaliar parâmetros como precisão, sensibilidade e especificidade do ensaio proposto em comparação com o teste de irritação ocular de Draize.
- Comparar os resultados finais do ensaio de QPT em células 3T3 com resultados previamente obtidos em nosso laboratório com células SIRC, correlacionando-os com os dados obtidos *in vivo* pelo teste de irritação ocular de Draize (banco de dados do Departamento de Farmacologia e Toxicologia – DFT do INCQS).

### III. MATERIAIS E MÉTODOS

---

#### 3.1 Produtos acabados e tensoativos

Os produtos acabados e tensoativos do presente estudo foram selecionados de modo a atender a dois critérios: *i.* produtos previamente analisados no teste *in vivo*<sup>1</sup>, e *ii.* contemplar todas as cinco categorias de classificações possíveis (*i.e.* NI: Não Irritante, IL: Irritante Leve, IM: Irritante Moderado, IS: Irritante Severo e IMax: Irritante Máximo) no teste de Draize (Tabela 1).

Foram avaliados tensoativos, xampus e condicionadores, de uso adulto e infantil, de marcas e formulações idênticas aos produtos testados anteriormente pela equipe do DFT no ensaio *in vivo* e no teste *in vitro* utilizando células SIRC (COSTA, 2006).

Os xampus infantis (N = 6), xampus de uso adulto (N = 6), condicionadores de uso infantil (N = 5) e condicionadores de uso adulto (N = 2) foram adquiridos em estabelecimentos comerciais no município do Rio de Janeiro no ano de 2006.

<sup>1</sup> Cabe ressaltar que todo o procedimento *in vivo* havia sido conduzido previamente pela equipe do Departamento de Farmacologia e Toxicologia (DFT) do INCQS. Assim, os resultados do teste de irritação ocular de Draize provêm de um banco de dados em *software* Microsoft Excel pertencente ao DFT.

Com relação aos fabricantes, podemos dizer que foram avaliados produtos acabados de 12 diferentes laboratórios, que receberam códigos conforme descrito na Tabela 1. No caso dos F1, F2, F3 e F4 avaliamos mais de uma marca produzida pelo mesmo fabricante. Assim, nossos produtos foram codificados, de modo a expressar o código do fabricante (F1 a F12) e a marca (M1, M2, M3 e M4).

Alguns exemplos que seguem abaixo ilustram o procedimento adotado para criar os códigos do presente estudo:

**F1M1:** O produto é proveniente do fabricante 1, sendo da marca 1 (a primeira marca testada proveniente do fabricante 1);

**F1M2:** O produto é proveniente do fabricante 1, sendo da marca 2 (a segunda marca testada proveniente do mesmo fabricante 1);

**F4M2:** O produto é proveniente do fabricante 4, sendo da marca 2 (a segunda marca testada proveniente do mesmo fabricante 4);

**F4M4:** O produto é proveniente do fabricante 4, sendo da marca 4 (a quarta marca testada proveniente do mesmo fabricante 4).



Tabela 1: Lista dos produtos avaliados: uso, classificação *in vivo*, fabricante, marca e composição.

Nº	Produto	Classificação <i>in vivo</i>	Lote	Fabricante	Código Final	Composição
1	Xampu Infantil	NI	10099 94	F1	F1M1	Aqua, PEG-150, pentaerythritol tetrastearate, disodium laureth sulfosuccinate, laureth sulfate, sodium lauroyl sarcosinate, sodium cocoamphoacetate, PEG-80 sorbitan laurate, avena sativa, kernel extract, parfu, dazolidinil, urea, iodopropynyl butylcarebamate, citric acid, tetrasodium EDTA
2	Xampu Infantil	MI	B304	F2	F2M1	Água, lauril éter sulfato de sódio, lauril-éter-8 sulfato de sódio, lauril éter sulfato de magnésio, lauril éter-8 sulfato de magnésio, oleiléter sulfato de magnésio, cocoanfodiacetato dissódico, palmato de glicerila hidrogenado etoxilado (200 OE), cocato de glicerila etoxilado (30 OE) CI 14700, CI 14005, metilparabeno sódico, DMDM hidrontoína, cocoato, de glicerila etoxilado (7 OE), poliquatérni-10, ricinoleamido, olamida, sufocinato dissódico edeato dissódico, fragrância, hexileno glicol, ácido tartárico
3	Xampu Infantil	LI	0437 B01	F3	F3M1	Água, cocoamidopropil betaína, PEG-80, laurat de sorbitano, tridecil éter sulfato de sódio, distearato de PEG-150, fragrância, poliquatérnio 10, ácido cítrico, EDTA tetrassódico, quatérnio 15, corante amarelo DeC n°10(cl47005) e corante laranja DeC n° 4(cl 15510)
4	Xampu Infantil	MI	50703	F4	F4M1	Lauril sulfato de sódio/lauriléter sulfossuccinato dissódico, cocoamidopropilabeaína, laurilglicosídeo, cocoamida DEA, cocoato de glicerina PEG-7, edeato dissódico, benzofenona-4, fenoxietanol/metil etil propil e butil parabenos, CL 16185, tretolamina, cloreto de sódio, extrato de calêndula, extrato de aloe Vera, água deionizada.

[Continuação da Tabela 1]

Nº	Produto	Classificação <i>in vivo</i>	Lote	Fabricante	Marca/ Código Final	Composição
5	Xampu Infantil	MI	60403	F4	F4M2	Edetato dissódico, benzofenona-4,2-bromo-2-2nitropropano-1, 3-diol, metilparabeno, lauriléter sulfato de sódio/lauril sulfossuccinato dissódico, cocoamidopropilbetaína, lauril glicosídeo, cocoamida DEA, fragrância, propilparabeno, cocoanato de glicerina PEG-7, CI 16255, trietanolamina, cloreto de sódio, água deionizada, pró milk
6	Xampu infantil	SI	3/10B	F5	F5M1	Água, lauril sulfato de sódio, lauret sulfosuccinato dosódico, cocoamidopropil betaína, DEA cocamida, dioleato de PEG -120 Metilglucosa, perfume, cloreto de sódio, EDTA tetrasódico, trietanolamina, poloxâmero 124, formaldeído. Metilcloroisotiazolinona, amarillo ácido 23 (CL 19140)
7	Cond. Infantil	NI	10008 8032	F3	F3M2	Cloreto de distearildimônio, álcool estearílico, laurato deorbitano PEG-80, hidroetilcelulose, álcool benzílico, EDTA tetrassódico, fragrância, ácido cítrico, corante amarelo DeC n°10 (cl 47005), corante laranja DeC n°4 (cl015510) e água
8	Cond. Infant.	NI	60502	F4	F4M3	Detato dissódico, cloreto de estrealcônio, propilenoglicol, metilparabeno, propilparabeno, álcool cetosteárfico, cetearret 20, éter dicaprílico, trietanolamina, CI 19140 CI 16255, fragrância, água deionizada, pró-milk
9	Cond. Infantil	NI	60101	F4	F4M4	Metilparabeno, propilparabeno, álcool cetosteárfico, cetearret-20, éter dicaprílico, edeato dissódico, cloreto estearalônio, trietolamina, CI 74160, ciclometicona/dimeticona, extrato de aloe Vera, extrato de calêndula, fragrância e água deionizada
10	Cond. Infant.	LI	0602	F6	F6M1	Álcool cetosteárfico, cloreto de cetiltrimetilamônio, cocoamidopropil betaína, dimeticona, mistura de isotiazolonas, extrato de calêndula, ácido cítrico, fragrância, CI 42090, água

[Continuação da Tabela 1]

Nº	Produto	Classificação <i>in vivo</i>	Lote	Fabricante	Código Final	Composição
11	Cond. Infant.	NI	10047 07	F1	F1M2	EDTA tetrassódico, ácido cítrico, anidro, álcool ceto estearílico etoxilado, diazolidinil uréia e iodopropinil butilcarbamato, metosulfato de betrimônio e álcool cetoestearílico, MÉS-acetomida, extrato natural de aveia, dimeticonol, essência e água desmineralizada.
12	Xampu Adulto	MI	61442 59804	F7	F7M1	Água, lauril éter sulfato de amônio, lauril sulfato de amônio, cloreto de sódio, cocamida MEA, perfume, citrato de sódio, EDTA dissódico, ácido cítrico, poliquatérnio-10, pantenol, éter pantenil etílico, xilenosulfonato de amônio, metilcloroisotiazolina, metilisotiazolina
13	Xampu Adulto	MI	50548 1	F8	F8M1	Água, lauril éter sulfato de sódio, cocoamidopropilbetaína, aquilpoliglicosídeo, alcanolamida do ácido graxo de coco, poliquatérnio 55, EDTA tetrassódico, quatérnio 70, mistura de extratos hidroglicólicos de acerola, maracujá, guaraná e uva associados com lipoproteínas de amêndoas, aminometilpropanol, cloreto de sódio, mistura e iotiazolonas, associação de cocoisotionato de sódio com ácido esteárico, álcool cetoestearílico, carbômero, cloreto de guar hidroxipropiltrimônio.
14	Xampu Adulto	MI	186/3	F9	F9M1	Água desmineralizada, lauril éter sulfato de sódio, cocoamidopropilbetaína, lauril éter sulfossuccinato de sódio, base perolizante, fragrância, extrato de jaborandi, goma Agar quaternizada, proteína de trigo hidrolizada, metilparabeno, propilparabeno, edetato dissódico, benzotriazol sulfonado, ácido láctico, isotiazolinas e corante.
15	Xampu Adulto	SI	03392 0s2p	F10	F10M1	Água, lauril éter sulfato de sódio, c-12-13 sulfato de sódio, diestearato de glicol, cocoamidopropil betaína, cloreto de sódio, perfume, carbomer, EDTA dissódico, goma guarquaternizada, formaldeído, dimeticonol, metoxicinamato de octila, hidroxipropil polisiloxano de proteína de trigo hidrolizada, ácido cítrico/hidróxido de sódio

[Continuação da Tabela 1]

N°	Produto	Classificação <i>in vivo</i>	Lote	Fabricante	Código Final	Composição
16	Xampu Adulto	SI	0437 B01	F11	F11M1	Lauril sulfato de sódio, cocoamidopropil betaína, cocoamido DEA, glicol distearato, cloreto de guar hidroxipropiltrimonium, hidroxietil uréia, dissodium EDTA, methylchloroisothiazoline/methylisothiazoline, coffea arábica/ethyl methoxycinnamate/ethylhexyl triazone/isodecyl neopentanoate/ciclodextrin., ácido cítrico, cloreto de sódio
17	Xampu Adulto	LI	36040 17	F12	F12M1	Água, lauril sulfato de sódio, EDTA tetrasódio, cocoamido propil betaína, extratos de flores e frutas (jasmim, girassol...), Lauril DEA, metilparabeno, propilparabeno, cloreto de sódio, ácido cítrico, metilclorothiazollione, metilsothiazoline, CI 15985.
18	Cond Adulto	LI	B582 927	F7	F7M2	Água, álcool cetearílico, cloreto de cetrimônio, álcool, perfume, pantenol, formaldeído, dimeticona, acetato de tocoferila, lactato de cetila, ácido cítrico, álcool cetílico
19	Cond. Adulto	NI	bC10 7	F2	F2M2	Água, álcool cetílico, PEG-180, hidroxietilcelulose, estearamidopropil dimetilamina, tridecet-12, dicloridrato de clorexidina, lanolina, amodimeticona, 2-oleamido-1,3-actadecanodiol, cloreto de cetrimônio, ésteres cetílicos, metilparabeno, ácido cítrico, amido de batata modificado, copoliol, laurimeticona, fragrância

Todos os tensoativos testados (N = 6) eram da marca Sigma<sup>®</sup>. Foram avaliados os seguintes tensoativos: Lauril Sulfato de Sódio, Triton X, Tween 20, Cloreto de Benzalcônio, Brometo de Cetildimetiletilamônio e Lauril Éter Sulfato de Sódio.

### 3.2 Ensaio *in vitro*

#### 3.2.1 Linhagem Celular

Linhagens 3T3 obtidas da “*American Type Tissue Collection*” (ATCC) mantidas no Setor de Cultura de Células (SCC) do Laboratório de Vacinas Virais do Departamento de Imunologia (DI) do INCQS.

#### 3.2.2 Soluções

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

###### Solução A

NaHPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O -	35,61 g
Água Deionizada <i>q.s.p</i> -	1000 ml

###### Solução B

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	27,6g
Água Deionizada <i>q.s.p</i>	1000 ml

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

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

Formaldeído 40 %	100ml
PBS 0,01 M <i>q.s.p</i>	1000ml
Estocar a 4° C	

##### **SDS 1% (Eluente):**

Dodecilsulfato de Sódio	10g
Água Deionizada <i>q.s.p</i>	1000ml
Estocar a temperatura ambiente	

**Azul Brilhante de Comassie 0,2% (corante):**

Azul Brilhante de Comassie R-250	0,2g
Ácido Acético Glacial	10ml
Metanol	40ml
Água Deionizada	<i>q.s.p.</i> 100ml

Filtrar e estocar a temperatura ambiente e ao abrigo da luz

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

Tripsina 1: 250	0,5g
EDTA	0,2g
NaCl	8,0g
KCl	0,4g
Dextrose	1,0g
NaHCO <sub>3</sub>	0,58g
Água deionizada <i>q.s.p.</i>	1000ml

Esterilizar por filtração em membrana de 0,22µm e estocar a -20° C

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

Bicarbonato de Sódio	7,5g
Água Deionizada <i>q.s.p.</i>	100ml

Esterilizar por filtração em membrana de 0,22µm e estocar a 4° C

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

Penicilina G Potássica	1.000.000 UI
Sulfato de Estreptomicina	1g
Água deionizada <i>q.s.p.</i>	100 ml

Esterilizar por filtração em membrana de 0,22 µm e estocar a – 20° C

**Solução de Glutamina 3%:**

L- Glutamina	3,0g
Água Deionizada <i>q.s.p.</i>	100ml

Esterilizar por filtração em membrana de 0,22µm e estocar a -20° C

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

Solução A - 20 vezes concentrada

**Meio de Cultura DMEM 1 X**

Meio base -	134,7 g
H <sub>2</sub> O deionizada <i>q.s.p</i>	5 L

Este modo de preparo é específico para reagente Sigma, código D-7777.

Estocar a 4° C

**Meio DMEM 1 X suplementado para manutenção da linhagem celular 3T3 em estufa com atmosfera de 3,5 % de CO<sub>2</sub>:**

Soro fetal bovino – SFB (Cultilab lote 1210) 10% -	100 ml
Solução de Glutamina 3 % -	15 ml
HEPES -	20Mm
NaCO <sub>3</sub> -	26mM

Completar o volume para 1000 ml *q.s.p* de meio DMEM 1X e estocar a 4° C

**DMEM 1 X suplementado para diluição dos produtos testados no ensaio de citotoxicidade**

SFB (Cultilab lote 1210) -	50 ml
Solução de Bicarbonato de Sódio 7,5 %	30 ml
Solução de Glutamina 3%	15 ml

Completar o volume para 1000 ml *q.s.p* de meio DMEM 1 X

Estocar a 4 ° C.

**3.2.3 Equipamentos:**

- Balança Digital Metler Pe 3600
- Banho Maria Fanen Modelo 10210
- Câmara de Fluxo Laminar marca VECO

- Microscópio invertido Olympus modelo IM
- Capela química de exaustão marca BNF
- Estufa de CO<sub>2</sub> para cultura celular marca REVCO
- Pipetador automático Pipet Aid Drummond modelo serial 72834
- Placa agitadora Analiton modelo 704
- Potenciômetro Analion modelo PM 608
- Sistema de criopreservação Cryometal modelo DS – 34
- Bomba a vácuo/pressão
- Sistema de purificação de água Milli –Q Millipore
- Autoclave da marca Lutz Ferrando
- Sistema de filtração a vácuo Nalgene volume de 500 ml
- Leitor de Elisa Elx 800 Bio-Tec (filtro de 595 nm)
- Lavador automático de microplacas Elx 50 Step Washer Bio – Tek
- Agitador de tubos Vortex
- Micropipetas para volumes de 5 - 40 µL, 50 - 200 µL, e 500 – 2500 µL
- Micropipeta Multicanal 40 – 200 µL
- Cronômetro



### ***3.2.4. Descongelamento Celular***

As células 3T3 foram retiradas do reservatório de nitrogênio a  $-196^{\circ}\text{C}$  e descongeladas rapidamente em banho-maria. Foram transferidas em câmara de fluxo laminar para garrafa de cultura contendo aproximadamente 9 ml de meio DMEM suplementado para manutenção e crescimento celular em estufa de  $\text{CO}_2$ . O repique foi realizado no momento em que era observada uma monocamada confluenta.

### ***3.2.5 Procedimento***

A metodologia foi realizada com base no estudo proposto por Costa, 2006 e Clothier, 1995 conforme demonstrado nas Figuras 7 e 8. As células 3T3 foram semeadas em microplacas de 96 cavidades (excetuando-se as extremidades) em um volume de  $100\mu\text{L}$  na concentração de  $1,0 \times 10^5$  em meio DMEM (10% SFB) suplementado para manutenção e crescimento celular e mantidas por 24 horas em estufa a  $36,5^{\circ}\text{C}$  com 3,5% de  $\text{CO}_2$ . Posteriormente, o meio foi trocado por  $100\mu\text{L}$  de diluições pré-estabelecidas das amostras em meio DMEM (5% de SFB). Após 24 horas de incubação, todo o conteúdo de meio existente nas microplacas foi descartado e as mesmas foram então lavadas com solução tampão PBS 0,01M e lavadas em lavador automático de microplacas em quatro ciclos de lavagem. Posteriormente, a solução tampão foi descartada e foi adicionado às cavidades da microplaca (em cabine de segurança química)  $100\mu\text{L}$  de solução fixadora PBS 0,01M/formol 4%, procedendo-se a incubação das mesmas por 15 minutos. O fixador foi descartado e as microplacas foram secas em temperatura ambiente. Depois de secas, foi adicionado às cavidades da microplaca  $50\mu\text{L}$  de solução corante CBB-R250 0,2% p/v, incubando-se por 30 minutos ao abrigo da luz em temperatura ambiente.

O corante foi descartado após esse intervalo de tempo e as microplacas foram submersas imediatamente em recipiente plástico contendo água destilada e logo após, lavadas manualmente por três vezes, procedendo-se a troca do recipiente com água a cada lavagem. As microplacas foram colocadas em agitador automático (ainda com água destilada no interior de suas cavidades) por 20 minutos a 500rpm, seguido de uma última lavagem manual com água destilada. As microplacas foram secas em temperatura ambiente. Depois de secas, o corante foi eluído com a adição de  $100\mu\text{L}$  de SDS 1% em

cada cavidade da microplaca. A substância eluente foi mantida *overnight* ao abrigo da luz e a densidade óptica (D.O) foi medida em leitor de Elisa a 595 nm.

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

Figura 7: Esquema resumido do procedimento do ensaio *in vitro*.

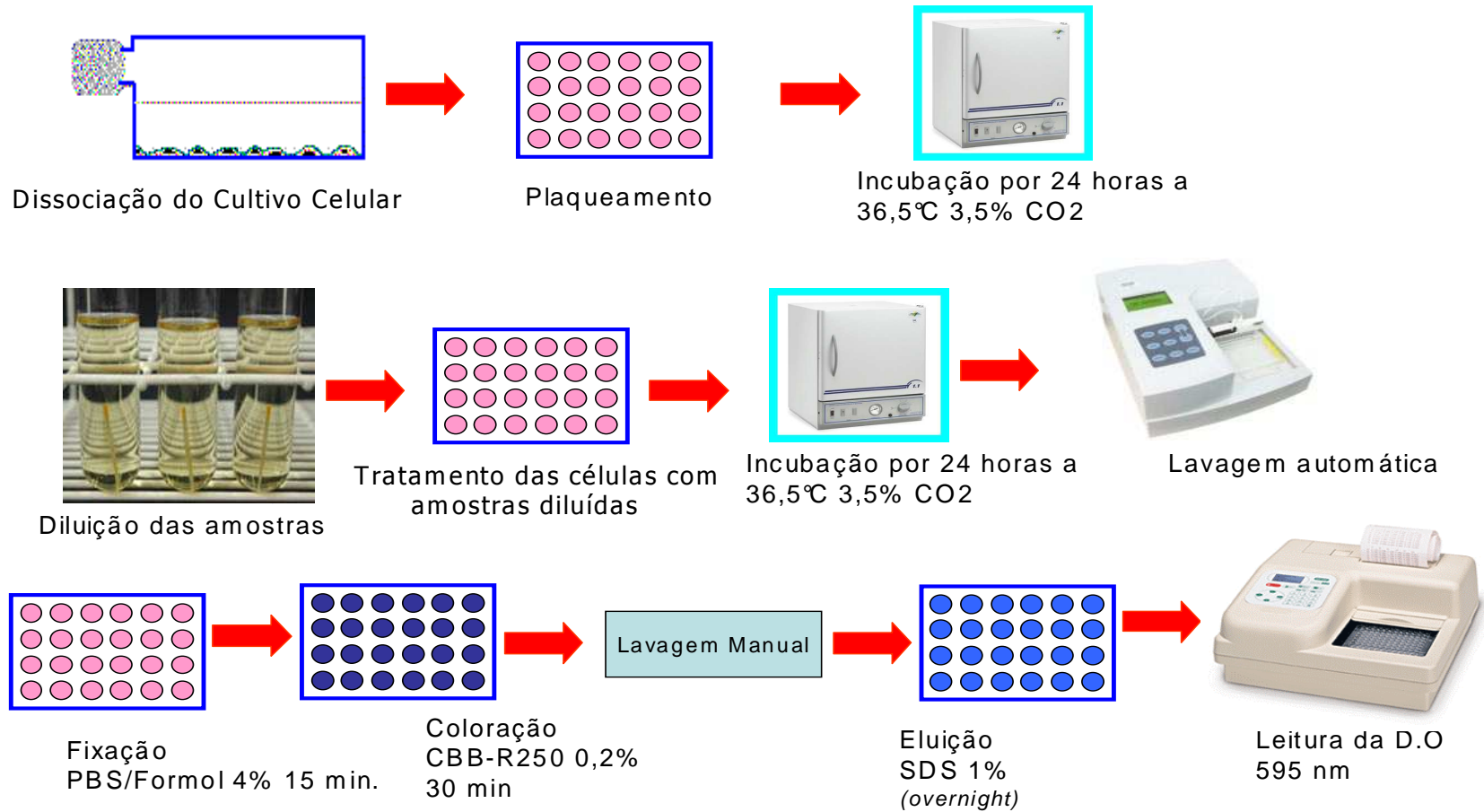
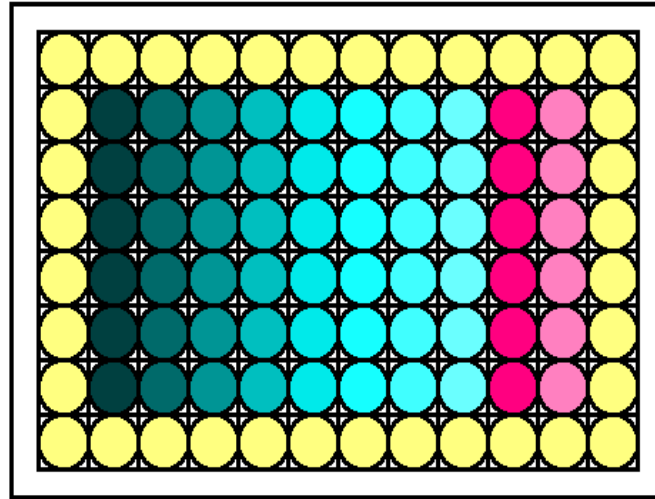


Figura 8: Esquema da aplicação das amostras diluídas na placa de 96 poços



Amostra[+] → Amostra [-]

■ Vazio

■ Diluições da amostra

■ Controle

■ Branco

### 3.3 Ensaio *in vivo*

Conforme mencionado anteriormente, foram utilizados dados provenientes do banco de dados do DFT/INCQS. O ensaio *in vivo* foi realizado segundo o POP n° 65.333.004 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 vir a entrar em contato com os olhos (Anexo 1).

### 3.4 Análise Estatística

Para estabelecer a precisão inter-ensaio foi realizado o cálculo do coeficiente de variação (CV%) segundo Bland & Altman (BLAND & ALTMAN, 2008). Através dos resultados obtidos nos três ensaios independentes realizados em cada uma das 25 amostras de produtos acabados/tensoativos. O CV% foi calculado dividindo-se o desvio padrão (DP) de cada amostra por sua respectiva média aritmética e multiplicando-se por 100.

$$CV = \frac{DP}{\text{Média arit. IC}_{50}} * 100$$

Para o cálculo do coeficiente de variação global (CV% *overall*), procedemos segundo Bland (BLAND, 2006). Primeiramente, dividimos a média das variâncias encontradas entre os três ensaios independentes de cada amostra pelo quadrado da média das IC<sub>50</sub>.

$$CV^2 = \frac{\text{Média das Variância}}{(\text{Média das IC}_{50})^2}$$

Posteriormente calculamos a média dos valores de  $CV^2$ . A partir deste valor calculamos a raiz quadrada e multiplicamos por 100.

$$CV\% \text{ global} = \sqrt{\text{Média } CV^2} * 100$$

A distribuição normal dos dados, tanto dos valores das  $IC_{50}$  do teste *in vitro* quanto das MEM do teste *in vivo*, foi aferida pelo teste *Kolmogorov-Smirnov (K-S)*, através do programa estatístico SPSS® 12.0.

Uma vez demonstrada a distribuição normal dos dados *in vivo* e *in vitro*, a correlação existente entre os resultados foi calculada, através do coeficiente de correlação de Pearson, utilizando para este fim, o *software* MINITAB 10.5 (MINITAB *Statistical Software*™, Minitab Inc. PA, USA, 1995)

Para calcular o grau de preditibilidade do ensaio *in vitro* foi montada uma tabela de contingência, calculando-se a sensibilidade, especificidade e precisão dos testes *in vitro* com relação ao teste *in vivo*:

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

NI: Não irritante      I: Irritante

Onde:

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

## IV RESULTADOS

---

### **4.1 Resultados *in vivo***

Todos os produtos foram testados quanto ao seu potencial de irritação utilizando modelos *in vivo* e *in vitro*. A Tabela 2 demonstra a distribuição dos produtos acabados tanto pela sua classificação de uso (infantil ou adulto; condicionador ou xampu) quanto pela classificação do seu potencial irritante ocular segundo o teste de Draize (*in vivo*).

#### **4.1.1 Produtos infantis**

Foram avaliados 11 produtos de uso infantil (Tabela 2), sendo que destes 05 (46%) foram considerados como não irritantes no teste *in vivo*, 02 como irritantes leves (18%), 03 como irritantes moderados (27%) e 01 como irritante severo (9%).

Dentre os 11 produtos infantis avaliados, 06 eram xampus e 05 eram condicionadores. Os condicionadores apresentam menor potencial irritante; dentre os 05 condicionadores infantis analisados, 04 foram não irritantes e 01 classificado como irritante leve. Já a análise dos dados relacionados aos xampus infantis mostra somente 01 produto não irritante e 01 irritante leve. Cabe destacar a observação de 04 xampus, que apesar da designação como infantil, foram classificados como irritantes moderados (N=3) e severo (N=1).

#### **4.1.2 Produtos da linha adulta**

Com relação à linha adulta, foi avaliado um total de 08 produtos, sendo 02 condicionadores e 06 xampus. Chama atenção o fato de que destes produtos, somente 01



(13%) recebeu classificação não irritante; 01 foi classificado como irritante leve (13%), 04 (50%) como irritantes moderados e 02 (24%) como irritantes severos.

Os 02 condicionadores foram classificados como não irritante (N = 1) e irritante leve (N = 1), sugerindo assim, que a exemplo dos produtos infantis, também para linha adulta observa-se um menor potencial irritante ocular por parte dos condicionadores. Cabe ainda ressaltar, que todos os xampus adultos foram irritantes ao olho do coelho: 04 moderados e 02 severos. Nenhum dos produtos estudados recebeu a classificação de irritante máximo.

Tabela 2: Classificação *in vivo* dos produtos acabados.

	<i>in vivo</i>				
	<b>NI</b>	<b>IL</b>	<b>IM</b>	<b>IS</b>	<b>IMax</b>
<b>Infantil</b>	<b>5 (46%)</b>	<b>2 (18%)</b>	<b>3 (27%)</b>	<b>1 (9%)</b>	<b>0</b>
<i>Xampus</i>	1	1	3	1	0
<i>Condicionadores</i>	4	1	0	0	0
<b>Adulto</b>	<b>1 (13%)</b>	<b>1 (13%)</b>	<b>4 (50%)</b>	<b>2 (24%)</b>	<b>0</b>
<i>Xampus</i>	0	0	4	2	0
<i>Condicionadores</i>	1	1	0	0	0
<b>Total</b>	<b>6 (32%)</b>	<b>3 (16%)</b>	<b>7 (36%)</b>	<b>3 (16%)</b>	<b>0</b>

NI: Não Irritante; IL: Irritante leve; IM: Irritante Moderado; IS: Irritante Severo; IMax: Irritante Máximo.

Fonte: dados gentilmente cedidos pelo DFT/INCQS.

#### 4.1.3 Tensoativos

A maioria dos tensoativos foi avaliada *in vivo* em diferentes concentrações (banco de dados DFT/INCQS). A relação dose-resposta e o potencial irritante ocular de cada tensoativo estudado estão demonstrados na Tabela 3.

Tabela 3: Relação dose-resposta entre as Médias dos Escores Máximos (MEM) obtidos *in vivo* e a concentração de tensoativos aplicados nos olhos dos animais.

	Concentração aplicada nos olhos dos coelhos (%)							
	100	30	16	10	8	4	1	0,5
Tween 20 (não-iônico)	2,0 (NI)	-	-	-	-	-	-	-
Lauril Éter a 27% (aniônico)	-	26,8 (IM)	-	3,2 (IL)	-	-	-	-
Lauril Sulfato de Sódio (aniônico)	-	56,0 (IS)	38,8 (IS)	15,6 (IM)	15,6 (IM)	5,6 (IL)	-	-
Triton X (não-iônico)	-	59,8 (IMax)	-	-	-	-	2,8 (IL)	1,6 (NI)
Cloreto de Benzalcônio (catiônico)	-	-	-	-	-	-	46,4 (IS)	6,0 (IM)
Brometo de cetil- dimetiletilamônio (catiônico)	-	-	-	-	-	-	-	8,4 (IM)

Valores: Escores obtidos no ensaio de irritação ocular de Draize (MEM).  
 ( ): Classificação final obtida no ensaio de irritação ocular de Draize.  
 Fonte: Dados gentilmente cedidos pelo DFT/INCQS.

Os dados compilados na Tabela 3 demonstram que todos os tensoativos apresentaram potencial irritante ocular, com exceção do tween 20, um tensoativo não-iônico, que mesmo quando testado puro, foi classificado como não irritante.

Os tensoativos aniônicos, *i.e.* lauril éter a 27% e lauril sulfato de sódio, apresentaram potencial irritante moderado (MEM = 26,8) e severo (MEM = 56,0), respectivamente, na maior concentração testada (30%). Assim, pode-se dizer que o lauril sulfato de sódio foi discretamente mais irritante para os olhos dos coelhos que o lauril éter a 27% (Tabelas 3 e 4).

O triton X induziu lesões graves nos olhos dos animais aqui avaliados. Este tensoativo recebeu classificação compatível com “irritante máximo”, quando aplicado nos olhos dos coelhos na concentração de 30%, demonstrando assim, que apesar de pertencer à classe de tensoativos não-iônicos (que via de regra é considerada uma classe que compreende ingredientes com baixo potencial irritante), é mais irritante para os olhos que os tensoativos aniônicos lauril éter a 27% e lauril sulfato de sódio (Tabelas 3 e 4).

Os tensoativos que demonstraram os maiores potenciais irritantes neste estudo foram os catiônicos cloreto de benzalcônio e brometo de cetildimetiletilamônio. Estes ingredientes, mesmo quando avaliados em concentrações muito baixas (*e.g.* 0,5%), induziram lesões oculares compatíveis com a classificação de “irritante moderado” (Tabela 3).

A Tabela 4 busca categorizar os tensoativos estudados de acordo com seu potencial irritante ocular, usando como base a análise da relação dose resposta obtida *in vivo*.

Tabela 4: Categorização do potencial irritante ocular dos tensoativos avaliados.

<b>Tensoativo</b>	<b>Natureza do tensoativo</b>	<b>Resultado <i>in vivo</i> classificação</b>	<b>Potencial irritante <i>in vivo</i></b>
<b>Tween 20</b>	Não-íonico	[100%] <i>NI</i>	-
<b>Lauril Éter 27%</b>	Aniônico	[30%],[10%] <i>IM IL</i>	+
<b>Lauril Sulfato de Sódio</b>	Aniônico	[30%],[16%],[10%],[8%],[4%] <i>IS IS IM IM IL</i>	++
<b>Triton X</b>	Não-iônico	[30%], [1%],[0,5%] <i>IMáx, IL NI</i>	+++
<b>Cloreto de Benzalcônio</b>	Catiônico	[1%],[0,5%] <i>IS IM</i>	++++
<b>Brometo de Cetildimetiletilamônio</b>	Catiônico	[0,5%] <i>IM</i>	++++

Assim, se considerarmos a classificação do teste de Draize em função da relação dose-resposta observada nos animais estudados, podemos ordenar os tensoativos de acordo com o seu potencial irritante ocular *in vivo*; onde [tween 20] < [lauril éter a 27%] < [lauril sulfato de sódio] = [triton x] < [cloreto de benzalcônio = brometo de cetildimetilamônio], conforme demonstra a Tabela 4.

## 4.2 Resultados *in vitro*

As médias das  $IC_{50}$  de cada um dos 19 produtos acabados e dos 06 tensoativos foram obtidas a partir de três ensaios *in vitro* realizados independentemente e que são demonstradas na Tabela 5.

O pH dos produtos acabados variou entre 3,76 e 7,25 (tabela5).

A Tabela 5 mostra ainda os valores das regressões lineares das curvas obtidas em cada um dos três ensaios independentes realizados para cada um dos 25 produtos/tensoativos. Os valores das regressões lineares variaram entre 0,746 e 1,000.

O valores médios de  $IC_{50}$  aqui obtidos variaram entre 0,004 e 3,771mg/mL. O maior valor (representa teoricamente um produto com baixo potencial irritante) foi atribuído ao produto F3M2, um condicionador classificado *in vivo* como não irritante, enquanto que os menores valores de  $IC_{50}$  observados foram atribuídos a tensoativos com forte potencial irritante (Tabela 5).

Tabela 5: IC<sub>50</sub> média dos produtos/tensoativos avaliados.

Produtos	in vivo	pH	IC 50*			Regressão linear*			IC <sub>50</sub> Média (mg/mL)
			(1°)	(2°)	(3°)	R <sup>2</sup> (1°)	R <sup>2</sup> (2°)	R <sup>2</sup> (3°)	
M1	NI	6,31	3,002	1,102	3,321	0,962	0,864	0,943	2,475
F2M1	IM	6,8	1,103	0,713	0,836	0,933	0,895	0,993	0,884
F3M1	IL	7,25	1,371	1,096	1,368	0,891	0,935	0,860	1,278
F4M1	IM	6,55	1,127	0,715	0,840	0,975	0,986	0,961	0,894
F4 F1M2	IM	7,01	0,539	0,389	0,263	0,974	0,972	0,939	0,397
F5M1	IS	6,71	0,513	0,836	0,643	0,934	0,921	0,882	0,664
F3M2	NI	4,23	2,725	2,752	5,837	0,908	0,938	0,919	3,771
F4M3	NI	4,26	0,628	0,728	0,459	0,857	0,958	0,967	0,605
F4M4	NI	3,76	0,379	0,306	0,300	0,991	0,968	0,901	0,328
F6M1	IL	3,82	0,575	0,562	0,466	0,994	0,986	0,841	0,534
F1M2	NI	3,98	0,664	0,666	0,643	0,852	0,882	0,911	0,657
F7M1	IM	5,6	0,633	0,310	0,330	0,997	0,968	0,760	0,424
F8M1	IM	5,81	0,888	0,729	0,917	0,961	0,912	0,971	0,844
F9M1	IM	4,84	0,164	0,225	0,095	0,929	0,811	0,746	0,161
F10M1	IS	6,17	0,453	1,051	0,555	0,935	0,993	0,978	0,686
F11M1	IS	5	0,692	0,673	0,624	0,869	0,979	0,905	0,663
F12M1	IL	6,92	1,012	0,478	1,403	0,921	0,952	0,960	0,964
F7M2	IL	4,09	0,863	0,507	0,853	0,952	0,843	0,934	0,741
F2M2	NI	4,67	2,432	1,829	3,369	0,916	0,994	0,970	2,543
Lauril Sulf. de Sódio	++		0,0597	0,0637	0,0615	1,000	0,961	0,989	0,062
Triton X	+++		0,0024	0,0078	0,0063	0,999	0,931	0,916	0,005
Tween 20	-		0,3990	0,4072	0,3740	0,999	0,985	0,825	0,393
Cloreto de Benzalcônio	++++		0,0072	0,0097	0,0040	0,897	0,975	0,961	0,007
Br. de Cetilmetiletilam	++++		0,0041	0,0045	0,0030	0,929	0,995	0,986	0,004
Lauril Éter	+		0,2763	0,2650	0,2900	0,903	0,896	0,900	0,277

\*Valores de IC<sub>50</sub> e Regressão linear (R<sup>2</sup>) obtidos em cada um dos três ensaios independentes (1°), (2°) e (3°).

Na Tabela 6 podemos observar os valores médios de  $IC_{50}$  obtidos somente para os tensoativos aqui estudados. Os menores valores de  $IC_{50}$  deste estudo foram observados para os dois tensoativos catiônicos avaliados, *i.e.* o cloreto de benzalcônio ( $IC_{50} = 0,007\text{mg/mL}$ ) e o brometo de cetildimetiletilamônio ( $IC_{50} = 0,004\text{mg/mL}$ ) e para o triton X ( $IC_{50} = 0,005\text{mg/mL}$ ). As  $IC_{50}$  médias destes tensoativos foram cerca de 10 vezes menores que aquela observada para o lauril sulfato de sódio ( $IC_{50} = 0,062\text{ mg/mL}$ ) e aproximadamente 50 vezes menores que a  $IC_{50}$  obtida para o lauril éter a 27% ( $IC_{50} = 0,277\text{mg/mL}$ ). O maior valor de  $IC_{50}$  obtido entre os tensoativos, foi observado para o tween 20 ( $IC_{50} = 0,393\text{ mg/mL}$ ), o único tensoativo classificado como não irritante *in vivo* neste estudo.

Em uma análise semelhante àquela realizada para o teste de Draize, podemos ordenar os tensoativos de acordo com o seu potencial irritante *in vitro*; onde [tween 20] < [lauril éter a 27%] < [lauril sulfato de sódio] < [triton x = cloreto de benzalcônio = brometo de cetildimetiletilamônio]. Assim, podemos afirmar com base nos dados compilados na Tabela 6, que os resultados obtidos *in vitro* são compatíveis com o potencial irritante dos tensoativos estabelecidos *in vivo*.

Tabela 6: Comparação dos resultados *in vivo* e *in vitro* obtidos com tensoativos.

<b>Tensoativo</b>	<b>Natureza do tensoativo</b>	<b>Potencial irritante <i>in vivo</i></b>	<b>Resultado <i>in vitro</i> Média IC<sub>50</sub> (mg/mL)</b>	<b>Potencial irritante <i>in vitro</i></b>
<b>Tween 20</b>	Não-ionico	-	0,393	+
<b>Lauril Éter 27%</b>	Aniônico	+	0,277	+
<b>Lauril Sulfato de Sódio</b>	Aniônico	++	0,062	++
<b>Triton x</b>	Não-iônico	+++	0,005	+++
<b>Cloreto de Benzalcônio</b>	Catiônico	++++	0,007	+++
<b>Brometo de Cetildimetiletiamônio</b>	Catiônico	++++	0,004	+++

#### 4.2.1 Precisão inter-ensaio

Para estabelecer a precisão inter-ensaio<sup>2</sup> do método proposto, calculamos o coeficiente de variação, conforme protocolo preconizado pela OMS para validação de ensaios biológicos (WHO/VSQ/97.02). Os coeficientes de variação (CV%) de cada uma das amostras ensaiadas neste estudo foram calculados de acordo com metodologia descrita no capítulo 3.6 de “Materiais e Métodos” e estão demonstrados na Tabela 7.

<sup>2</sup>Precisão inter-ensaio (também conhecida como precisão intermediária): é medida através do coeficiente de variação, obtido pela análise de múltiplas determinações de uma (ou várias) amostra(s), ensaiada(s) em série de experimentos independentes, conduzidos por um mesmo laboratório.



Tabela 7: Precisão inter-ensaio do teste *in vitro*.

<i>Produtos</i>	<i>in vivo</i>	<i>IC50</i>			Média aritmética	<i>DP</i>	<i>CV%</i>
		(1°)	(2°)	(3°)			
F1M1	NI	3,002	1,102	3,321	2,475	1,200	48,47
F2M1	IM	1,103	0,713	0,836	0,884	0,199	22,55
F3M1	IL	1,371	1,096	1,368	1,278	0,158	12,36
F4M1	IM	1,127	0,715	0,840	0,894	0,211	23,63
F4M2	IM	0,539	0,389	0,263	0,397	0,138	34,80
F5M1	IS	0,513	0,836	0,643	0,664	0,163	24,48
F3M2	NI	2,725	2,752	5,837	3,771	1,789	47,44
F4M3	NI	0,628	0,728	0,459	0,605	0,136	22,47
F4M4	NI	0,379	0,306	0,300	0,328	0,044	13,40
F6M1	IL	0,575	0,562	0,466	0,534	0,060	11,15
F1M2	NI	0,664	0,666	0,643	0,657	0,013	1,94
F7M1	IM	0,633	0,310	0,330	0,424	0,181	42,69
F8M1	IM	0,888	0,729	0,917	0,844	0,101	11,98
F9M1	IM	0,164	0,225	0,095	0,161	0,065	40,40
F10M1	IS	0,453	1,051	0,555	0,686	0,320	46,63
F11M1	IS	0,692	0,673	0,624	0,663	0,035	5,29
F12M1	IM	1,012	1,403	0,478	0,964	0,276	28,68
F7M2	IL	0,863	0,507	0,853	0,741	0,203	27,36
F2M2	NI	2,432	1,829	3,369	2,543	0,776	30,52
Lauril Sulfato de Sódio	++	0,0597	0,0637	0,0615	0,062	0,002	3,23
Triton X	+++	0,0024	0,0078	0,0063	0,005	0,003	46,45
Tween 20	-	0,3990	0,4072	0,3740	0,393	0,017	4,40
Clor. de Benzalcônio	++++	0,0072	0,0097	0,0040	0,007	0,003	40,81
Br. de Cetileildimetilamônio	++++	0,0041	0,0045	0,0030	0,004	0,001	19,42
Lauril Éter 27%	+	0,2763	0,2650	0,2900	0,277	0,013	4,52
					<i>CV% Global</i> 30,00		

Dentre os 25 produtos acabados/tensoativos ensaiados, nenhum apresentou coeficiente de variação maior que 50%. O coeficiente de variação global do estudo foi estabelecido como sendo de 30,00 (Tabela 7).

Os produtos acabados apresentaram os coeficientes de variação com valores compreendidos entre 1,94% (F1M2) e 48,47% (F1M1). Esta grande variação entre os produtos, no que tange os valores de CV%, também foi observada para os tensoativos. Observamos entre os tensoativos avaliados, amostras com valores de CV% bastante satisfatórios, como *e.g* o lauril sulfato de sódio (CV%: 3,23%), o tween 20 (CV%: 4,40) e o lauril éter (CV%: 4,52) e outros com valores acima de 20%, como nos casos do triton x (CV%:46,45) e o cloreto de benzalcônio (CV%: 40,81%).

#### ***4.3 Comparação entre os ensaios in vivo e in vitro***

Os resultados do presente estudo foram comparados (*in vivo versus in vitro*) através da análise do coeficiente de correlação de Pearson existente entre os escores (MEM) obtidos no teste de Draize e os valores médios de IC<sub>50</sub> obtidos *in vitro*. Além disso, com o intuito de avaliar o grau de preditibilidade do ensaio *in vitro* em relação ao teste de Draize, estabelecemos um ponto de corte (*cut-off*) para diferenciação de substâncias irritantes daquelas não-irritantes (no teste *in vitro*) e calculamos parâmetros como precisão, sensibilidade, especificidade.

### ***4.3.1 Coeficiente de correlação de Pearson***

Para avaliar a correlação entre os valores de MEM (média dos escores máximos) obtidos no ensaio *in vivo* e os valores médios de IC<sub>50</sub> obtidos no presente estudo realizamos o cálculo do coeficiente de correlação de Pearson. Tal análise estatística se aplica à investigação da correlação existente entre médias de grupos que apresentam valores paramétricos (CANN, 2003; OSBORNE, 2005; MALONEY, 2003; FILHO *et al.*, 2005), *i.e.* obedecem a uma distribuição normal, como é o caso dos resultados *in vitro* e *in vivo* encontrados pelo presente estudo.

As distribuições normais dos dados (*KS teste* >0,05) estão demonstradas para os valores de MEM global na Figura 9, para os valores médios de IC<sub>50</sub> do teste *in vitro* na Figura 10, assim como para os valores de MEM de córnea (Figura 11), para os valores de MEM de íris (Figura 12) e para os valores de MEM de conjuntiva (Figura 13).

Figura 9: Distribuição normal dos valores de MEM Global (*in vivo*).

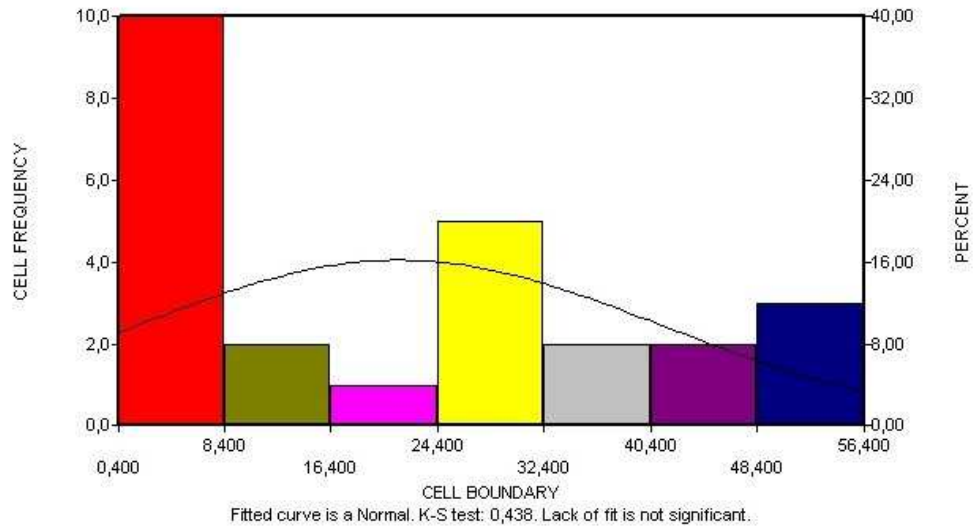


Figura 10: Distribuição normal dos valores de média aritmética da IC<sub>50</sub>.

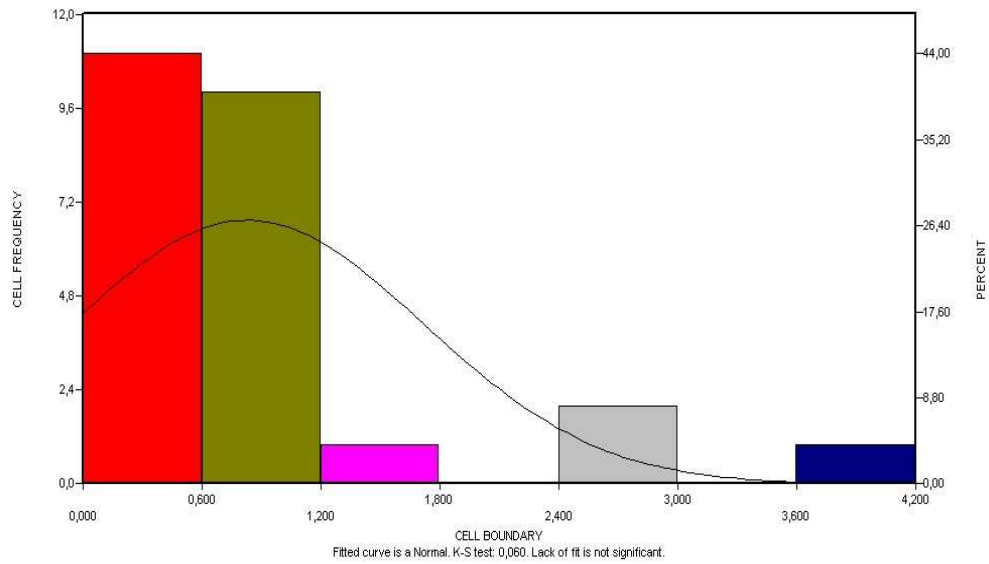


Figura 11: Distribuição normal dos valores de MEM de córnea.

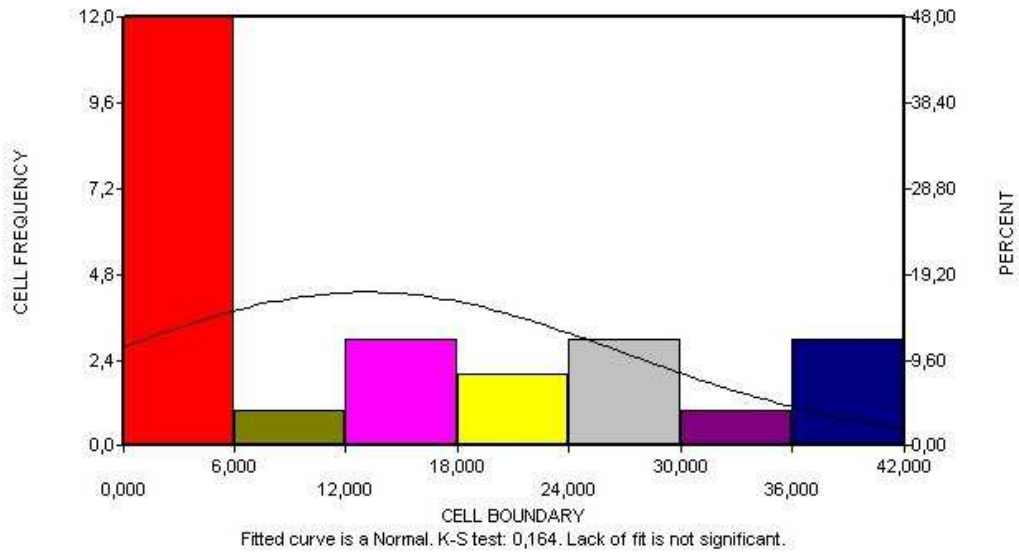


Figura 12: Distribuição normal dos valores de MEM de íris.

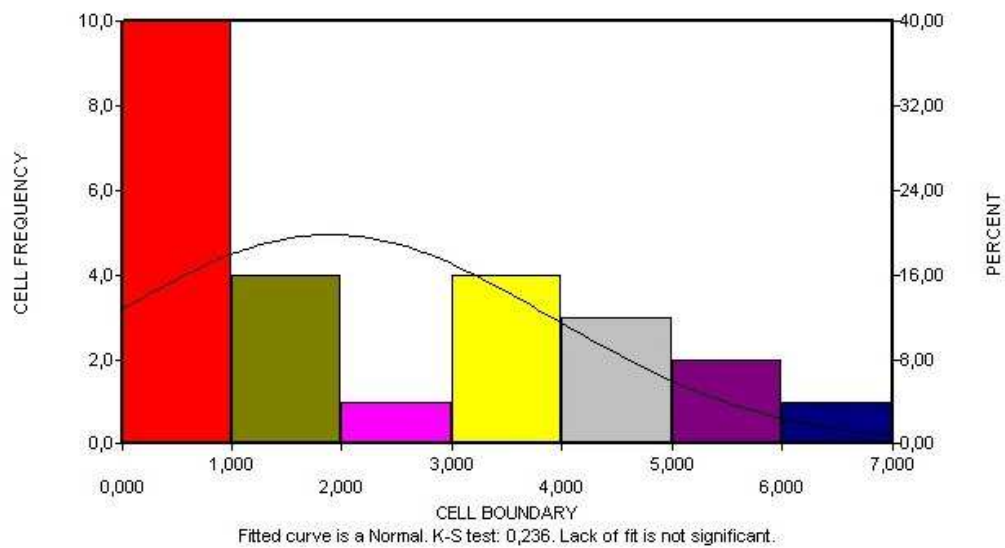
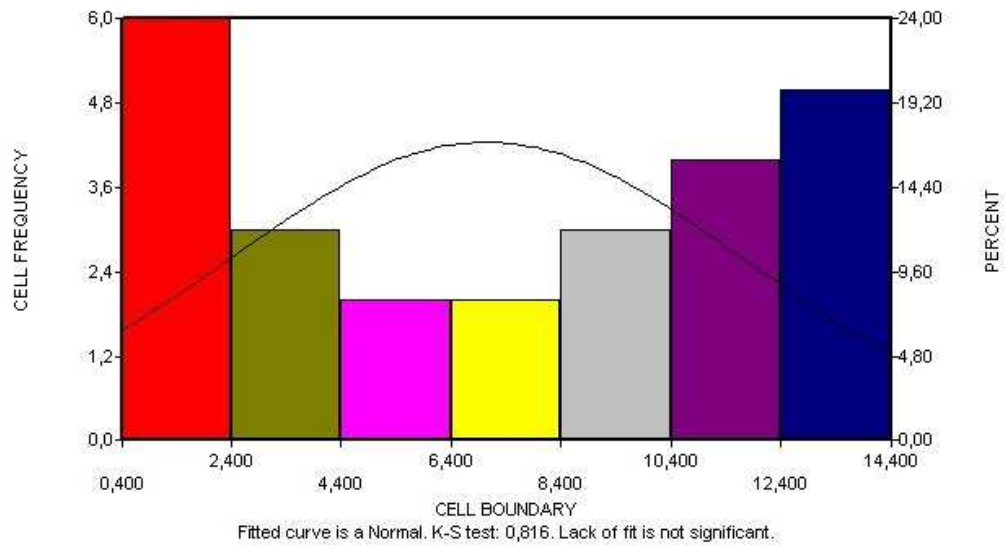


Figura 13: Distribuição normal dos valores de MEM de conjuntiva.



Para a análise dos coeficientes de correlação de Pearson (Tabelas 8 e 9), confrontamos os valores de MEM com os valores de IC<sub>50</sub> de todos os produtos testados neste estudo (produtos acabados/tensoativos, N=25); somente dos produtos acabados (N=19) e posteriormente, somente dos tensoativos (N=6). Tais cálculos foram realizados com a intenção de se observar a correlação existente entre a citotoxicidade e o grau de lesão induzido no olho por cada categoria de amostra ensaiada.

Em uma segunda etapa, confrontamos os valores de MEM específicos para cada estrutura ocular separadamente (córnea, íris e conjuntiva) com os valores das médias aritméticas das IC<sub>50</sub> de todos os produtos acabados/tensoativos (N=25), somente dos produtos acabados (N=19) e posteriormente, somente dos tensoativos (N=6), para que pudéssemos relacionar o potencial citotóxico das amostras testados com as lesões ocorridas em cada uma das estruturas oculares (Tabela 9).

No caso dos tensoativos, para efeito de cálculo do coeficiente de correlação de Pearson entre os resultados *in vitro* e *in vivo* (onde diferentes doses foram testadas no teste de Draize) utilizamos como critério o uso dos valores de MEM obtidos com a maior dose de tensoativo avaliada *in vivo*, como mostra a Tabela 8.

Tabela 8: Valores utilizados para o cálculo dos coeficientes de correlação de Pearson: médias aritméticas das IC<sub>50</sub>, valor global de MEM (olho como um todo) e das estruturas oculares (MEM de córnea, íris e conjuntiva).

Produtos	<i>In vivo</i>	MEM Global	Média Aritimética IC <sub>50</sub> (mg/ml)	MEM Córnea	MEM íris	MEM conjuntiva
F1M1	NI	1,6	2,475	0,0	1,0	1,6
F2M1	IM	25,4	0,884	16,0	1,0	8,4
F3M1	IL	4,8	1,278	0,0	0,0	4,8
F4M1	IM	36,8	0,894	20,0	4,0	12,8
F4M2	IM	28,6	0,397	16,0	1,0	11,6
F5M1	IS	41,0	0,664	28,0	3,0	10,8
F3M2	NI	0,8	3,771	0,0	0,0	0,8
F4M3	NI	1,2	0,605	0,0	0,0	1,2
F4M4	NI	0,8	0,328	0,0	0,0	0,8
F6M1	IL	3,6	0,534	0,0	0,0	3,6
F1M2	NI	0,4	0,657	0,0	0,0	0,4
F7M1	IM	52,2	0,424	36,0	5,0	13,2
F8M1	IM	29,4	0,844	16,0	5,0	8,8
F9M1	IM	13,0	0,161	6,0	1,0	6,4
F10M1	IS	52,2	0,686	36,0	3,0	12,8
F11M1	IS	32,0	0,663	18,0	4,0	11,6
F12M1	IM	23,4	0,964	10,0	3,0	10,4
F7M2	IL	3,4	0,741	0,0	1,0	2,4
F2M2	NI	2,4	2,543	0,0	0,0	2,4
Lauril Sulf. de Sód. (30%)	IS	56,0	0,062	23,20	3,2	12,4
Triton X (30%)	Imáx	59,8	0,005	40,0	5,0	11,2
Tween 20 (100%)	NI	2,0	0,393	0,0	0,0	2,0
Clor. Benzalcônio (1%)	IS	46,4	0,007	30,4	4,0	13,2
Brom. cetildimetil. (0,5%)	IM	8,4	0,004	0,8	0,0	7,6
Lauril Éter a 27% (30%)	IM	26,8	0,277	18	2,0	7,6



Os coeficientes de correlação de Pearson entre os valores médios de IC<sub>50</sub> do teste *in vitro* e os escores das três estruturas oculares (córnea, íris e conjuntiva) e escore global do teste de Draize encontram-se descritos na Tabela 9.

Tabela 9: Coeficientes de correlação de Pearson relacionando os valores de IC<sub>50</sub> com os escores das estruturas oculares dos ensaios *in vivo*. (grau de confiança: 99%).

N=25 (todos os produtos)	Correlação de Pearson
Córnea	-0,397 ( <i>p</i> = 0,050)
Íris	-0,313 ( <i>p</i> = 0,128)
Conjuntiva	-0,455 ( <i>p</i> =0,035)
<b>Escore total (MEM)</b>	<b>-0,420 ( <i>p</i>=0,022)</b>
N=19 (produtos acabados)	
Córnea	-0,359 ( <i>p</i> =0,131)
Íris	-0,289 ( <i>p</i> =0,230)
Conjuntiva	-0,413 ( <i>p</i> =0,079)
<b>Escore total (MEM)</b>	<b>-0,381 ( <i>p</i>=0,108)</b>
N= 6 (tensoativos)	
Córnea	-0,531 ( <i>p</i> =0,278 )
Íris	-0, 550 ( <i>p</i> =0,258)
Conjuntiva	-0,824 ( <i>p</i> =0,044)
<b>Escore total (MEM)</b>	<b>-0,611 ( <i>p</i>=0,197)</b>

Quando consideramos todos os produtos acabados/tensoativos avaliados (N=25), obtivemos um valor de coeficiente de correlação de Pearson de -0,420 (*p*=0,022). Este coeficiente, juntamente com os coeficientes de correlação estabelecidos a partir da comparação de escores da conjuntiva vs. IC<sub>50</sub> (-0,455, *p*=0,035) e da córnea vs. IC<sub>50</sub> (-0,397, *p* = 0,050) foram estatisticamente significativos (Tabela 9).

Quando consideramos somente produtos acabados (N=19, Tabela 9), observamos coeficientes de correlação de menor calibre, e sem significância estatística, tanto para o escore total como para as estruturas oculares analisadas individualmente.

Já a análise dos resultados obtidos com tensoativos mostra valores de coeficiente de correlação de maior calibre que aqueles obtidos para produtos acabados, porém devido ao pequeno número de tensoativos analisados (N=6), não se obteve significância estatística (Tabela 9). Uma exceção foi observada para o coeficiente de correlação estabelecido entre os escores da conjuntiva *vs.* IC<sub>50</sub>. Este foi o coeficiente de maior calibre observado neste estudo (-0,824, *p*=0,044).

É importante destacar que em todos os casos avaliados (produtos acabados + tensoativos, somente produtos acabados e somente tensoativos), os achados observados na conjuntiva, dentre as estruturas oculares analisadas, foram os que melhor se correlacionaram com o efeito citotóxico *in vivo*.

#### **4.3.2 Grau de preditibilidade do ensaio *in vitro***

A classificação dos produtos de acordo com a graduação das lesões obtidas nos testes *in vivo*, juntamente com as médias de IC<sub>50</sub> dos experimentos *in vitro*, encontra-se na Tabela 10.

Para avaliar o grau de preditibilidade do teste *in vitro* em relação ao teste de Draize, estabelecemos um ponto de corte (*cut-off*) para diferenciação de substâncias irritantes daquelas não-irritantes no teste *in vitro*. Consideramos o valor de IC<sub>50</sub> = 1,00mg/mL como um possível ponto de corte para a diferenciação de produtos acabados irritantes (IC<sub>50</sub><1,00mg/mL) de não-irritantes (IC<sub>50</sub>>1,00mg/mL). Calculamos, assim, parâmetros como precisão, sensibilidade, especificidade conforme descrito no capítulo 3.6 de “Materiais e Métodos” e de acordo com a Tabela 11.

Tabela 10: Comparação entre as classificações obtidas no ensaio *in vivo* e o valor médio de IC<sub>50</sub> *in vitro*.

<i>Classificação</i>				
<i>Produtos</i>	<i>in vivo</i> (MEM)	<i>in vitro</i> (IC <sub>50</sub> mg/mL)	Final ( <i>in vivo</i> )	Final ♣ ( <i>in vitro</i> )
F1M1	1,6	2,475	NI	NI
F3M2	0,8	3,771	NI	NI
F4M3	1,2	0,605	NI	I
F4M4	0,8	0,328	NI	I
F1M2	0,4	0,658	NI	I
F2M2	2,4	2,543	NI	NI
Tween 20	2,0	0,393	NI	I
F3M1	4,8	1,278	LI	NI
F6M1	3,6	0,534	LI	I
F7M2	3,4	0,741	LI	I
F12M1	23,4	0,964	MI	I
F2M1	25,4	0,884	MI	I
F4M1	36,8	0,894	MI	I
F4M2	28,6	0,397	MI	I
F7M1	52,2	0,424	MI	I
F8M1	29,4	0,844	MI	I
F9M1	13,0	0,161	MI	I
Brom. Cetildim. (0,5%)	8,4	0,004	MI	I
Lauril Éter (30%)	26,8	0,277	MI	I
F5M1	41,0	0,664	SI	I
F10M1	52,2	0,686	SI	I
F11M1	32,0	0,663	SI	I
Clor. Benzalcôn. (1%)	46,4	0,007	SI	I
Lauril Sulf. Sód. (30%)	56,0	0,062	SI	I
Triton X (30%)	59,8	0,005	IMáx	I

♣: Ponto de corte: IC<sub>50</sub>=1,0mg/mL

Usando o valor de 1,000mg/ml como ponto de corte, obtivemos 5 resultados discordantes entre os testes *in vivo* e *in vitro*, sendo 4 falsos positivos (F4M3, F4M4, F1M2 e tensoativo tween 20) e 1 resultado falso negativo (F3M1).

Tabela 11: Tabela de Contingência.

		<i>in vitro</i>	
		NI	I
<i>in vivo</i>	NI	A = 3	B = 4
	I	C = 1	D = 17

Assim, a precisão do ensaio foi de 80%, a sensibilidade foi de 94% e a especificidade foi de 43%.

## V. DISCUSSÃO

---

### 5.1 Toxicologia de produtos cosméticos

Segundo dados da ABIHPEC (Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos), um dos setores da indústria brasileira que apresentou maior crescimento nos últimos anos foi o da indústria de produtos cosméticos, com um crescimento médio deflacionado composto de 10,9% na última década, contra 2,8% da indústria em geral (ABIHPEC, 2008).

Uma variedade de fatores tem contribuído para o enorme crescimento deste segmento da indústria nos últimos anos. Entre eles destacam-se a participação crescente da mulher brasileira no mercado de trabalho, a utilização de tecnologia de ponta e o conseqüente aumento da produtividade (favorecendo assim os preços praticados pelo setor, que têm aumentos menores do que os índices de preços da economia em geral), os lançamentos constantes de novos produtos atendendo cada vez mais às necessidades do mercado e, por fim, o aumento da expectativa de vida, o que traz a necessidade de conservar uma impressão de juventude.

O aumento de vendas de produtos cosméticos e de higiene pessoal deve ser atentamente acompanhado pelos setores regulatórios competentes, uma vez que o entusiasmo no crescimento de vendas pode induzir o surgimento de novas empresas, que devem, todavia, atender a um criterioso grau de exigência quanto à comprovação da segurança de seus produtos. Ao contrário da situação de exposição humana a fármacos, onde em dadas circunstâncias pode-se ponderar sobre a relação risco-benefício, no caso particular de produtos cosméticos, não se pode admitir o surgimento de quaisquer efeitos danosos em conseqüência deste tipo de exposição.

No Brasil, dados levantados pelo Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX) apontam para uma baixa incidência de intoxicações decorrentes da exposição a produtos cosméticos, *i.e.* 808 casos, ou 0,96% do total de casos

de intoxicação humana notificados nos Centros de Informação e Assistência Toxicológica no âmbito nacional, durante o ano de 2005, conforme mostra a Tabela 12 (SINITOX, 2005). Não há neste *site* dados disponíveis sobre a natureza dos produtos cosméticos que levaram aos registros junto aos Centros de Informação e Assistência Toxicológica e nem sobre a severidade dos sintomas apresentados, embora nenhum óbito tenha sido associado ao uso de cosméticos durante o período estudado. Ainda segundo o SINITOX, as regiões em que mais observa-se casos de agravos à saúde em decorrência ao uso de produtos cosméticos são as regiões sul, com 330 casos e a região sudeste, com 315 em 2005. Na região sul, por exemplo, a incidência de reações adversas induzidas por cosméticos foi superior ao número de casos de intoxicação alimentar (42 casos notificados em 2005).

Tabela 12: Casos registrados de intoxicação humana por agente tóxico (Brasil, 2005).

	<b>Total</b>	
	n <sup>o</sup>	%
<b>Agente</b>		
Medicamentos	21926	25,96
Agrotóxicos agrícolas	5577	6,60
Agrotóxicos domésticos	2590	3,07
Produtos veterinários	877	1,04
Raticidas	3213	3,80
Domissanitários	6506	7,70
<b>Cosméticos</b>	<b>808</b>	<b>0,96</b>
Produtos químicos industriais	4631	5,48
Metais	720	0,85
Drogas de abuso	2942	3,48
Plantas	1765	2,09
Alimentos	833	0,99
Animais peçonhentos/Serpentes	4944	5,85
Animais peçonhentos/ Aranhas	4661	5,52
Animais peçonhentos/ Escorpiões	8208	9,72
Outros animais peçonhentos	5834	6,91
Animais não peçonhentos	5146	6,09
Desconhecido	2005	2,37
Outros	1270	1,50
<b>Total</b>	<b>84456</b>	<b>100</b>

Fonte: <http://www.fiocruz.br/sinitox>

O baixo grau de severidade de efeitos adversos induzidos por determinados produtos, assim como a percepção do risco por parte do consumidor, podem ser importantes aspectos no que diz respeito a possíveis sub-notificações de casos de intoxicações por cosméticos em nosso país, sobretudo se levarmos em consideração dados

do mercado norte-americano (CORBETT *et al.*, 1999). Segundo estes autores, os casos de intoxicações humanas em decorrência da exposição a cosméticos e produtos de higiene pessoal representaram a terceira principal causa de registros (8,5%, ou cerca de 170 mil casos) aos centros de controle de intoxicação nos EUA no ano de 1995, sendo menos freqüente somente do que os casos de intoxicações por produtos domissanitários e medicamentos (analgésicos). Estes mesmos autores relatam que os efeitos adversos observados nos casos registrados com cosméticos são de baixa gravidade e que em menos de 10% dos casos foi necessário tratamento em unidades hospitalares.

Outro dado interessante sobre a incidência de reações adversas induzidas por produtos cosméticos pode ser observado através de registros dos casos de reclamações feitas ao FDA por consumidores norte-americanos. Tais registros são feitos por classes de produtos comercializadas neste país. O Quadro 5 mostra dados do FDA sobre a incidência de reações adversas (*e.g.* irritações de pele e mucosas, dermatites, dor/desconforto, efeitos sobre o sistema respiratório etc) induzidas por produtos cosméticos entre os anos de 1987 a 1995 nos EUA, relacionando-os com a natureza dos produtos. Cremes para cuidados da pele e tinturas de cabelo foram os produtos que levaram ao maior número de reações adversas. Xampus foram responsáveis pela indução de cerca de 80 tipos distintos de reações e aparecem como a terceira maior causa de reclamações, juntamente com produto para as unhas.



Quadro 5: Registro do FDA: reclamações de consumidores quanto a reações adversas provocadas por produtos cosméticos nos EUA, entre 1987 e 1995.

<b>Número de reações adversas observadas</b>	<b>Natureza do produto</b>
262	Produtos para o cuidado da pele (cremes de uso diário e noturno, cremes anti-rugas, cremes para clareamento da pele, hidratantes, soluções para limpeza da pele etc).
111	Tinturas de cabelo.
70-89	<u>Xampus</u> e produtos para unhas.
50-69	Fixadores para cabelos cacheados, produtos para os olhos, condicionadores de cabelo.
30-49	Bronzeadores, desodorantes, depiladores, alisantes de cabelo.
20-29	Fragrâncias, dentifrícios e outros produtos para higiene bucal, batons e tônicos capilares.
10-19	Sabonetes, produtos para o banho e produtos infantis.
≤ 10	Descolorantes de cabelo, produtos para o barbear.

Fonte: CORBETT *et al.*, 1999.  
N= 1305 casos

No Brasil, o artigo 50 do Decreto no 79.094 de 05 de janeiro de 1977 dispõe sobre produtos de higiene e cosméticos para uso infantil e é claro quanto à proibição de xampus infantis com potencial irritante ocular:

“... Xampus destinados à limpeza do cabelo e do couro cabeludo das crianças por ação tensoativa ou absorção sobre sujidades podem ser apresentados em formas e veículos apropriados, mas sem ser irritantes ao couro cabeludo e aos olhos da criança, devem ser facilmente removíveis após a sua aplicação e o pH deve estar compreendido entre os limites de 7,0 (sete vírgula zero) e 8,5 (oito vírgula cinco)...”

É importante destacar, que tal legislação é a única existente em nosso país que trata da segurança dos produtos cosméticos em questão, e a mesma impõe limites quanto ao pH somente para a classe de xampus infantis. Sendo assim, não existem parâmetros para a faixa aceitável de pH para as outras categorias avaliadas, i.e. os condicionadores da linha infantil e os xampus e condicionadores de uso adulto. Vale ainda ressaltar que, todos os produtos contemplados no presente estudo foram avaliados quanto ao seu pH e que cerca de 65% dos xampus infantis encontravam-se fora da faixa preconizada pela legislação brasileira (DECRETO n° 79.094,1977).

Outro dado que evidencia a discrepância entre a Lei em vigor e a situação real dos produtos comercializados no município do Rio de Janeiro é o fato de cerca de 70% dos produtos acabados aqui avaliados (incluindo a maioria dos xampus da linha infantil) induzirem algum grau de irritação ocular pelo teste de Draize, o único teste oficialmente aceito para avaliação da irritabilidade ocular pela autoridade regulatória nacional.

A análise comparativa entre o potencial irritante ocular de xampus e condicionadores demonstra que, tanto para a linha adulta como para a linha de produtos recomendados para o público infantil, são os xampus os produtos que apresentam o maior potencial irritante. Todos os xampus da linha adulta foram considerados insatisfatórios no teste de Draize; 04 deles receberam a classificação de irritantes moderados e 02 irritantes severos. A situação é ainda mais crítica se considerarmos os produtos da linha infantil.

Dentre os 06 xampus infantis aqui estudados, somente 01 foi aprovado no teste de Draize, embora seu pH estivesse fora da faixa preconizada por Lei. Sendo assim, todos os xampus infantis foram considerados impróprios para comercialização e consumo, embora tenham sido adquiridos comercialmente. Tal fato demonstra a necessidade de intensificação de ações fiscalizadoras, exigindo o pleno cumprimento da Lei por parte de algumas indústrias de cosméticos.

## **5.2 Avaliação integrada: combinação de testes *in vitro* e *in vivo* na avaliação do potencial irritante ocular**

Poucos foram os testes de segurança que até hoje sofreram tão grande pressão pela sua abolição como o teste de irritação ocular de Draize. Dentre as razões que contribuíram para este cenário, podemos citar:

- i. O teste de Draize é um teste fácil de ser compreendido pela população em geral; enquanto que o grau de dor/desconforto ao qual os animais são submetidos durante o teste é difícil de ser explicado pelo meio científico (sobretudo antes do teste passar por um certo grau de refinamento, que eliminou a avaliação de substâncias corrosivas com  $\text{pH} < 2,0$  e  $> 11,5$ );
- ii. O teste de Draize sempre teve grande aplicação pela indústria de cosméticos e a opinião pública tem se mostrado pouco tolerante no que diz respeito à avaliação de segurança desta classe de produtos;
- iii. A existência de questionamentos sobre o poder preditivo do teste de Draize e sua real relação com o potencial irritante ocular em humanos.

Somado aos aspectos levantados acima, vale ressaltar o fato da comunidade científica ter, inicialmente, acreditado que a substituição do teste de Draize fosse uma tarefa mais simples do que de fato ela se revelou ser.

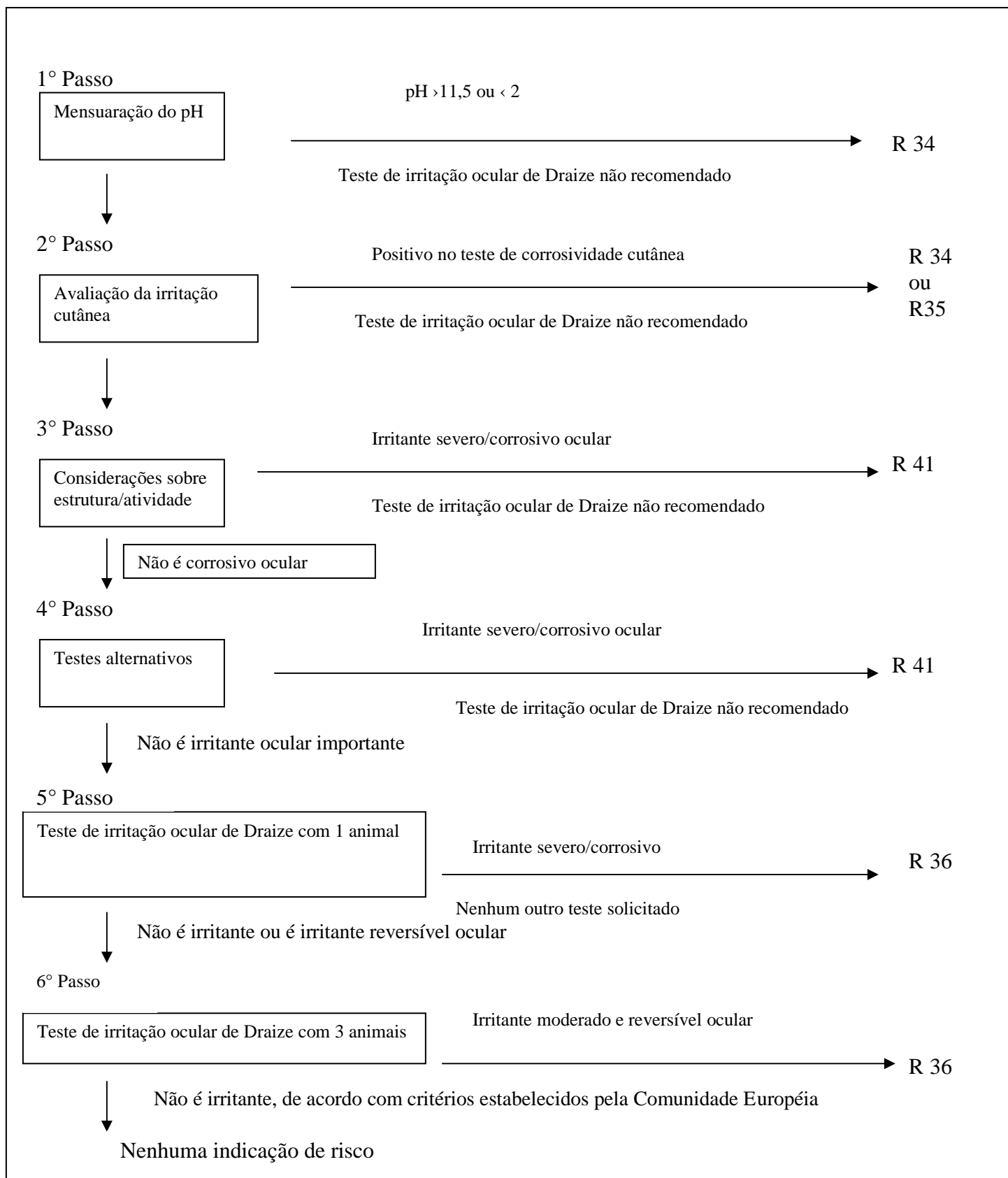
Desde o início da década de 1980, inúmeros testes alternativos ao teste de Draize foram sugeridos pela comunidade científica mundial (VIAN *et al.*, 1995; CLOTHIER *et al.*, 1988; CLOTHIER, 1995; CLOTHIER *et al.*, 2006; KNOX *et al.*, 1986; RIDDEL *et al.*, 1986; HOCKLEY & BAXTER, 1986.; LUEPKE & KEMPER, 1986.; LUEPKE, 1986; PAPE *et al.*, 1999; BURDICK *et al.*, 2002.; BURTON *et al.*, 1981; DE TORRES *et al.*, 1997.; PRICE & ANDREWS, 1985; TANI *et al.*, 1999.; GUILLOT, 1992; RENZI *et al.*, 1993; EUN & SUH, 2000; LAGARTO *et al.*, 2005; YANG & ACOSTA, 1994.; SPIELMANN, 1996; MARGIS & BOROJEVICH, 1989), porém alguns fatores dificultaram sua plena validação. O primeiro destes fatores diz respeito à complexidade das estruturas oculares. Para muitas das alternativas estudadas não se tem observado suficiente concordância entre os mecanismos que realmente influenciam o processo de irritação ocular e o desfecho proposto. Além disso, não há pleno conhecimento científico da biologia envolvida no processo de irritação ocular e, em humanos, os dados sobre o potencial irritante ocular de ingredientes e produtos são escassos (SPIELMANN & GOLDBERG, 1999).

Como a variedade de ensaios alternativos ao teste de Draize até hoje propostos não substituiu plenamente o uso de animais, a comunidade científica e órgãos regulatórios de alguns países (e.g. a agência regulatória alemã, o EPA e a OECD) vêm sugerindo uma estratégia integrada de avaliação, que compreenda a realização de ensaios *in vitro*, e em alguns casos, a aplicação do ensaio *in vivo* conforme descrito por Spielmann & Goldberg, 1999 (Figura 14).

Neste tipo de abordagem, os dados físico-químicos, a análise quanto à estrutura/atividade da substância química em questão e resultados obtidos a partir de ensaios *in vitro* e *in vivo* são levados em consideração para a avaliação do potencial irritante de novas substâncias químicas. Com esta abordagem integrada, substâncias classificadas como “perigosas para os olhos: causadoras de lesão severa ocular” (*i.e.* com

base na análise de resultados obtidos nas etapas preliminares, incluindo medida de pH, avaliação de dados relacionados ao potencial irritante cutâneo, considerações sobre estrutura/atividade e a realização de testes *in vitro*) não são testadas em animais. Somente as substâncias que apresentam resultados negativos na bateria de ensaios *in vitro* (até o passo 4 da Figura 14) são submetidas ao ensaio *in vivo*, mesmo assim tomando como precaução a utilização inicial de somente 01 coelho no teste de irritação ocular. Tal abordagem já é utilizada em diversos países membros da comunidade européia, porém segundo normas e diretrizes dos países membros, já não pode ser aplicada a produtos cosméticos, uma vez que a Europa já proíbe desde 2004 a comercialização de produtos cosméticos testados em animais e estabelece como novo prazo o ano de 2009 para a proibição definitiva do uso de animais na avaliação de segurança de ingredientes isolados (e.g. tensoativos) utilizados em cosméticos (DIRECTIVA 2003/15/EEC).

Figura 14: Estratégia para teste de irritação ocular de novas substâncias químicas de acordo com procedimentos de países membros da Comunidade Européia.



Onde:

*R36 – Produtos classificados como irritantes oculares moderados in vivo*

*R41 – Produtos classificados como irritantes severos/corrosivos oculares in vivo*

*R35 – Produtos classificados como corrosivos cutâneos in vivo*

*R34 - Produtos classificados como irritantes severos cutâneos in vivo*

---

### **5.3 Uso de métodos alternativos na avaliação do potencial irritante de cosméticos**

Diante do aumento no consumo de produtos cosméticos e devido às questões éticas relacionadas à diminuição do número de animais em pesquisa científica, sobretudo no controle da qualidade desta classe de produtos, os laboratórios brasileiros oficiais que controlam a qualidade de produtos sujeitos à Vigilância Sanitária devem estar particularmente atentos ao desenvolvimento, implantação e validação de metodologias alternativas. Uma das etapas do processo de validação consiste em estimar a variação intra-laboratorial do ensaio em questão, avaliando, inclusive, a variação dos resultados obtidos em diferentes ensaios por um mesmo analista e entre analistas diferentes.

No presente estudo observou-se um elevado valor de coeficiente de variação para alguns produtos acabados e também para alguns tensoativos. No entanto, este parece não ser de fato, um aspecto limitante para o ensaio proposto, já que de acordo com a OMS (WHO/VSQ/97.02), ensaios biológicos apresentam - via de regra - uma variação entre 5 e 20%, se considerarmos ensaios de ligação (*e.g.* imunoenaios) ou ainda, superiores a 50% quando consideramos ensaios realizados com linhagens celulares (*e.g.* ensaios de citotoxicidade) e/ou modelos animais (*e.g.* ensaios de toxicidade, pirogênio etc). Além disso, o fato do coeficiente de variação global do ensaio (30,00%) se encontrar dentro do limite preconizado para ensaios biológicos conduzidos com células, segundo protocolo de

validação de bioensaios da OMS, parece ser mais um indício de que o elevado coeficiente de variação de alguns poucos produtos não deva ser um fator limitante do ensaio proposto.

Em outro estudo realizado por nosso laboratório (COSTA, 2006), em que avaliamos através do método de QPT em células SIRC o potencial citotóxico somente de xampus (N=20) e tensoativos (N=5) foi encontrado um valor de CV% global de 16,82 (Tabela 13). Percebemos, desta forma, que os coeficientes de variação globais dos estudos diferem, sendo os dados de Costa, 2006 mais satisfatórios em termos de precisão inter-ensaio.

Para avaliar se a maior variabilidade encontrada no presente estudo se deveu à escolha da linhagem celular (e descartar a possibilidade de ser uma interferência da utilização de produtos de diferentes naturezas, *e.g.* o uso de condicionadores no presente estudo) recalculamos os CV%*s* globais com base nos valores obtidos com 17 amostras (12 xampus e 5 tensoativos), as únicas amostras que foram ensaiadas tanto no presente estudo como por Costa, 2006. Concluimos, assim, que os coeficientes de variação globais do método diferem quando utilizamos linhagens celulares distintas, e que os resultados dos ensaios conduzidos com células SIRC (CV% global: 18,43%) são mais satisfatórios em termos de precisão inter-ensaio do que os obtidos com as mesmas 17 amostras usando células 3T3 (CV% global: 31,00%). Também em termos do grau de preditibilidade do ensaio, nos parece que a utilização de células SIRC se mostra mais vantajosa, como veremos no item 5.3.1.



Tabela 13: Avaliação comparativa dos CV% globais do método de QPT com diferentes linhagens celulares.

	<b>N</b>	<b>Linhagem celular</b>	<b>CV% Global</b>
Presente estudo	25	3T3	30,00
	17*	3T3	31,00
Costa, 2006	25	SIRC	16,82
	17*	SIRC	18,43

\* Número de produtos/tensoativos usados em ambos os estudos.

### 5.3.1 Grau de preditibilidade do método proposto

Para a avaliação do grau de preditibilidade do teste *in vitro* em relação ao teste *in vivo* foi necessário o estabelecimento de um ponto de corte (*cut-off*) que possibilitasse a diferenciação de substâncias irritantes daquelas não-irritantes no teste *in vitro*. Após análise dos resultados obtidos *in vitro* e a avaliação destes, tendo como base os resultados obtidos *in vivo*, optamos pelo ponto de corte de 1,00mg/mL. Assim, amostras com  $IC_{50} < 1,00\text{mg/mL}$  foram consideradas como irritantes *in vitro*, enquanto aquelas com  $IC_{50} > 1,00\text{mg/mL}$  como não-irritantes.

Usando este valor como ponto de corte, obtivemos 5 resultados discordantes entre o teste *in vitro* e o teste *in vivo*, sendo 4 falsos positivos e 1 falso negativo, enfatizando uma maior fragilidade da célula 3T3 em relação a outras linhagens celulares (*e.g* SIRC), como mostram o resultados de sensibilidade, especificidade e precisão (Tabela 14).

Tabela 14: Avaliação comparativa da preditibilidade do método de QPT com diferentes linhagens celulares.

	<b>N</b>	<b>Sensibilidade</b>	<b>Especificidade</b>	<b>Precisão</b>
Costa, 2006 (SIRC)	25	100%	83%	96%
Presente estudo (3T3)	25	94%	43%	80%

A análise dos dados nos permitiu ainda concluir, que há uma melhor capacidade do método proposto em detectar produtos classificados como irritantes na metodologia *in vivo* (sensibilidade) do que aqueles classificados como não-irritantes (especificidade). A precisão do método foi de 96%, quando realizado com células SIRC e de 80% no presente estudo (Tabela 14).

Alguns erros de estimação que ocorrem na maioria dos ensaios de citotoxicidade parecem estar relacionados com a classe química das substâncias-teste. Substâncias que apresentam pH extremo, *i.e.* sabidamente irritantes *in vivo*, podem apresentar resultados subestimados *in vitro*. Por outro lado, substâncias com baixo potencial irritante *in vivo*, em alguns casos, podem apresentar resultados superestimados *in vitro*, devido ao fato dos parâmetros de medição serem mais sensíveis nos testes de citotoxicidade (SEIFREID, 1986; BENOIT *et al.*, 1987; GUILLOT, 1992; COSTA, 2006). Neste contexto, possíveis influências de componentes presentes no meio de cultura e outras características de exposição devem ser levadas em consideração:

- i.* Enquanto no teste *in vivo*, o olho dispõe de alguma proteção em relação ao contato com a substância irritante, como o extrato córneo e a produção de lágrimas, no ensaio *in vitro*, a cultura celular é exposta diretamente à substância teste (HERZINGER *et al.*, 1994);
- ii.* Alguns ingredientes do meio de cultura, como soro fetal bovino, glicose e algumas proteínas podem exercer efeito protetor nas células, já que tais substâncias do meio podem inativar algum produto testado (Costa 2006). Substâncias teste podem vir a sofrer interação com compostos do meio de cultura e assim, o efeito de substâncias ácidas ou alcalinas pode ser mascarado pela solução tampão presente no meio para incubação celular (HERZINGER *et al.*, 1994). Por outro lado, proteínas do meio podem desnaturar e gerar uma toxicidade não presente *in vivo* (COSTA, 2006). Algumas substâncias testadas, como, por exemplo, alguns tensoativos, interagem com proteínas do soro fetal bovino (HERZINGER *et al.*, 1994), fazendo com que o efeito tóxico dessas substâncias possa vir a ser mascarado *in vitro*;
- iii.* Adicionalmente, deve-se levar em consideração o fato das diferentes solubilidades apresentadas pelas diversas substâncias-teste nos meios de cultura, que também podem ser causa de resultados discordantes entre o teste *in vitro* e o teste *in vivo* (SEIFREID 1986; BENOIT *et al.*, 1987; GUILLOT, 1992; COSTA, 2006).

### 5.3.2 Confronto com dados da literatura

Existem diversos artigos na literatura científica que dizem respeito à investigação da aplicabilidade de testes de citotoxicidade para avaliação de produtos com potencial irritante ocular. Muitos deles utilizaram como corantes o MTT e/ou o vermelho neutro (NR) e foram realizados em células SIRC e 3T3 (DE ANGELIS *et al*, 1986; VIAN *et al*, 1995; CLOTHIER *et al*, 1988; CLOTHIER, 1995; CLOTHIER *et al*, 2006; KNOX *et al*, 1986; RIDDEL *et al*, 1986; GUILLOT, 1992; RENZI *et al*, 1993; EUN & SUH, 2000; YANG & ACOSTA, 1994; SPIELMANN *et al*, 1996; MARGIS & BOROJEVICH, 1989; BORENFREUND & PUERNER, 1985; DICKSON *et al*, 1993; HOCKLEY & BAXTER, 1986; PASTERNAK & MILLER, 1995; ROUGUET *et al*, 1992; SHOPSIS & ENG, 1992; TANI *et al*, 1999). Estudos utilizando a metodologia de QPT são um pouco mais escassos (KNOX *et al.*, 1986; RIDDEL *et al.*, 1986; CLOTHIER *et al.*, 1988; CLOTHIER, 1995; CLOTHIER *et al.*, 2006., VIAN *et al.*, 1995 e COSTA, 2006).

Desde sua criação até os dias de hoje, a metodologia de QPT vem sofrendo algumas modificações, como por exemplo, a adaptação do teste com placas de 24 poços (KNOX *et al.*, 1986; RIDDEL *et al.*, 1986; CLOTHIER *et al.*, 1988) para a utilização de placas com 96 poços (VIAN *et al.*, 1995; CLOTHIER, 1995; CLOTHIER *et al.*, 2006; COSTA, 2006). Em 1995, houve a publicação do protocolo nº15 do INVITOX - FRAME (CLOTHIER, 1995), afirmando que o corante utilizado no teste de QPT (Azul de Kenacid) poderia ser substituído pelo corante Azul Brilhante de Comassie R-250, sem nenhum tipo de prejuízo à técnica. Desta forma, o método pode ser realizado tanto com o corante Azul de Kenacid (KNOX *et al*, 1986; RIDDEL *et al*, 1986; CLOTHIER *et al*, 1988; CLOTHIER, 1995; CLOTHIER *et al*, 2006) quanto com o corante Azul Brilhante de Coomassie R-250 (VIAN *et al.*, 1995; Costa, 2006), como mostra a Tabela 15.

A Tabela 15 nos mostra ainda que os resultados do presente estudo são muito semelhantes aos encontrados por outros autores, que utilizaram o mesmo método em estudos conduzidos com células 3T3, ou mesmo com outras linhagens celulares, e que a utilização deste método permite diferenciar tensoativos quanto ao seu potencial irritante.

Tabela 15: Avaliação comparativa dos valores de IC<sub>50</sub> obtidos com tensoativos no presente estudo em comparação com modelos descritos na literatura.

Tensoativos	IC <sub>50</sub> (mg/ml)						
	3T3				SIRC	BCL-D1	
	*Presente estudo	#Riddel, <i>et al.</i> , 1986	#Clothier <i>et al.</i> , 1988	*Clothier <i>et al.</i> , 2006	*Vian <i>et al.</i> , 1995	*Costa, 2006	#Knox <i>et al.</i> , 1986
Tween 20	0,393	–	0,263	0,262	0,344	1,208	–
Lauril Éter	0,277	–	–	0,114	–	–	–
Lauril Sulfato de Sódio	0,062	0,100	0,090	0,072	0,080	0,040	0,084
Triton X	0,006	–	0,014	0,014	0,003	0,030	–
Cloreto de Benzalcônio	0,007	–	0,007	0,007	0,006	0,004	0,002
Brometo de Cetildimetiletilamônio	0,004	–	–	0,002	–	0,003	--

# Corante Azul de Kenacid, \*Corante Azul Brilhante de Coomassie R-250  
BCL-D1: fibroblasto humano

No entanto, na grande maioria das vezes, os estudos que buscam investigar a aplicabilidade de testes de citotoxicidade utilizam somente ingredientes isolados (como *e.g.* tensoativos), não sendo contemplados neste tipo de estudo os produtos acabados (WOLF *et al.*, 2001). Muitos produtos acabados apresentam em sua formulação um conjunto de tensoativos (2 a 4 tensoativos diferentes como *e.g.* catiônicos, aniônicos, anfotéricos e não-iônicos), e esta mistura de ingredientes dificulta a predição do potencial irritante. Esta é uma provável explicação para o baixo coeficiente de correlação de Pearson observado em nosso estudo entre os testes *in vitro* e *in vivo*, quando consideramos apenas produtos acabados (0,381), conforme demonstrado na Tabela 16

Tabela 16: Comparação dos valores de coeficiente de correlação de Pearson em diferentes ensaios de citotoxicidade.

		<i>SIRC</i>	<i>3T3</i>	<i>L929</i>
Vian <i>et al.</i> , 1995	NRU	-0,59 (N=20)*	-0,580 (N=20)*	-0,57 (N=20)*
	MTT	-0,59 (N=20)*	-0,620 (N=20)*	-
	QPT	-0,56 (N=20)*	-0,480 (N=19)*	-0,55 (N=20)*
Ohono <i>et al.</i> , 1999	NRU	-0,816 (N=35)*	-	-
	MTT	-	-	--
Tani <i>et al.</i> , 1999	NRU	-0,787 (N=30)*	-	-
Costa, 2006	QPT	-0,62 (N=21)*#	-	-
Presente Estudo			-0,611 (N=6)*	
	QPT	-	-0,381 (N=19)#	-
			-0,420 (N=25)*#	

\*Tensoativos

# Produtos acabados (xampus e condicionadores)

Com relação aos tensoativos, apesar do valor de coeficiente de correlação de Pearson ter se apresentado de melhor calibre (*e.g.* -0,611,  $p = 0,197$ ), tal valor não apresenta significância estatística. Devemos ressaltar o fato de que o número reduzido de amostras provavelmente influenciou a significância estatística (N=6).

No que se refere às estruturas oculares, podemos observar que as IC<sub>50</sub> dos testes *in vitro* se correlacionam melhor com as lesões ocorridas na conjuntiva do que na íris e córnea. Este dado se confirma na análise de todas as amostras avaliadas conjuntamente,

sendo tal correlação estatisticamente significativa na análise de produtos acabados + tensoativos, e somente tensoativos.

A face anterior do olho é recoberta pela córnea e pela conjuntiva. A córnea é a estrutura ocular mais exposta, e assim, é a estrutura mais susceptível à exposição química e conseqüente lesão ocular. Injúria corneal em testes com animais, após a exposição a substâncias fortemente irritantes/corrosivas, demonstra ser responsável por 73% do escore total de toxicidade ocular (ESAC/ECVAM, 2007). Por essa razão, modelos *in vitro*, que analisam possíveis lesões ocorridas na córnea apresentam melhor correlação com o teste de irritação ocular de Draize (sobretudo para substâncias com forte potencial irritante) e vêm sendo o principal foco dos estudos para o desenvolvimento de metodologias alternativas ao teste de irritação ocular de Draize.

Existem, neste contexto, dois métodos alternativos ao teste de irritação ocular de Draize em vias de receber a validação oficial para a avaliação de segurança de produtos cosméticos isolados, são eles: o BCOP (teste que avalia opacidade e permeabilidade corneal utilizando córnea isolada de bovino) e o ICE (teste que avalia opacidade e permeabilidade corneal, além da retenção de fluoresceína, utilizando córnea isolada de galinha). Tais métodos demonstram uma excelente correlação com o teste de irritação ocular de Draize (BURDICK *et al*, 2002.; BURTON *et al*, 1981). Cabe ressaltar que tanto o BCOP como o ICE foram recentemente validados (2007) como métodos integrantes de uma bateria de ensaios de triagem para a detecção de substâncias não cosméticas (agrotóxicos, pesticidas etc.) classificadas como irritantes severos/corrosivos oculares (ESAC/ECVAM, 2007).

Além da córnea, a íris é outra estrutura ocular investigada na avaliação da resposta a substâncias químicas no teste de irritação ocular de Draize. Existe concordância no meio científico de que, em geral, a avaliação *in vitro* de lesões ocorridas na íris não se faz necessária, já que a resposta desta estrutura ocular ocorre somente após uma significativa disrupção da barreira ocular anterior da córnea (BAGLEY *et al.*, 2006; ALTOX, 2007).

A conjuntiva é a terceira estrutura ocular investigada na avaliação da resposta a substâncias químicas no teste de irritação ocular de Draize. As lesões ocorridas na conjuntiva são responsáveis por apenas cerca de 18% do escore total de toxicidade ocular observado no teste de Draize (ALTOX, 2007). Por isso, testes alternativos que apresentam como desfecho final a medição de alterações vasculares, *i.e.* mais correlacionáveis à injúria de conjuntiva (*e.g.* HET-CAM), tendem a superestimar os resultados obtidos *in vivo* (CORRADO, 2007). Este parece ser também o caso do teste de citotoxicidade pelo método de QPT. Podemos dizer que a dificuldade em correlacionar a metodologia *in vitro* com a metodologia *in vivo*, assim como a baixa especificidade do método em questão, parece residir no fato de que o teste proposto demonstrou maior correlação com o efeito tóxico ocorrido na conjuntiva, que por sua vez, é a estrutura ocular que recebe o menor peso durante a análise do teste de irritação ocular *in vivo* (alterações de íris e córnea recebem peso 5, enquanto conjuntiva recebe peso 2, conforme etapa 1 do anexo 1).

Apesar de receber um menor peso no teste *in vivo*, a possibilidade de dano à conjuntiva não deve ser negligenciada. Lesões nesta estrutura ocular podem até ser consideradas de menor relevância em se tratando de produtos com potencial irritante moderado a severo, porém, a avaliação das lesões ocorridas na conjuntiva, são úteis na avaliação de efeitos mais leves, especialmente os ocasionados por produtos aplicados no olho propriamente dito e ao redor do mesmo (ALTOX, 2007). Cabe ressaltar que a avaliação da conjuntiva representa grande importância em termos de sistema vascular e imunológico, e que possíveis alterações nesta estrutura são importantes na resposta inflamatória relacionada ao processo de toxicidade ocular (ALTOX, 2007).

Assim, cada vez mais se torna clara a idéia de que uma metodologia substitutiva *in vitro* não deve ser utilizada isoladamente para a avaliação da irritação ocular, e sim através de um conjunto de outras metodologias alternativas, com capacidade de detecção de diferentes desfechos.



#### **5.4 Considerações finais**

De acordo com o publicado na 7ª Emenda da Diretiva 76/768/CEE (2000), países membros da União Européia se comprometem a “*abolir o uso de animais de forma definitiva e permanente no controle toxicológico de produtos cosméticos acabados*”. E complementam: “*A comissão se esforçará em obter o reconhecimento recíproco dos resultados de validação dos estudos in vivo/in vitro*”. Cabe ao profissional envolvido em questões como essa, o bom senso na utilização de abordagens alternativas, evitando sempre que possível o sofrimento e a morte desnecessárias dos animais e contribuindo para o desenvolvimento de pesquisa científica de melhor qualidade.

Neste contexto se inseriu o presente trabalho, buscando por alternativas que integram o modelo combinado de avaliação do potencial irritante ocular, ampliando o elenco de alternativas e aprimorando nosso conhecimento a respeito de vantagens, limitações e peculiaridades dos modelos propostos.

## VI. CONCLUSÕES

---

A análise dos resultados obtidos no presente estudo nos permite concluir, que:

- i. Cerca de 70% dos produtos acabados aqui avaliados induziram algum grau de irritação ocular no teste de Draize. Como este é o único teste preconizado pela autoridade regulatória nacional para a avaliação da irritação ocular, e mediante a legislação vigente, que proíbe a comercialização de xampus da linha infantil com potencial irritante, concluímos que há uma evidente discrepância entre a Lei em vigor e a situação real dos produtos acabados aqui avaliados. Nossos dados demonstram a necessidade de intensificação de ações fiscalizadoras, especificamente nesta área de atuação da Vigilância Sanitária;
- ii. A avaliação do coeficiente de variação do teste de QPT conduzido com células 3T3 mostrou um valor de CV% global de 30,00%. Embora este valor seja considerado adequado, segundo a OMS, para ensaios conduzidos com linhagens celulares, a comparação de nossos resultados demonstra que a utilização de células SIRC (CV% global 16,82%) é mais vantajosa em termos de precisão inter-ensaio;
- iii. Também em termos de sensibilidade, especificidade e precisão observamos resultados mais promissores quando da utilização de células SIRC (Costa, 2006). Ainda em relação ao grau de preditibilidade do método de QPT, pode-se concluir que há uma melhor capacidade em detectar produtos classificados *in vivo* como irritantes (sensibilidade = 94%) do que aqueles classificados *in vivo* como não irritantes (especificidade = 43%).

Nas condições experimentais do presente estudo, a precisão do método foi estabelecida em 80%;

- iv. A avaliação de tensoativos pelo método de QPT nos mostrou que este teste é capaz de diferenciar tensoativos quanto ao seu potencial irritante. Os valores de IC<sub>50</sub> obtidos nesta etapa do estudo foram muito semelhantes aos encontrados na literatura internacional, demonstrando que, pelo menos para ingredientes isolados, o método apresenta pouca variabilidade inter-laboratorial;
- v. A análise dos valores de correlação de Pearson entre os resultados obtidos *in vivo* e *in vitro* mostrou que o método de QPT em células 3T3 tende a apresentar valores de correlação de melhor calibre para tensoativos do que para produtos acabados. O fato de xampus e condicionadores serem constituídos, via de regra, por uma mistura de ingredientes é uma provável razão para a baixa correlação observada entre os testes para esta classe de produtos;
- vi. No que tange a análise das estruturas oculares, concluímos que os valores obtidos *in vitro* (IC<sub>50</sub>) se correlacionam melhor com as lesões ocorridas na conjuntiva do que na íris e córnea. Esta característica foi observada tanto quando analisamos dados de tensoativos, como quando consideramos produtos acabados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ABIHPEC. Dados de Mercado: Indicadores Econômicos. Disponível em: [http://www.abihpec.org.br/dadosdomercado.indicadores\\_economicos.php](http://www.abihpec.org.br/dadosdomercado.indicadores_economicos.php). Acessado em: 10/04/2008.

ALTOX - NON-ANIMAL METHODS FOR TOXICITY TESTING. Eye Irritation/Corrosion. 2007. Disponível em: <http://alttox.org/ttrc/toxicity-tests/eye-irritation/>. Acesso em 10/03/2008.

ALVES, M.J.M.; COLLI, W. Experimentação com animais: Uma polêmica sobre o trabalho científico. *Ciência Hoje*, v.39, n. 231, 2006.

ALVES, E.N. Red Blood Cell (RBC) – Teste de hemólise: uma alternativa ao teste de Draize – Irritação ocular na avaliação do poder tóxico de produtos cosméticos no controle de qualidade. Dissertação de Mestrado. Rio de Janeiro. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. 2003.

ANVISA. Guia para a avaliação da segurança de produtos cosméticos. Disponível em: [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br). Acesso em 31 Ago.2003.

BAGLEY, D.M.; CASTERTON, P.L.; DRESSLER, W.E.; EDENHouser, H.F.; KRUSZWEKI, F.H.; MCCULLEY, J.P.; NUSSENBLAT, R.B.; OSBORNE, R.; ROTHENSTEIN, A.; STITZEL, K.A.; THOMAS, K.; WARD, SL. Proposed a new classification scheme for chemical injury to the human eye. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 45, p.206-213, 2006.

BALLS M.; FENTEM, J. Progress towards the validation of alternatives tests. *Alternatives to laboratory animals.*, *Alternative to Laboratory Animals*, v.25, p.33-43, 1997.

BALLENTINE, C. Taste of Raspberry, taste of death. The 1937 Elixir of Sulfonamide incident. *FDA Consumer Magazine*. U.S Food and Drug Administration. 1981. Disponível em: <http://www.fda.gov/oc/history/elixir.html>. Acesso em: 18 mar. 2008.

BASKETEER, D.A.; GERBERICK, G.F.; KIMBER, I. The local lymph node assay: Current position in the regulatory classification of skin sensitizing chemicals. *Cutaneous and ocular Toxicology*, v. 26, n.4, p.293-301, 2007.

BASKETEER, D.A.; KIMBER, I. Information derived from sensitization test methods: test sensitivity, false positives and false negatives. *Contact Dermatitis*, v.56, n.1, p.1-4, 2007.

BASKETEER, D.A; GERBERICK, F; KIMBER, I .The local lymph node assay and the assessment of relative potency: status of validation. *Contact Dermatitis*, v.57, p.70-75, 2007.

BENOIT, M., CORMIER., J. WEPIERRE. Effect of proteins on the assessment of surfactant cytotoxicity by an *in vitro* test: possible correlations with *in vivo* data. *Toxicology in Vitro*, v.1, p.91–96, 1997.

BLAND, M.J. How should I calculate a within-subject coefficient of variation? Disponível em: <http://www-users.york.ac.uk/~mb55/meas/cv.htm>. Oct, 2006.

BLAND, M.J.; ALTMAN, D.G. Statistics notes: Measurement error proportional to the mean. Disponível em: <http://www.bmj.com/cgi/content/full/313/7049/106>. May 2008.

BORENFREUND, E., PUERNER, J. A. Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Letters*, v.24, p.119-124, 1985.

BRASIL – Decreto nº 79.094 de 05 de janeiro de 1977. Regulamenta a Lei nº6360 de 23 de setembro de 1976, que submete a sistema de Vigilância Sanitária de medicamentos, insumos farmacêuticos, drogas, correlatos, cosméticos, produtos de higiene, saneantes e outros. *Diário Oficial da União*, v.5, 1977.

BRUNER, L.H. Ocular irritation. *In Vitro Toxicology Testing: Applications to Safety Evaluation*. Marcel Dekker, Inc., New York, 1992.

BASKETEER DA, REYNOLDS FS, YORK M. Predictive testing in contact dermatitis: irritant dermatitis. *Clinical Dermatology*, v.15, p.637-644, 1997.

BURDICK, J.A.; MASON, M.N.; HINMAN, A.D.; THORNE, K.; ANSETH K.S. Delivery of osteoinductive growth factors from degradable PEG hydrogels influences osteoblast differentiation and mineralization, *J Control Release*, v. 63, p. 83-53, 2002.

BURTON, A.B.G.; YORK, M.; LAWRENCE, R.S. The *in vitro* assessment of severe eye irritants. *Food and Cosmetics Toxicology*, v.19, p.471-480, 1981.

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

CANN, A.J. *Descriptive Statistics. Maths from Scratch for Biologists*. West Sussex: John Willy & Sons Inc; 2003.

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

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

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

BALLS, M., BOTHAM, P.A., BRUNER, L.H., SPIELMANN, H. The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicology In Vitro*, v. 9, p.871-929, 1995.

CLOTHIER, R.H.; HULME, L.; AHMED A.B.; REEVES, H.L.; SMITH, M.; BALLS, M. In vitro cytotoxicity of 150 chemicals to 3T3-L1 Cells, assessed by the FRAME Kenacid Blue Method, *Alternatives to Laboratory Animals*, v.16, p.84-95, 1988.

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

CLOTHIER, R.; GOTTSCHALG, E.; CASATI, S.; BALLS, M. The FRAME alternatives laboratory databases. In vitro basal cytotoxicity determined by the kenacid blue total protein assay, *Alternatives to Laboratory Animals*, v.34, p.151-175, 2006.

COMMISSION STAFF WORKING document (Commission of the European Communities). Timetables for the phasing-out of animal testing in the framework of the 7<sup>th</sup> Amendment to the Cosmetics Directive (Council Directive 76/768/EEC). Brussels, 2004. SEC (2204): 1210.

CORBETT, J.K.; SHARMA, R.J.; DRESSLER, W.E. *Cosmetic Toxicology*. Academies Press. Califórnia. E.U.A. 1999.

CORRADO, M.C. Uso do HET-CAM como modelo alternativo ao teste de irritação da mucosa oral em hamsters na avaliação do potencial tóxico de dentifrícios. Dissertação apresentada para obtenção do Título de Mestre. Programa de Pós Graduação em Vigilância Sanitária. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. 2007.

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

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

DEANGELIS, I.; GIUBILEI, L.; STAMMATI, A.; ZAMPAGLIONI, F. In vitro toxicity of some cosmetic ingredients, *Food and Chemical Toxicology*, v.24, n. 6/7, p. 477-479, 1986.

DEBBASCH, C.; EBENHANH, C.; DAMI, N. Eye irritation of low irritant cosmetic formulation: correlation of *in vitro* results with clinical data and product composition. *Food and Chemical Toxicology*, v.43, p.155-165, 2005.

DECRETO n° 79.094 de 05 de Janeiro de 1977. Regulamenta a Lei n° 6360 de 23 de setembro de 1976, que submete a sistema de Vigilância Sanitária os medicamentos, insumos farmacêuticos, drogas, correlatos, cosméticos, produtos de higiene, saneantes e outros. Diário Oficial da União 1977.

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

DICKSON, F.M.; LAWRENCE, J.N.; BENFORD D.J. Surfactant-induced cytotoxicity in cultures of human keratinocytes and a commercially available cell line (3T3). Toxicology in Vitro, v.17, n. 4, p. 381-384, 1993.

DIRECTIVE 2003/15/EC. Amending Council Directive 76/768/EEC on the approximation of the law of the Member States relating to cosmetic products. Official J. L66, 2003; 11 march .

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. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, v. 83, p. 377-390, 1944.

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

EARL, A.D.; DICKENS, A.D.; ROWSON, M.J. A critical analysis of the rabbit eye irritation test variability and its impact on the validation of alternative methods. Toxicology in Vitro, v. 11, p.295-304, 1997.

ESAC/ECVAM. Toxin Binding Inhibition (ToBI) test for batch potency testing of tetanus vaccines for human use. EUROPEAN COMMISSION. Institute for Health and Consumer Protection. European Centre for Validation of Alternative Methods. 2000.

ESAC/ECVAM .ESAC statement on the conclusions of ICCVAM retrospective study o Organotopic in vitro assays as screening test to identify potential ocular corrosives and severe irritants determined by US EPA EU (R41) and UN GHS classification in a tired testing strategy, as part of weigh of evidence approach. EUROPEAN COMMISSION. Institut for Health and Consumer Protection. European Centre for Validation of Alternative Methods. 2007.

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

FILHO, J.A.M; MALTAGLIATI, L.A; TREVISAN, F.; GIL, C.T.A. Novo método estatístico para análise da reprodutibilidade. Rev. Dental. Press Ortodontia e Ortopedia Facial. Maringá. v.10, n.5, 2005.

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

FOOD AND DRUG COSMETIC ACT, 1938, Disponível em: <http://www.britannica.com/eb/topic-203396/Federal-Food-Drug-and-Cosmetic-Act>. Acesso em 12 mar. 2008.

GEURTSSEN, W.; LEHMAN, F.; SPAHL, W.; LEYHAULSEN, G. Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH, v.41, n. 3, p.474-480, 1998.

GREEN, H. The history of 3T3 cells: A voyage of discovery without an itinerary. Department of Pathology, New York University School of Medicine, New York.. Disponível em: . [www.Jcb.org](http://www.Jcb.org). Acesso em: .7 nov. 2006.

GUILLOT, R. Ocular irritation: present cell culture models and perspective. Third SPTC Meeting. Alternatives to Laboratory Animal, v. 20, p.471-475, 1992.

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

HENDRIKSEN, C.F.M. A short history of use of animals in vaccine development and quality control. Developments in Biological Standardization. n.86. p.3-10, 1994.

HERZINGER, T.; KORTING, H.C.; HOWARD, M.I. Assessment of Coetaneous and Ocular Irritancy: A Decade of Research on Alternatives to Animal Experimentation. Fundamental and Applied Toxicology, n.24, p.29-41, 1994.

HOCKLEY, K.; BAXTER, D. Use of 3T3 cell Neutral Red Uptake assay for irritants as an alternative to the rabbit (Draize) Test, Food chemical Toxicology, v.24, n.6/7, p.473-475, 1986.

HUDSON, M. Why do the numbers of laboratory animals procedures conducted continue to rise? An analysis of the Home Office Statistics of scientific Procedures on Living Animals: Great Britain 2005. ATLA, v.35, p.177-187, 2007.

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

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. Preparo de meios de cultura e soluções utilizadas em cultivo e linhagens celulares. Seção10 (n° 65.3440.008). Manual da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ; 1999.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. Ensaio de Irritação ocular. Seção 10 (n° 66.3330.004). Manual da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ; 2002.



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

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

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

LAGARTO A.; VEGA RY.; GUERRA I.; GONZALES, R. Comparative study of red blood cell in rat calves as alternatives to Draize test eye irritation. *Toxicology in Vitro*, v.14, p.529-533, 2005.

LIEBSCH, M.; SPIELMANN, H. Currently available *in vitro* methods used in the regulatory toxicology. *Toxicology Letters*, v. 127, n.1-3, p. 127-134, 2002.

LUEPKE, N.P. Hen's eggs chorioallantoic membrane test for irritation potential. *Food Chemical Toxicology*, v.23, p.287-291, 1985.

LUEPKE, N.P.; KEMPER, F.H. The HET-CAM test: An alternative o the Draize eye test. *Food and Chemical Toxicology*, v.24, n. 6/7, p.495-496, 1986.

MACKLIS, R.M. Radithor and the era of mild radium therapy. *Journal of American Medical Association (JAMA)*, v. 264, n.5, p.614-8, 1990.

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

MEHLING, A.; KLEBER, M.; HENSEN, H. Comparative studies on the ocular and dermal potential of surfactants. *Food and Chemical Toxicology*, v. 45, n.5, p.747-758, 2007.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. *GUIDELINES FOR THE CARE AND USE OF MAMMALS IN NEUROSCIENCES AND BEHAVIORAL RESEARCHES*. Washington DC. National Academy Press. 2003.

OECD Test Guideline 405. Acute eye irritation/corrosion, in: *OECD Guidelines for testing of Chemicals*.OECD. Paris, adopted 24 April 2002. OECD Paris.

OHNO, Y.; KANEKO, T.; INOUE, T.; MORIKAWA, Y.; YOSHIDA, T.; FUJI, A.; MASUDA, M.; OHNO, T.; HAYASHI, M.; MOMMA, J.; UCHYAMA, T.; CHIBA, K.; IKEDA, N.; IMANISHI, Y.; ITAGAKI, H.; KAKISHIMA, H.;KASAI, Y.; KOJIMA, H.; MATSUKAUA, K.; NAKAMURA, T.; OHKOSHI, K.; OKAMURA, H.; SAIJO, K.; SAKAMOTO, K.; SUZUKI, T.; TAKANO, K.; TATSUMI, H.; TANI, N.; USAMI, M.; WATANABLE, R. Interlaboratory validation of the *in vitro* eye Irritation test for cosmetic

ingredients. (1) Overview of the validation study and Draize scores for the evaluation of the tests. *Toxicology in Vitro*, v.13, n.1, p.73-98. 1999.

OSBORNE, W.J. Notes on the use of data transformations Practical Assessment, Research & Avaluation. A peer-rewied electronic journal. Vol.8, n.6, p.1-8, dec. 2005. Disponível em: <http://pareonline.net/getvn.asp?.v=8&n=6> . Acesso em 13 mar. 2008.

PAIXÃO, R.L. Experimentação Animal: Razões e Emoções para Uma Ética. Rio de Janeiro: Fiocruz. Dissertação (Doutorado) – Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca – ENSP, 2001.

PAPE, W.J, PFANNENBECKER U, ARGEMBEAUX H, BRACHER M, ESDAILE DJ, HAGINO S, KASAI Y AND LEWIS RL. COLIPA validation project on in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients and finished products (phase I): the red blood cell test for the estimation of acute eye irritation potentials. Present status, *Toxicology in Vitro*, v.13, p.343–354, 1999.

PASTERNAK, A.S.; MILLER, W.M. First order toxicity assays for eye irritation using cell lines: parameters that affect *in vitro* evaluation. *Fundamental and applied Toxicology*, v.25, p.253-263, 1995.

PRESGRAVE, O.A. Alternativas para animais de laboratório: do animal ao computador. In: ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; DE OLIVEIRA, R.S. Animais de laboratório – criação e experimentação, Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2002.

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

RAYMUNDO, M.M.; GOLDIM, J.R. Ética da pesquisa em modelos animais. *Bioética*, v.10, n.1, p.31-44, 2002.

RENZI, D.; VALTOLINA.; M.; FORSTER, R. The evaluation of a multi endpoint citotoxicity assay. *Italian Culture Meeting. Alternative to Laboratory Animals*, v.21, p. 86-89, 1993.

RIDDEL RJ, CLOTHIER RH, BALLS M. An evaluation of three in vitro cytotoxicity assays. *Food and Chemical Toxicology*. v.24, n.6/7, p.469-471, 1986.

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

ROUGUET, R.; DASSOU, .KG.; ROUGIER, A. Prediction of eye irritation potencial of surfactants using SIRC cells – NRU cytotoxicity test. *Third SPTC Meeting. Alternatives to Laboratory Animals*, n.20, p.451-456, 1992.

ROWAN, A.D. The three R's (reduction, refinement and replacement) of animals in experimentation: a historical perspective. Jkinon. PA: American Anti-vivisection Society, p.6-12, 1997.

ROWAN, A.N.; ANDRUTIS, K.A. Alternatives: A socio-politics commentary from the USA. Alternatives to Laboratory Animals (ATLA), v.18, p.3-10, 1990.

RUSELL, W.M.S.; BURCH, R.L.; Principles of Human Experimental Technique, UFAW, England: Hyperion Books Inc., 1959.

SEIFREID, H.E. Eye irritation testing: historical perspectives and future directions. Journal of Toxicology – Coetaneous and Ocular Toxicology, v.5, p.89-114, 1986.

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

SINA, J.F.; GALER, D.M.; SUSSMAN, R.G.; GAUT HERON P.D.; SARGENT, E.V.; LEONG, P.V.; SHAH, P.V.; CURREN, R.D.; MILLER, K. A collaborative evaluation of seven alternatives to the Draize Eye Irritation Test using pharmaceutical intermediates. Fundamental and Applied Toxicology, v.26, p.20-31, 1995.

SINGER, P. Animal Liberation. Towards an end to man's inhumanity to animals. Granada Publishing, 1975.

SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES TÓXICO-FARMACOLÓGICAS (SINITOX).2005. Casos registrados de intoxicação humana e envenenamento. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/sinitox>. Acesso em 10 de abril de 2008.

SPIELMANN, H.; LIEBSCH, M.; KALWEIT, S.; MOLDENHAUER, F.; WIRNSBERG, T.; HOLZHUNTTER, H.G.; SCHNIDER, B.; GLASER, S.; GEMER, I.; PAPE, W.J.W.; KREILING, R.; KRAUSER, K.; SPENGLER, J.; BERTRAMNEIS E.; SIEGMUND, B.; WIEBEL, F.J. Results of a validation study in Germany on two in vitro alternatives to the Draize eye irritation test, the HET-CAM test and the 3T3 NRU cytotoxicity test. Alternative to Laboratory Animals (ATLA),v.24, n.5, p.741-858, 1996.

SPIELMANN, H. Animal Use in the Safety Evaluation of Chemicals: Harmonization and Emerging Needs. ILAR, v.43, p11-17, 2002.

SPIELMANN, H.; GOLDBERG, A.M. *In vitro* Methods in Toxicology. In: H. MARQUARDT, S. SCHAFER, R. MCCLELLAN AND F. WELSCH.(Ed).Toxicology, San Diego: Academic Press, 1999.

TANI, N.; KINOSHITA, S.; OKAMOTO, Y.; KOTANI, M.; ITAGAKI, H.; MURAKAMI, N. Interlaboratory validation of in vitro eye irritation test for cosmetic ingredients. Evaluation of cytotoxicity test on SIRC cells. Toxicology *in Vitro*, v.13, p. 175-187, 1999.

TODARO, G.J.; GREEN, H. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *Journal of cellular Biology*, v. 17, p. 299-313, 1963.

TRUETA, J. Care of thalidomide babies. Experience in Germany. *Lancet*. v.1, n.2, p.1162-3, 1962.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements. Part 2: Validation. Global Program for Vaccines and Immunization Vaccine Supply and Quality. Global Network. World Health Organization. Geneva. 1997.

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

WILLSHAW, A.; MOORE, L.J.; BALLS, M. *In vitro* alternatives for the detection of photoirritant chemicals: The EEC/COLIPA trial. *Toxicology in Vitro*, v.18, n. 4, p.723-725, 1994.

WOLF, R.; WOLF, D.; TÜZÜN, Y. Soaps, shampoos and detergents. *Clinics in Dermatology*, v.19, p. 393-397, 2001.

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

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

YANG, W.; ACOSTA, D. Cytotoxicity potential of surfactants mixtures evaluated by primary cultures of rabbit corneal epithelial cells. *Toxicology Letters*, v.70, p.309-318, 1994.

## ANEXO

---

### Teste *in vivo*:

Serão utilizados dados provenientes do banco de dados do DFT/INCQS. Os ensaios *in vivo* foram realizados segundo o POP n° 65.333.004 do INCQS/FIOCRUZ <sup>11</sup>, cujo objetivo é a detecção e avaliação do potencial de irritabilidade para o homem de qualquer substância ou produto acabado que possa vir a entrar em contato com os olhos.

O teste de Draize permite cinco classificações dos produtos quanto ao seu potencial irritante ocular, são elas: não irritantes (NI), irritante leve (IL), irritante moderado (IM), irritante severo (IS) e irritante máximo (IMax).

- 1) Animais: Coelhos albinos, machos ou fêmeas da raça Nova Zelândia, hípidos e com peso corpóreo acima de 2,0 Kg. Foram utilizados 5 animais por amostra/substância-teste
- 2) Acondicionamento: Os animais foram mantidos em gaiolas individuais em condições controladas de temperatura (20 +/- 2°C) e umidade relativa do ar (30 – 70%) e ciclo claro/escuro constante (12 horas cada). Os animais receberam ração e água *ad libidum*.
- 3) Preparo dos animais: Ambos globos oculares de cada animal foram examinados 24 horas antes do início do ensaio. Os animais que apresentaram injúrias na conjuntiva e globo ocular foram descartados.
- 4) Aplicação: Instilou-se 0,1 mL do produto no saco conjuntival inferior e, em seguida massageou-se gentilmente durante 30 segundos. As substâncias ou produtos fortemente ácidos ou alcalinos (pH menor que 2,0 e maior que 11,5) não foram testados, pois são reconhecidamente corrosivos.
- 5) Leitura: Foram realizadas leituras, por três analistas, nos períodos de 24h, 48h, 72h e 7 dias, para a observação das alterações e graduação das lesões (Quadro 1)
- 6) Avaliação dos resultados: Foi dividida em etapa I e etapa II

### ETAPA I:

- 1) Determinação da quantificação da lesão ocular

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

$L_{xt} = [(A \times B) \times 5 + (C \times 5) + [(D+E+F) \times 2]]$ . Onde:

$L_{xt}$  – Leitura de um animal em um intervalo de tempo (t)

A – densidade da opacidade

B – área da opacidade

C – irite

D – hiperemia

E – quimose

F – secreção

- 2) Seleção da maior média aritmética entre as médias de 24, 48, 72 horas ( $ME_{24h}$ ,  $ME_{48h}$ ,  $ME_{72h}$ )

Seleciona-se a média de valor máximo (ME max), e posteriormente calcula-se a faixa de confiança de acordo com a seguinte equação:  $FC = ME_{max} \pm 5$ , onde:

Fc – faixa de confiança

MEMAX – média aritmética de maior valor entre os tempos de 24h, 48h e 72h.

Uma vez selecionada a ME max verifica-se se pelo menos dois valores de  $L_{xt}$  encontram-se dentro da Fc. Se tais valores forem encontrados, deve-se considerar o MEMax e utilizar a tabela 2, referente à classificação prévia do produto.

Tabela 2: classificação prévia do potencial de irritabilidade de um produto

Classe	Faixa/Escores	Classificação
I	0,0 a 14,9	Produto não –irritante (NI)
II	15,0 a 24,9	Produto levemente irritante (IL)
III	25 a 49,9	Produto irritante moderado (IM)
IV	50,0 a 79,9	Produto irritante severo (IS)
V	80,0 a 110,0	Produto Irritante Máximo (IMax)

#### ETAPA II – Classificação final do potencial de irritabilidade ocular

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

Tabela3: Classificação final do potencial de irritabilidade ocular de um produto

Classificação	Confirmação da classificação inicial
Não irritante (classe I)	$M_{24h} < 2.4$ – classe I; se $M_{24h} > 2.4$ ir para classe II
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 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 a classe V (2) $L_{7d} \leq 30$ em pelo menos 3 animais, classe IV; se $L_{7d} > 60$ em pelo menos um animal, classe V
Irritante máximo (classe v)	(1) $M_{7d} > 40$ , ir para item (2) (2) $L_{7d} > 60$ em pelo menos 1 animal, classe V

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

Gradação							
Estrutura		Alteração	0	1	2	3	4
Córnea	O	Quanto à densidade	Nenhuma área afetada	Área difusa ou disseminada, ligeira perda de brilho	Áreas translúcidas facilmente discerníveis, detalhamento da íris ligeiramente dificultado.	Área opalascete, nenhum detalhamento visível da íris.	Opaca. Íris invisível
	P						
	A	Quanto à área afetada	Sem opacidade	¼ (ou menos), mas nunca zero	Entre ¼ e ½ da córnea	Entre ½ e ¾	Entre ¾ e área total
	C						
	I						
	D						
A	Irite	Íris normal	Raias com congestão, edema, congestão circuncorneal, íris ainda reativa à luz	Nenhuma reação à luz, hemorragias, destruição de tecido	X	X	
D							
Conjuntiva	Hiperemia	Vasos normais	Vasos injetados acima do normal	Congestão difusa, vasos visualizados com muita dificuldade.	Congestão difusa. Não visualização de vasos	X	
							Quimose
Secreção	Ausência de secreção	Quantidade pequena de secreção	Umedecimento de pálpebras e pêlos adjacentes	Umedecimento severo de área ao redor do olho	X		





