

MARCIA DA CONCEIÇÃO CORRADO

USO DO MÉTODO HET-CAM COMO MODELO ALTERNATIVO AO
TESTE DE IRRITAÇÃO DA MUCOSA ORAL EM HAMSTERS NA
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TÓXICO DE DENTIFRÍCIOS.

PPGVS/INCQS

FIOCRUZ

2007

USO DO MÉTODO HET-CAM COMO MODELO ALTERNATIVO AO
TESTE DE IRRITAÇÃO DA MUCOSA ORAL EM HAMSTERS NA
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TÓXICO DE DENTIFRÍCIOS.

MARCIA DA CONCEIÇÃO CORRADO

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

2007

USO DO MÉTODO HET-CAM COMO MODELO ALTERNATIVO AO TESTE DE
IRRITAÇÃO DA MUCOSA ORAL EM HAMSTERS NA AVALIAÇÃO DO
POTENCIAL TÓXICO DE DENTIFRÍCIOS.

Márcia da Conceição Corrado

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.

Aprovada:

Profa. Dra Manuela da Silva

Profa. Dra Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira

Profa. Dra Martha de Luca

Orientadora: Dra Isabella Fernandes Delgado

Rio de Janeiro

2007

Corrado, Márcia da C.

Uso do método HET-CAM como modelo alternativo ao teste de irritação da mucosa oral em hamsters na avaliação do potencial tóxico de dentifrícios/ Márcia da Conceição Corrado. Rio de Janeiro: INCQS/ FIOCRUZ, 2007.

Xv,68 p., il., tab.

Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Qualidade em saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2007. Orientadora: Isabella Fernandes Delgado.

1.HET-CAM. 2. Métodos alternativos 3. Teste de irritação da mucosa oral 4. Dentifrícios. I. Título.

Dedico este trabalho aos meus pais que compartilharam comigo desta realização.

Dedico aos meus familiares, que me incentivaram, fazendo com que eu buscasse nesse incentivo, forças para superar os momentos difíceis.

Dedico este trabalho, enfim, àqueles que se ocupam da ciência, levando às instituições soluções práticas, fundamentais na pesquisa científica .

AGRADECIMENTOS

A Eloísa Nunes Alves, por toda ajuda, orientação e por partilhar o conhecimento com tanta humildade, e cuja gratidão não conseguiria expressar numa frase.

A Octavio e Rosaura Presgrave, pelas valiosas contribuições e orientações.

A minha orientadora Isabella Fernandes Delgado, pela forma como me incentivou e apoiou neste trabalho.

A toda equipe do Departamento de Farmacologia e Toxicologia do INCQS

A todos os Professores que no decorrer deste período me permitiram compartilhar de seus conhecimentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – FIOCRUZ.

E acima de tudo agradeço a Deus, origem, razão e fim de todas as coisas, e cujos desígnios impenetráveis tornam minha existência um contínuo ato de descoberta e aprendizado.

RESUMO

Certos ensaios toxicológicos utilizados no controle de qualidade de produtos têm sido questionados por grupos defensores do bem estar dos animais por levarem ao sacrifício e sofrimento injustificado de um número extraordinário de animais. Além de questões éticas, a busca por métodos alternativos é uma questão de grande relevância para os laboratórios oficiais de controle da qualidade. O método HET-CAM (*Hens Egg Test-Chorion Allantoic Membrane*) vem sendo estudado como método alternativo ao teste de irritação ocular em coelhos. No entanto, estudos que busquem avaliar a relação entre os efeitos induzidos *in vivo* em outras mucosas (e.g. mucosa oral) e o HET-CAM são ainda escassos. Neste sentido, o objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial de irritação de dentifrícios de uso adulto, apreendidos por Secretarias Estaduais e/ou Municipais de Saúde, e de uso infantil, adquiridos comercialmente no Município do Rio de Janeiro; comparando os resultados obtidos em ensaio *in vivo* com aqueles obtidos no método HET-CAM, abordando as vantagens e desvantagens de cada método. O teste *in vivo* de irritação da mucosa oral foi realizado em hamsters, conforme preconizado pela ISO 10.993 – Parte 10. Dependendo do seu potencial irritante, um produto é classificado como: não-irritante (NI), minimamente irritante (IMin), irritante leve (IL), irritante máximo (IM) e irritante severo (IS). Para o teste *in vitro*, seguiu-se o método oficial de avaliação do potencial irritante no ovo de galinha, tendo como princípio a observação dos efeitos irritantes quando em contato com a membrana córion-alantóide do ovo no décimo dia de incubação. No método HET-CAM os produtos foram testados em diluições de 10% (triplicata) e 100% por dois analistas, em ensaios independentes. Este teste permite as seguintes classificações: NI, IL, IM e IS. Foram analisados vinte produtos, sendo dez da linha adulta e dez da linha infantil. No método *in vivo*, todos os produtos da linha adulta foram considerados irritantes. Dentre os produtos infantis, 60% foram considerados como não-irritantes ou minimamente irritantes, os demais foram classificados como irritantes leves. Com exceção de um produto da linha adulta, todos os dentifrícios aqui estudados apresentaram valores de pH dentro da faixa de segurança recomendada pela norma internacional ISO11.609. Com relação ao HET-CAM, não houve discordância entre a classificação final atribuída por cada um dos analistas para os produtos estudados, quando os mesmos foram avaliados na concentração de 10%. Já na análise dos produtos puros, observou-se discordância na classificação atribuída pelos analistas. A análise da correlação existente entre os valores de escores obtidos *in vivo* e *in vitro* demonstrou que os índices de irritação obtidos em hamsters se correlacionaram melhor com os valores obtidos no HET-CAM quando os produtos foram testados a 10%, do que quando testados puros. Para avaliar o grau de preditibilidade do teste *in vitro* em relação ao modelo animal, estabeleceu-se um ponto de corte para a diferenciação de produtos com baixo potencial de irritação ($I_i \leq 4,99$) daquelas com potencial irritante ($I_i \geq 5,00$). Parâmetros como precisão (85%), sensibilidade (100%) e especificidade (50%) foram determinados. Nosso estudo permite concluir que, embora haja uma correlação satisfatória entre os resultados obtidos *in vitro* e no teste de irritação da mucosa oral em hamsters, o HET-CAM tende a superestimar os resultados. Recomenda-se, portanto, que os produtos considerados positivos no HET-CAM sejam submetidos a outros ensaios *in vitro* (e.g. citotoxicidade, RBC, olho isolado etc) para confirmação da classificação irritante.

ABSTRACT

Animal welfare groups criticize some toxicological assays, applied in the quality control of products, because of the unjustified suffering of an extraordinary number of animals. Apart from the ethical reasons, the search for alternative methods is a matter of great relevance to the official quality control laboratories. The method HET-CAM (Hens Egg Test-Chorion Allantonic Membrane) is under study as an alternative for the eye irritation test, which is normally performed in rabbits. Studies that intend to evaluate the correlation between the effects induced *in vivo* in other mucosa (for example oral mucosa) and the HET-CAM, however, are scarce. In this logic, the main goal of the present study was to evaluate the irritation potential of adult's toothpaste, confiscated by the Secretary of Health from Rio de Janeiro State and/or City, and of commercially available infant's toothpaste, comparing the results obtained *in vivo* with the ones obtained with the HET-CAM method. The advantages and disadvantages of both methods were also considered. The oral mucosa irritation test *in vivo* was performed in hamsters, as established by ISO 10.993-Part 10. The products were classified, according to the irritability potential, as follows: not irritant (NI), minimally irritant (IMin), slightly irritant (IL), maximally irritant (IM) and severely irritant (IS). Concerning the *in vitro* test, the official method for the evaluation of the irritant potential for application of products on the chorion allantonic membrane of hen eggs was performed and the principle followed was that only eggs at the tenth incubation day were used for the application of substances and observation of effects. In the HET-CAM method, two autonomous analysts tested the products pure (100%) and 10% (triplets) diluted, in independent assays. This test allows the following classification: NI, IL, IM and IS. Twenty products were analyzed, 10 products for adults and the other 10 for infants. In the *in vivo* method, all products for adults were considered irritants. Within the infant's products, 60% were considered not irritant or minimally irritant, whereas all the rest were classified as slightly irritant. Except for one adult product, all the other toothpastes studied in this monograph presented a pH level within the security range recommended by the international norm ISO11.609. Concerning HET-CAM, there was no disagreement between the two analysts for the final classification of the products 10% diluted. For the analyses of the pure products, however, divergence on the classification established by the two analysts was observed. The study of the correlation between the values of the scores obtained *in vivo* and *in vitro* showed that the irritation index obtained in hamsters associated better with the HET-CAM method performed with the diluted products when compared to the results obtained for the pure products. With the purpose of evaluating the grade of predictability of the *in vitro* test in comparison to the animal model, a cut-off was established for differentiation between products with low irritancy potential ($I_i \leq 4,99$) and the ones with irritant potential ($I_i \geq 5,00$). Parameters like precision (85%), sensibility (100%) and specificity (50%) were determined. Our study allow us to conclude that, although a satisfying correlation between the results obtained *in vitro* with the oral mucosa irritation test in hamsters was observed, there is a tendency of overestimation of the results with the HET-CAM method. It is, therefore, recommended that products classified as positive with the HET-CAM might be submitted to further investigation using other *in vitro* assays (such as citotoxicity, RBC, isolated eye etc) in order to confirm the label of irritant.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABIHPEC - Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
- ATLA – *Alternative to Laboratory Animals*.
- BCOP - *Bovine corneal opacity and permeability test*.
- BPI - Baixo Potencial de Irritação.
- CAM–TBS - *Chorioallantoic Membrane-Trypan-Blue Staining*.
- CCTCI - Comissão de Ciência e Tecnologia, Comunicação e Informática.
- CDCMAM - Comissão de Defesa do Consumidor, Meio Ambiente e Minorias.
- CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais.
- COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.
- CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal.
- ECC - Comunidade Econômica Européia.
- ECVAM – *European Commitee for Validation of Alternative Methods*.
- EMALT - Encontro sobre Métodos Alternativos ao Uso de Animais para Fins Regulatório
- HET – *Huhner-Embryonen Test*.
- HET-CAM - Hens Egg Test- Chorion Allantoide Membrane.
- ICCVAM - *The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*.
- Ii – Índice de Irritação.
- IL – Irritante Leve.
- IM – Irritante Moderado.
- IMin – Minimamente Irritante.
- IS – Irritante Severo.
- ISO - *International Organization for Standardization*.
- NI – Não Irritante.
- NRU- *Neutral Red Uptake*.
- OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development.

PFL – Partido da Frente Liberal.

RBC - *Red Blood Cell Hemolysis Test*.

SINITOX: Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológica.

SIFT - *Skin Integrity Function Test*

UFAW - *Universities Federation for Animal Welfare*

.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dentifrícios: uso, código, fabricante, marca e composição.....	25
Tabela 2 - Graduação dos fenômenos em relação ao tempo.....	29
Tabela 3 – Sistema de classificação microscópica.....	31
Tabela 4 –Classificação final do teste de irritação da mucosa oral em hamsters.....	32
Tabela 5 – Resultados obtidos no teste de irritação da mucosa oral em hamsters.....	34
Tabela 6- Resultados obtidos no ensaio HET-CAM.....	50
Tabela 7-Coeficiente de correlação de Pearson e Spearman entre os resultados obtidos pelos diferentes analistas.....	52
Tabela 8 – Classificação dos produtos em relação aos testes in vivo e o HET-CAM.....	54
Tabela 9- Coeficiente de correlação de Pearson e Spearman entre os teste - in vivo e o HET CAM.....	55
Tabela 10- Coeficiente de correlação de Pearson e Spearman entre os diferentes parâmetros avaliados no teste in vivo e o HET-CAM.....	56
Tabela 11-Freqüência de concordância de resultados entre os ensaios in vivo e in vitro.....	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ilustração do Teste Draize	05
Figura 2 – Cartaz de protesto contra o Teste Draize	06
Figura 3 – Membrana córion-alantóide (CAM) de ovo embrionado de galinha	19
Figura 4– Fenômenos epiteliais ocorridos após aplicação de produtos na bolsa gutural de hamsters	41
Figura. 4a - Epitélio – normal	41
Figura 4b– Epitélio – grau 1	41
Figura 4c – Epitélio – grau 2	41
Figura 4d – Epitélio – grau 3	41
Figura 5 – Infiltrado leucocitário ocorrido após aplicação de produtos na bolsa gutural de hamsters	43
Figura 5a– Infiltrado – grau 0	43
Figura 5b – Infiltrado – grau 1	43
Figura 5c – Infiltrado – grau 2	44
Figura 5d – Infiltrado – grau 3	44
Figura 5e– Infiltrado – grau 4	44
Figura 6 - Fenômenos congestivos ocorridos após aplicação de produtos na bolsa gutural de hamsters	46
Figura 6a– Congestão – grau 0	46
Figura 6b –Congestão – grau 1	46
Figura 6c – Congestão – grau 2	46
Figura 7 - Edemas ocorridos após aplicação de produtos na mucosa oral na bolsa gutural de hamsters	48
Figura 7a– Edema – grau 0	48
Figura 7b –Edema – grau 1	48
Figura 7c – Edema– grau 2	48

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico1- Frequência das alterações macroscópicas observadas 24 horas após a última aplicação.....	39
Gráfico 2-Fenômenos epiteliais ocorridos após a aplicação dos produtos	40
Gráfico 3 - Ocorrência de Infiltrado leucocitário após aplicação dos produtos.....	43
Gráfico 4 - Reações congestivas ocorridas após aplicação dos produtos.....	45
Gráfico 5- Ocorrência de edema em animais tratados com os produtos.....	47

LISTA DE QUADROS

Quadro1- Exemplos de métodos validados/aceitos para fins regulatórios segundo o ECVAM.....	11
Quadro 2- Lista de substâncias que os produtos de higiene bucal não devem conter , exceto nas condições e restrições estabelecidas.....	63
Quadro 3- Registro do FDA quanto à incidência de reações adversas provocadas por produtos cosméticos nos EUA entre 1987 e 1995.....	70
Quadro 4- Perspectiva de validação de métodos alternativos para avaliação de segurança de produtos cosméticos.....	74
Quadro 5- Exemplos de métodos alternativos válidos para avaliação da toxicidade de produtos acabados, comumente usados pela industria de cosméticos.....	76

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE GRÁFICOS	xiii
LISTA DE QUADROS.....	xiv
I. INTRODUÇÃO	01
I.1 Considerações Gerais.....	01
I.2 Métodos Alternativos ao Uso de Animais de Laboratório.....	03
I.3 Debates atuais sobre o uso de animais em pesquisa científica no Brasil	07
I.4 Métodos Alternativos Validados.....	10
I.5 Produtos Cosméticos.....	14
I.6 Teste de irritação da mucosa oral.....	17
I.7 Teste HET-CAM.....	18
I.8 Relevância do Estudo.....	19
II. OBJETIVOS	21
III. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
III.1 Solução empregada.....	22
III.2 Equipamentos utilizados.....	22
III.3 Materiais e reagentes de uso geral.....	23
III. 4 Produtos.....	23
III.5 Teste HET-CAM.....	28
III.6 Teste de irritação da mucosa oral em hamsters.....	30
III.7 Análise estatística.....	32
IV.RESULTADOS.....	34
IV.1 Ensaio <i>in vivo</i>	34
IV.2 Ensaio <i>in vitro</i>	49
IV.3 Correlação entre o teste <i>in vitro</i> e o teste HET-CAM.....	53

IV.4 Grau de preditibilidade do teste HET-CAM em relação ao teste de irritação da mucosa oral em hamsters.....	57
V. DISCUSSÃO.....	59
V.1 Toxicologia de Produtos Cosméticos.....	68
V.2 Uso do método HET-CAM na avaliação do potencial irritante de dentifrícios.....	71
V.3 O método HET-CAM.....	72
V.4 Concordância de resultados entre o método HET-CAM e o teste de irritação da mucosa oral em hamsters.....	76
VI. CONCLUSÃO.....	78
VII.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

I. INTRODUÇÃO

I.1 Considerações Gerais

A intervenção da autoridade regulatória no mercado é fundamental e se justifica face à necessidade de garantir a saúde da população e os direitos do consumidor. No entanto, alguns ensaios toxicológicos utilizados no controle da qualidade de produtos, *e.g.* testes de rotina descritos nas Farmacopéias ou em diretrizes internacionais, tais como o teste *in vivo* para detecção de contaminantes pirogênicos, o teste de determinações de DL₅₀ em ratos e camundongos e os testes de irritação dérmica e irritação ocular em coelhos têm sido questionados pelos grupos defensores do bem estar dos animais por levarem ao sacrifício e sofrimento injustificado de um número extraordinário de animais.

Os grupos de defesa ambiental e aqueles que argumentam a favor da abolição da experimentação animal têm encontrado um suporte significativo na Europa e Estados Unidos, e suas idéias têm se expandido por todo o mundo. Assim, a necessidade de realização de ensaios utilizando animais tem sido seriamente questionada por camadas poderosas da sociedade, seja no âmbito político, social ou ético. Esta tendência internacional vem se tornando aparente também no Brasil, onde instituições de pesquisa como a FIOCRUZ já contam com Comissões especializadas em analisar, caso a caso, a utilização de animais de laboratório (Comissão de Ética em Uso de Animais - CEUA/FIOCRUZ).

Com a tendência mundial de substituição do uso de animais, algumas indústrias internacionais como, por exemplo, a de cosméticos passaram a desenvolver e apresentar resultados de testes *in vitro* para a comprovação da segurança de seus produtos. Além de questões éticas, a busca por métodos alternativos que apresentem vantagens tais como maior confiabilidade, redução de custos e maior facilidade de difusão e incorporação por outros laboratórios é uma questão de grande relevância para os laboratórios oficiais de controle da qualidade.

Assim sendo, os laboratórios de controle da qualidade devem se adequar a esta nova realidade, procurando desenvolver, implantar e validar métodos alternativos que se mostrem

eficientes e úteis ao controle toxicológico de produtos sujeitos à ação da Vigilância Sanitária. Neste caso, pode-se dizer que a indústria química, ou mesmo os órgãos governamentais de regulamentação e controle da qualidade estão sob crescente pressão para substituir a experimentação animal por métodos que não utilizem animais na avaliação toxicológica de novos produtos (Eun & Suh, 2000).

No caso específico de produtos cosméticos é bastante evidente esta pressão, sobretudo após a publicação da Diretiva 76/768/EEC (UNIÃO EUROPÉIA, 2003), que é atualmente a base da legislação técnica europeia em cosméticos. O artigo 4 de sua 6ª Emenda estabeleceu que os testes em animais para avaliação da segurança de produtos cosméticos, de higiene e perfumes fossem definitivamente banidos até o mês de junho de 2006. Porém mediante as dificuldades encontradas pela Comunidade Econômica Europeia (ECC) no processo de substituição de modelos animais por modelos *in vitro*, alguns prazos foram prorrogados (Directive 2003/15/EC). A 6ª Emenda a Diretiva 76/768/EEC foi então substituída por cláusulas da 7ª Emenda que estabeleceu um novo prazo para a proibição de estudos *in vivo* para ingredientes isolados de cosméticos, *i.e.* a partir de 11 de março de 2009, embora para produtos acabados esta proibição já esteja em vigor desde de 2004.

Para os teste de toxicidade sistêmica, toxicocinética e toxicologia reprodutiva, os prazos para a substituição de modelos animais são maiores, devido à falta de alternativas consistentes para estes desfechos. Assim, estes testes deverão ser proibidos somente a partir de 11 de março de 2013 (Pauwels & Rogiers, 2004).

Vários métodos alternativos têm sido estudados, muitos considerados válidos, mas poucos validados (Balls & Fentem, 1997; De Torres *et al.*, 1997; EUROPA, 1999). Por isso, há ainda hoje a necessidade de se estudar a aplicação de alguns métodos alternativos para comprovação de eficácia e segurança com caráter regulatório. Além disso, em algumas circunstâncias, os testes em animais não podem ser substituídos por um único método alternativo. Nestes casos, o desenvolvimento de um esquema de avaliação que envolva uma bateria de testes deve ser levado em consideração, podendo também ser desenvolvido um sistema hierárquico no qual os animais somente sejam utilizados para a confirmação da ausência de toxicidade, reduzindo ao máximo o risco desses animais sofrerem quaisquer efeitos tóxicos.

Estas condições implicam em um enorme desafio para as indústrias de cosméticos e para a comunidade científica envolvida na questão (Pauwels & Rogiers, 2004).

1.2 Métodos Alternativos ao Uso de Animais de Laboratório

O questionamento quanto ao uso de animais em experimentos científicos data de tempos remotos. Já no século XIX, Marchall Hall propôs o primeiro código de ética na experimentação animal, que sugeria a substituição de grandes animais por animais inferiores na escala zoológica, a redução de repetições desnecessárias de ensaios com animais e a preocupação com a diminuição da dor imposta aos animais. No ano de 1842, foi inaugurada a primeira sociedade protetora dos animais “*British Society Prevention of Cruelty to Animals*”, posteriormente denominada de “*Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals*” (Hendriksen, 1994; Presgrave, 2002).

No período compreendido entre 1900 e 1950, o uso de animais em pesquisa científica cresceu de um pouco mais de um mil a muitos milhões por ano. Havia, neste momento, muito pouca evidência de qualquer interesse sustentado na idéia de métodos alternativos em pesquisa animal, exceto entre alguns grupos de proteção animal relativamente pequenos. Passada a Segunda Guerra Mundial, a preocupação com questões éticas em pesquisa animal começou a crescer (Wilhermus, 2001).

Na Inglaterra, em 1947, em artigo publicado pela Federação de Universidades para o Bem-estar Animal (UFAW - *Universities Federation for Animal Welfare*) surgiu o conceito dos 3R's, onde foram consideradas as possibilidades de refinamento, redução e substituição de trabalhos em animais. Somente em 1957, o conceito dos 3R's foi, pela primeira vez, discutido publicamente em um encontro da UFAW sobre questões éticas aplicadas à técnica de laboratório. Em 1959, Willian Russel e Rex Bruch apresentaram à comunidade científica o livro “*Principles of Humane Experimental Technique*”, definindo os 3R's, cuja sigla representa “refinement”, “reduction” e “replacement”, o que significa respectivamente (1) refinamento, ou seja, a modificação de algum procedimento operacional com animais, objetivando minimizar a dor e 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 *i.e.* um menor número de animais sendo utilizado para obter a mesma qualidade de informação, ou maximização da informação obtida pelo mesmo animal; e (3) substituição, onde um sistema experimental que esteja vinculado à totalidade da condição da vida animal pode ser considerado como um método alternativo. Pode-se citar a proposta de utilização de células, tecidos ou microrganismos para subseqüentes estudos *in vitro* ao invés do sacrifício de animais (Hendrikesen, 1994; Rowan, 1997; Presgrave, 2002).

Na década de 60 e 70 a discussão sobre o uso de animais em pesquisa 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 animal; 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”, despertando o movimento de proteção aos animais e apontando o Teste de Draize (Figura 1), primeiro ensaio preditivo para determinação da irritabilidade oftálmica induzida por drogas, cosméticos e substâncias químicas descrito por Jonh H. Draize e colaboradores em 1944 (Draize *et al.*, 1944), como o maior alvo de combate para os ativistas (Wilhermus, 2001).

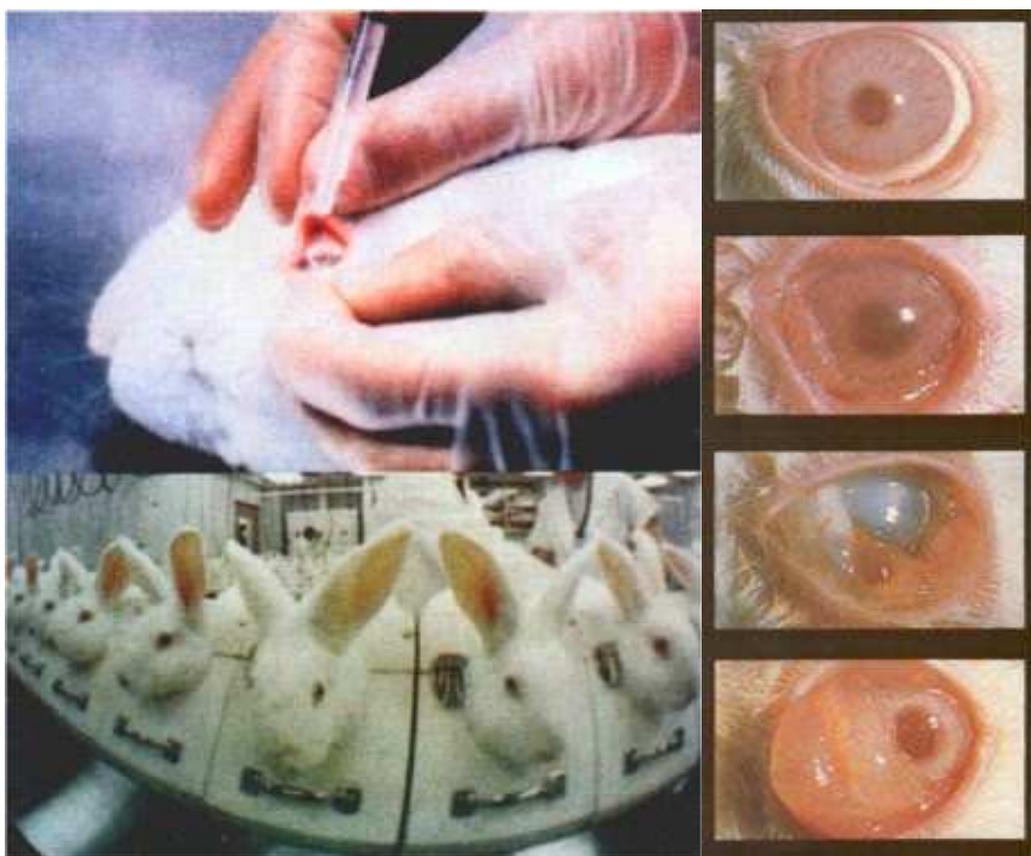


Figura 1: Ilustração do Teste Draize

Fonte: <http://www.utcare.sa.utoronto.ca/research1.htm>

(acessado em 13/ out / 2006)

Apesar da década de 70 ter sido de amadurecimento, no que se refere à discussão de questões éticas em experimentação animal, a primeira publicação oficial sobre as leis e diretrizes que regulamentam métodos de proteção animal em experimentação científica e sobre a aplicação dos 3R's só surgiu em 1986, quando na Europa foi criada a Directiva EC86/906 que descreve as leis que regem a proteção de animais usados em experimentação (Rowan, 1997; Balls *et al.*, 2000).

Na década de 80 a indústria de cosméticos passou por duros ataques por parte de organizações não governamentais e de diversos segmentos da sociedade, através de uma campanha contra a utilização de animais para a determinação do potencial de irritação durante o processo de produção de cosméticos (Figura 2) e já nessa época se observou uma diminuição

considerável do número de coelhos utilizados no teste de Draize pelas indústrias de cosméticos (Holden, 1989). Em 1984, o governo britânico concedeu fundos para o desenvolvimento de métodos alternativos ao FRAME – “*Fund for the Replacement of Animals in medical Experiments*”, que desde 1983, edita uma das principais revistas internacionais na área de métodos alternativos ao uso de animais intitulada ATLA – “*Alternative to Laboratory Animals*”. Em 1994, foi inaugurado o ECVAM – “*European Committee for Validation of Alternative Methods*”, instituição pertencente à Comissão Europeia encarregada de promover o desenvolvimento e validar técnicas e metodologias destinadas à substituição dos ensaios em animais (ANVISA, 2003).

Figura 2: Cartaz de protesto contra o Teste Draize.

Fonte: <http://www.stopanimaltest.com>

(acessado em 13/ out / 2006).

1.3 Debates atuais sobre o uso de animais em pesquisa no Brasil

Apesar da possibilidade de utilização de métodos alternativos ao uso de animais em pesquisa científica e para fins didáticos figurarem pela primeira vez na legislação brasileira há apenas uma década (Brasil, 1997), leis mais gerais que dispõem sobre a proteção animal datam de meados da década de 1930 (Brasil, 1934). O Decreto-lei nº 24.645, de 10 de julho de 1934, considera como maus tratos a mutilação ou ferimento, feito de forma voluntária em animais, mas excepciona aquelas operações praticadas no interesse da ciência; estabelece ainda medidas de proteção aos animais e, pela primeira vez, o Estado reconhece como tutelados todos os animais existentes no país. Apesar de existir, na maioria dos seus artigos, uma predominância de cuidados voltados para os animais de grande porte, como eqüinos e bovinos, o Decreto-lei nº 24.645/34 foi durante muitos anos usado por analogia sem, contudo, oferecer sistematização adequada à questão da vivisseccção e experimentação animal (Marques *et al.*, 2005).

Mais de meio século se passou desde então, e embora a idéia de preocupação com o bem-estar animal tenha ganhado adeptos em diversos setores de nossa sociedade, o Brasil não possui ainda uma legislação que efetivamente regule a criação e o uso de animais para a pesquisa científica e o ensino, em âmbito nacional. No Brasil, possuímos legislações de caráter mais geral, como a Lei Federal nº 6.638, de 8 de maio de 1979, que regulamenta a prática didática e científica da vivisseccção e estabelece, que essa técnica é permitida desde que obedecidos alguns critérios, tais como, o emprego obrigatório de anestesia, a supervisão competente por técnico especializado, bem como a realização em centros de pesquisas e estudos registrados em órgão competentes e com animais que tenham permanecido por um período mínimo de 15 dias em biotérios legalmente autorizados (Brasil, 1979). Embora estabeleça algumas normas sobre a vivisseccção e ainda preveja penalidades, como a interdição e cancelamento de registro de biotérios e centros de pesquisa infratores, o detalhamento sobre cuidados específicos com os animais de laboratório está ausente na Lei Federal nº 6.638/79.

A Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998, dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de conduta e atividades lesivas ao meio ambiente e denomina como crime ambiental a prática de “abuso, maus tratos, ferir ou mutilar animais silvestres, domésticos ou domesticados, nativos ou exóticos”, sendo a pena cabível de detenção de três meses a um ano, mais a cobrança de multa (Brasil, 1998). A Lei nº 9.605/98, no seu parágrafo 1º do artigo

32, adota parcialmente o conceito dos 3R's e equipara na mesma pena “quem realiza experiência dolorosa ou cruel em animal vivo, ainda que para fins didáticos ou científicos, quando existirem recursos alternativos”. A pena é aumentada de um sexto a um terço, se ocorrer morte do animal.

Uma importante tentativa de se regular a prática da experimentação animal no Brasil é o projeto de lei nº 3.964/97, de autoria de Sergio Arouca, hoje apenso ao Projeto de lei nº 1.153/95 (Brasil, 1995 e 1997). Dentre os diversos pontos importantes previstos no PL nº 3.964/97 destacam-se os seguintes: (i.) a criação do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), como órgão normalizador, credenciador, supervisor e controlador das atividades de ensino e de pesquisa com animais, inclusive monitorando e avaliando a introdução de técnicas alternativas que substituam a utilização de animais em ensino e pesquisa; (ii.) a criação das Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUAS), obrigatórias em todas as instituições que pratiquem a experimentação animal; e (iii.) a definição das penalidades aplicadas às instituições e/ou aos profissionais pelo emprego indevido das normas ou mesmo dos próprios animais (tais como advertência, multa, suspensão temporária, suspensão de financiamento proveniente de fontes oficiais e agências de fomento, interdição temporária e interdição definitiva em caso de não seguimento de suas determinações). São ainda fixadas normas para a realização de experimentos (como por exemplo, a obrigatoriedade de sedação, analgesia, ou anestesia nos experimentos que possam causar dor ou angústia) e dispõe sobre o método utilizado para a eutanásia dos animais, a proibição de uso de bloqueadores neuromusculares, bem como da reutilização de um mesmo animal, se alcançado o objetivo principal da pesquisa. Apesar de significar um enorme avanço no que se refere à regulação efetiva da criação e do uso de animais para a pesquisa e o ensino, esses projetos de lei foram submetidos à Comissão de Ciência e Tecnologia, Comunicação e Informática (CCTCI), tendo sido aprovados na forma de um Substitutivo (Brasil, 2003), mas que ainda hoje tramita no Congresso Nacional.

As propostas em discussão avançam no sentido de reconhecer os princípios que norteiam a investigação científica alicerçada nos 3R's. Neste contexto, o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) criou - ainda na década de 1990 - os *Princípios Éticos na Experimentação Animal* (COBEA, 2007), postulando doze artigos que passam a nortear a

conduta dos professores e dos pesquisadores na prática do uso de animais, dos quais vale destacar o art. 6º, *in verbis*:

“Artigo 6º: Considerar a possibilidade de desenvolvimento de métodos alternativos, como modelos matemáticos, simulações computadorizadas, sistemas biológicos "in vitro", utilizando-se o menor número possível de espécimes animais, se caracterizada como única alternativa plausível.”

Porém as dificuldades existentes no processo de desenvolvimento, implantação e validação de métodos alternativos são bem conhecidos da comunidade científica, sobretudo se considerarmos a substituição dos modelos animais nos processos de avaliação de eficácia e segurança de novos produtos, tais como vacinas, fármacos etc.

Apesar dessa dificuldade, no ano de 2005 foi publicado o Projeto de lei nº 325/2005 de autoria do vereador Cláudio Cavalcante - PFL, que se encontra em tramitação em caráter de urgência, desde maio de 2006 na Câmara de Vereadores do Município do Rio de Janeiro e prevê o fim imediato das práticas de vivisseção para fins didático-científicos no município do Rio de Janeiro (“*artigo 1º: Fica proibida, no âmbito do Município do Rio de Janeiro, a vivisseção, assim como o uso de animais em práticas experimentais que a eles provoquem sofrimento físico ou psicológico, sendo este com finalidades pedagógicas, industriais, comerciais ou de pesquisa científica*”).

Vale ressaltar que tal projeto de lei prevê a proibição **imediate** e **total** da utilização de animais em práticas experimentais, sem sequer citar a possibilidade de se estabelecer prazos e/ou categorias de ensaios que possam ser candidatos à substituição por metodologias alternativas, tal qual vem ocorrendo na Europa.

Este Projeto de lei sofreu veto por parte do prefeito César Maia (18/05/2006). Caso o veto seja mantido, o projeto de lei será arquivado. Se o veto for derrubado, o projeto será promulgado pela Câmara num prazo de oito dias úteis e passa a vigorar. Assim, conforme o artigo 2º “*Às instituições e estabelecimentos, de ensino ou de pesquisa científica, industriais e comerciais que descumprirem as determinações apontadas no caput será aplicada multa de R\$ 2.000,00 (dois mil reais), por animal utilizado*” e ainda no parágrafo único “*Em caso de*

reincidência a instituição ou o estabelecimento infrator terá cassado o alvará para funcionamento”.

Assim, mais uma vez faz-se evidente a necessidade da reavaliação das normas legais existentes no Brasil e a elaboração de novas normas, em consonância com a realidade do conhecimento científico e que possam padronizar as ações no que tange a utilização de animais nas práticas didático-científicas. Torna-se imperativo adotar dispositivos realistas e que garantam o cumprimento das leis vigentes.

1.4 Métodos alternativos validados

Vários métodos alternativos se apresentam viáveis para utilização, porém poucos estão validados, merecendo um estudo mais aprofundado, envolvendo validações intra-laboratoriais, além do envolvimento de diversas instituições (estudos inter-laboratoriais) para que se tornem aceitos oficialmente pelas agências regulatórias. Embora possa parecer simples, esta não é tarefa fácil; e requer tempo e *expertise* tanto na área específica do ensaio em questão, como no processo de validação de métodos.

A Europa e os EUA já contam com centros de estudos, como o ECVAM e o ICCVAM (*The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*), respectivamente, que foram criados exclusivamente com a finalidade de desenvolver e validar métodos alternativos. Apesar de todos os esforços por parte da comunidade científica e do fato destas agências já existirem há mais de uma década, poucos são os métodos alternativos plenamente validados e aceitos para fins regulatórios (Quadro 1). Segundo o ECVAM, somente 09 métodos alternativos são hoje aceitos internacionalmente como métodos oficiais por agências regulatórias. São eles: EpiSkin TM (1), Rat TER (2) e Epi-dermeTM (3) – testes de corrosividade; 3T3-NRU - teste de fototoxicidade (4), teste *in vitro* para absorção percutânea (5), ensaio do linfonodo local murino (LLNA) (6), testes de Elisa para avaliação da potência das vacinas anti-erisipela (7) e anti-tétano (8), e por fim, o teste da inibição da ligação de toxina ToBI - *toxin binding inhibition method* (9).

Quadro1: Exemplos de métodos validados/aceitos para fins regulatórios segundo o ECVAM.

Teste	Desfechos avaliados/Modelo usado	Ensaio substituído	Validação	Aceito para fins regulatórios
Teste de Pirogênio <i>in vitro</i>	Pirogênicidade mediada por endotoxinas Gran-negativas/ Quantificação de IL-1 ou IL-6 no sangue total humano fresco ou criopreservado, ou quantificação de IL-6 em linhagem celular - MonoMac 6 – ou em células monocíticas isoladas do sangue periférico.	Teste de Pirogênio em coelhos	2006	Não
Ensaio do Linfonodo Local Murino (LLNA)^ψ	Potencial dermo-sensibilizante de xenobióticos/quantificação de 3H-timidina nos linfonodos auriculares de camundongos previamente tratados com a substância-teste.	Teste de Maximização e teste de Buehler em cobaias	2000	2002 (OECD test <i>guideline</i> 429)
Ensaio de foto-toxicidade (3T3-NRU)	Potencial fototóxico de ingredientes usados na formulação de produtos preconizados para uso na pele humana que pode ser exposta à luz solar*/ utilização da linhagem celular 3T3 (embrião de camundongo) e corante vermelho neutro (NRU)	Teste <i>in vivo</i> (<i>em cobaias</i>)	1998	2002 (Directiva 67/548/EEC; Draft OECD test <i>guideline</i> 432)

[Continuação Quadro 1]

Teste	Desfechos avaliados/Modelo usado	Ensaio substituído	Validação	Aceito para fins regulatórios
Teste de corrosividade de pele	Avaliação de possíveis efeitos corrosivos para a pele humana induzidos por xenobióticos/Episkin TM , Epi-derme TM .	Teste <i>in vivo</i> (em coelhos)	1998	2000 e (Anexo V da Council Directive 67/548/EEC part B.40) e 2002 (OECD Test Guideline 431)

Fonte: ECVAM.

ψ: o LLNA faz uso de camundongos, porém há neste ensaio uma redução do número de animais, da duração do teste e da dor e sofrimento vivenciados pelos animais em teste.

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% (DL50%) em 2001, da Directiva 67/548/EEC e das *guidelines* da OECD.

Como pode ser visto no Quadro 1, alguns métodos alternativos, que avaliam danos à pele humana causados por produtos e agentes químicos, como *e.g.* teste para avaliação do potencial dermosensibilizante, efeitos corrosivos e fototoxicidade, já foram validados e aceitos nos compêndios oficiais. No caso específico dos desfechos relacionados à irritação ocular e de mucosa oral - tema do presente estudo - não há até o momento um único método alternativo plenamente validado, apesar de existirem diversos métodos válidos, como *e.g.* o HET-CAM

(*Hens Egg Test- Chorion Allantoide Membrane*), CAM-TBS (*chorioallantoic membrane-trypan-blue staining*), BCOP (*bovine corneal opacity and permeability test*), testes de citotoxicidade (NRU, MTT e outros), *red blood cell hemolysis test* (RBC), entre outros (Balls & Karcher 1995 e Costa, 2006).

No caso do uso de animais exclusivamente para fins didáticos, a substituição do uso de animais se torna muito mais fácil devido à existência de inúmeros recursos alternativos (CD-ROM, vídeos, modelos etc) do que, por exemplo, na prática laboratorial relacionada à avaliação de segurança e eficácia de produtos. Em contraponto ao volume e ao nível de excelência das pesquisas científicas realizadas mundialmente ou mesmo em território nacional, existe uma nítida insuficiência de normas balizadoras da conduta científica no que se refere ao trato com animais. Porém, é cada vez maior o número de pesquisadores preocupados com a utilização ética de animais, preservando ao máximo seu bem-estar.

Neste contexto, em maio de 2002, na cidade de Belo Horizonte MG., ocorreu um encontro com diversos pesquisadores de todo o Brasil, onde discutiu-se as necessidades, as formas de se controlar e evitar abusos, a regulamentação e os comitês de pesquisa institucionais. Desta discussão surgiu um artigo publicada na *Acta Cirúrgica Brasileira* (*apud* Marques *et al.*, 2005). Outro evento importante referente ao tema ocorreu em outubro de 2005 no Rio de Janeiro, *i.e.* o “I Encontro sobre Métodos Alternativos ao Uso de Animais para Fins Regulatórios” (EMALT), onde representantes de diversos segmentos de nossa sociedade (entre eles laboratórios oficiais, ANVISA e indústria) e expoentes internacionais representantes dos principais centros internacionais de estudos e validação de métodos alternativos ao uso de animais (*e.g.* ECVAM e FRAME) se reuniram para apresentar avanços mundiais e discutir os caminhos para a implantação e validação de metodologias alternativas no campo regulatório de produtos sujeitos a Vigilância Sanitária. Um relato das discussões e avanços obtidos no EMALT foi publicado na revista científica inglesa *Alternatives to laboratory animals: ATLA* (Presgrave & Bhogal, 2005).

1.5 Produtos cosméticos

Os produtos cosméticos têm uma história de muitos anos, sendo usados pelo homem desde de épocas remotas. Inicialmente as fontes de seus ingredientes eram essencialmente plantas, animais e minerais, no entanto o avanço da tecnologia resultou na inclusão de muitas substâncias químicas na formulação destes produtos.

De acordo com a definição conferida pela legislação vigente (Resolução RDC n°211 de 14 de julho de 2005) produtos cosméticos são *“preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano, pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membranas mucosas da cavidade oral, com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência, e ou corrigir odores corporais e ou protegê-los ou mantê-los em bom estado”*. Em relação aos produtos destinados ao uso infantil a legislação é clara: *“produtos cosméticos não podem conter substâncias cáusticas ou irritantes”*. Assim sendo, os produtos cosméticos antes de chegarem ao consumidor, devem passar por processo de avaliação de risco e por testes de segurança, para que se faça valer o direito do consumidor e a garantia da saúde da população.

A avaliação de risco é o processo que se estima a probabilidade de um determinado agente químico produzir efeitos adversos em uma dada população, sob determinadas condições de exposição. É o resultado deste processo, conhecido como caracterização do risco, que orienta as decisões das autoridades regulatórias, destinadas a reduzir ou eliminar o risco de agravos à saúde decorrente a exposição a substâncias químicas. Portanto, para que se possa utilizar com segurança um produto, é preciso submetê-lo a uma bateria de ensaios toxicológicos. A avaliação de risco pode ser realizada através da avaliação de substâncias químicas e/ou produtos acabados.

Por muitos anos têm-se buscado métodos apropriados para avaliação de produtos cosméticos e de suas matérias-primas com relação aos riscos que estes podem representar à saúde humana. A preocupação é pertinente, pois além de pertencerem a um mercado notoriamente crescente em todo o mundo, algumas substâncias contidas em suas formulações podem provocar irritações na pele, mucosas e olhos, efeitos adversos que vão de lesões leves a queimaduras graves. Pode-se observar 3 tipos principais de reações ao uso de cosméticos

(ANVISA, 2003): (a) Irritação: intolerância local podendo corresponder a reações de desconforto menores, mas também a reações mais ou menos agudas, variando sua intensidade, desde ardor, coceira e pinicação podendo chegar até a corrosão e destruição do tecido. Todas estas reações se restringem à área em contato direto com o produto; (b) Sensibilização: corresponde a uma alergia, que é uma reação de efeito imediato (de contato ou, urticária) ou tardio (hipersensibilidade). Ela envolve mecanismos imunológicos e pode aparecer em outra área, diferente da área de aplicação. Portanto, é importante insistir que no campo da imunologia deve-se, não apenas, verificar se um produto pode desencadear uma resposta alérgica em pessoas pré-sensibilizadas, mas também, verificar se o próprio produto não é capaz de induzir uma reação alérgica ao consumidor; (c) Efeito sistêmico: resultante da passagem de quaisquer ingredientes do produto para a circulação geral, diretamente por via oral, inalatória, transcutânea ou transmucosa, metabolizados ou não. Vê-se aqui a necessidade de avaliar o risco dos ingredientes que constituem a fórmula.

Segundo o “Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos” (ANVISA; 2003), a avaliação de segurança deve preceder a colocação do produto cosmético no mercado. É de inteira responsabilidade do fabricante, do importador ou do responsável pela colocação do produto no mercado, garantir sua segurança para os consumidores nas condições normais ou razoavelmente previsíveis de uso conforme assegurado em termo de responsabilidade apresentado, onde a mesma declara possuir dados comprobatórios que atestam a eficácia e a segurança de seus produtos. Uma vez que o produto cosmético é de livre acesso ao consumidor o mesmo deve ser seguro nas condições normais ou razoavelmente previsíveis de uso. A busca desta segurança deve incorporar permanentemente o avanço do estado da arte da Cosmetologia.

A maioria das informações necessárias na avaliação do risco potencial de um produto cosmético resulta do conhecimento dos ingredientes que compõem sua fórmula. São eles que podem, diretamente, ser os responsáveis por qualquer efeito sistêmico e por boa parte do risco alergênico. Contudo, a fórmula do produto acabado pode interferir, à medida que facilita a absorção total ou parcial dos ingredientes sendo responsável, também, por possíveis sinergismos, resultantes da associação de ingredientes. Portanto, o conhecimento disponível dos ingredientes pode não ser suficiente para prevenir um efeito indesejável ao consumidor alvo. Além dos componentes, deve-se avaliar outros parâmetros envolvidos tais como: o uso do

produto, área de aplicação, se o produto é enxaguável, se o uso é prolongado e repetido, diário ou não, entre outros. Dessa forma, o risco potencial pode ser diferente, em cada caso.

1.5.1 Os dentífricos

Segundo nossa legislação (Decreto No 79.094, de 5 de janeiro de 1977), os dentífricos são: ***“Produto destinado à higiene dos dentes e da boca, podendo ser colorido e/ou aromatizado, mas sem irritar a mucosa íntegra, nem prejudicar a constituição normal dos dentes”***

A principal função de um dentífrico é remover partículas sólidas aderentes da superfície do dente. Apesar de numerosos, os produtos cosméticos são formulados com um número restrito de ingredientes. No caso de dentífricos, os abrasivos e os tensoativos são os principais produtos encontrados em suas formulações. O abrasivo tem a finalidade de limpar mecanicamente a superfície do dente, mas sem irritar a mucosa oral, nem causar danos à constituição normal dos dentes. Os tensoativos completam o efeito de limpeza fazendo a remoção de partículas orgânicas (Wolf *et al.*, 2001).

Tensoativo é qualquer substância (ou composto) que seja capaz de reduzir a tensão superficial ao estar dissolvido em água, ou que reduz a tensão interfacial por adsorção preferencial de uma interfase líquido-vapor e outra interface. Existem quatro tipos principais de tensoativos, classificados pela natureza de sua “cabeça” hidrofílica, são eles: anfóteros, aniônicos, catiônicos e não-iônicos:

Tensoativo anfótero: é aquele que tem dois ou mais grupos funcionais, que, dependendo das condições do meio, podem ser ionizados em solução aquosa e dão as características de surfactantes aniônicos ou catiônicos.

Tensoativo aniônico: é aquele que em solução aquosa se ioniza produzindo íons orgânicos negativos, os quais são responsáveis pela atividade superficial.

Tensoativo catiônico: é aquele que em solução aquosa se ioniza produzindo íons orgânicos positivos, os quais são responsáveis pela atividade superficial.

Tensoativo não-iônico: é aquele que não produz íons em solução aquosa. A solubilidade em água desses tensoativos é devida à presença nas moléculas de grupos funcionais que têm uma forte afinidade com água.

Trabalhos experimentais com vários tensoativos demonstram que sua toxicidade está diretamente relacionada com a concentração e comprimento da cadeia do grupo lipofílico, e que os tensoativos iônicos freqüentemente exibem maior efeito do que os não-iônicos (Gloxhuber, 1974). Os tensoativos causam danos significativos tanto na estrutura lipídica como em protéicas, podendo alterar a capacidade de barreira biológica conferida a pele e mucosas (Froebe *et al.*, 1990). Há uma relação positiva entre os efeitos irritantes causados por um tensoativo e sua absorção/penetração através de uma barreira biológica e sua habilidade de danificar membranas celulares (Mizushima *et al.*, 2000). A propriedade de tensoativos de adsorver nas interfaces polar/apolar causa uma considerável influência sobre membranas biológicas, determinando o processo de citólise.

1.6 Teste de irritação da mucosa oral

A experimentação animal tem servido, ao longo de muitos anos, como um meio de se determinar a eficácia e a segurança de diversas substâncias e produtos, em diversas áreas. O teste de irritação da mucosa oral consiste na aplicação do produto na bolsa gutural de hamsters, com lavagem subsequente, durante um determinado período de tempo. São feitas observações macroscópicas da mucosa e, ao final do ensaio, os animais são eutanasiados para exame anatomo-histológico. A mucosa oral normal é composta por epitélio escamosos estratificado, que repousa sobre um tecido conjuntivo fibroso.

Em contraste com os teste de irritação dérmica e irritação ocular, o teste de irritação da mucosa oral ainda não foi bem reportado. Seu princípio está fundamentado na avaliação da capacidade de um determinado produto vir a causar irritação quando em contato com a mucosa

oral. Em um contexto geral, a bolsa gular de hamsters representa um modelo útil para estudo de diferentes mudanças e lesões que podem ocorrer no epitélio estratificado da mucosa oral (Eveson, 1981).

Embora o modelo animal seja considerado mais complexo e os testes mais longos, os mesmos apresentam um maior número de variáveis envolvidas, requerem maior espaço físico e maior demanda de pessoal, são mais caros e envolvem questões éticas importantes. Contudo, são sistemas utilizados há muitos anos e extensamente estudados tornando-se assim bem conhecidos. A complexidade dos sistemas *in vivo* torna extremamente difícil a possibilidade de um único teste *in vitro* vir a substituir com exatidão o processo de irritação.

1.7 Teste HET-CAM

O uso de ovo embrionado de galinha (HET- Hühner-Embryonen-Test) foi inicialmente introduzido no meio científico como teste toxicológico para se obter informações sobre embriotoxicidade, teratogenicidade e toxicidade sistêmica, incluindo imunopatologia e as vias metabólicas (Luepke & Kemper, 1986).

O método HET-CAM (*Hens Egg Test- Chorion Allantoide Membrane*) surgiu na década de 1980 (Luepke, 1985), quando foi introduzido o uso da membrana córion-alantóide (CAM) de ovo embrionado de galinha (HET- *Huehner-Embryonen-Test*) (Figura 3) com a finalidade de avaliar o grau de irritação de mucosas induzido por substâncias químicas. Atualmente, em alguns países membros da Comunidade Européia, *e.g.* França e Alemanha, o teste HET-CAM é aceito pelas autoridades regulatórias como método usado no desenvolvimento de produtos cosméticos (Liebsch *et al.*, 2002).

Pode-se dizer que os ensaios *in vitro*, por serem sistemas mais simples e mais facilmente controláveis, apresentam algumas vantagens com relação ao sistema *in vivo*. Geralmente, são mais sensíveis, reprodutíveis, rápidos, econômicos, produzem uma quantidade menor de resíduos e alguns estão sujeitos à automação (Renzi *et al.*, 1993). No caso específico do método HET-CAM, este apresenta vantagens como: é um teste econômico e de fácil implantação no

laboratório, apenas um técnico treinado é suficiente para realização do teste, tem duração média de 1 hora com os primeiros fenômenos ocorrendo em 20 segundos.

Sabendo-se que um dos fenômenos observados nos testes *in vivo* de irritação de mucosas (*e.g.* teste de irritação ocular, testes de irritação de mucosa oral, peniana, vaginal etc) é o aparecimento de alterações vasculares, a escolha pelo método alternativo HET-CAM tem por finalidade avaliar a possibilidade de uma boa correlação com os resultados obtidos nos testes *in vivo*, uma vez que este permite a avaliação imediata de fenômenos vasculares, tais como hiperemia, hemorragia e coagulação.

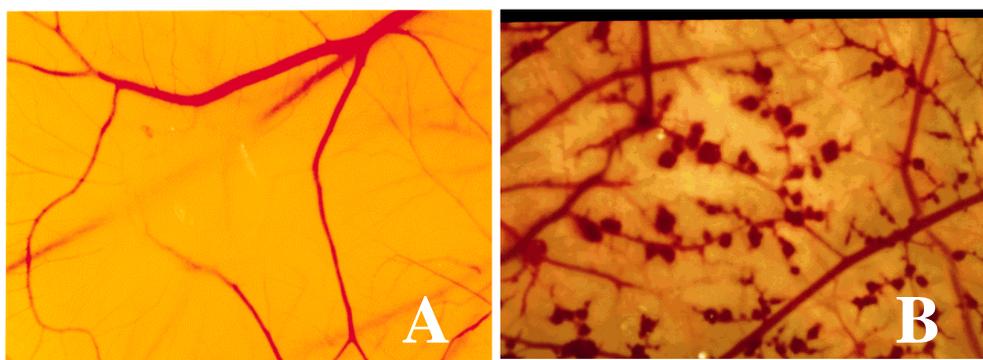


Figura 3. Membrana córion-alantóide (CAM) de ovo embrionado de galinha. (A Figura A mostra a membrana córion-alantóide intacta e a Figura B efeitos vasculares durante a realização do teste HET-CAM).

1.8 Relevância do Estudo

O HET-CAM vem sendo estudado desde 1988 como método alternativo ao teste de irritação ocular em coelhos (Worth & Balls, 2001; Worth & Cronin, 2001). No entanto, estudos que busquem avaliar a relação entre os efeitos induzidos *in vivo* em outras mucosas (*e.g.* oral) e o HET-CAM são ainda escassos. No caso da avaliação da toxicidade ocular induzida por produtos, assim como em outras situações, sabe-se que um único método alternativo dificilmente será capaz de substituir o uso de animais. Assim, os principais centros internacionais de estudos e validação de métodos alternativos ao uso de animais recomendam que a comunidade científica: (a) continue a buscar novas metodologias, (b) aprofunde seus

conhecimentos a respeito das metodologias pré-existentes, procurando conhecer as peculiaridades destes métodos e avaliando um número de substâncias/classes de substâncias e, (c) sempre que possível, proponha protocolos que sejam sensíveis e reprodutíveis. Assim acreditamos ser importante avaliar de forma consistente a aplicabilidade do método HET-CAM na avaliação do potencial de irritação da mucosa oral.

Além disso, devido ao fato de um número significativo de cremes dentais terem sido apreendidos nos últimos anos por desvio de qualidade e por terem causado inchaços, queimaduras e outros processos inflamatórios na mucosa oral de consumidores, levando inclusive a suspensão de uso e comercialização destes produtos em todo território nacional (RESOLUÇÃO nº 192, de 4 de fevereiro de 2003 e RESOLUÇÃO nº 61, de 13 de janeiro de 2003 da ANVISA), optou-se pela avaliação de produtos para higiene dental e bucal.

Neste contexto, o presente trabalho pretende contribuir para uma maior compreensão da aplicabilidade deste método através da observação de fenômenos vasculares na membrana córion-alantóide de ovo embrionado de galinha na avaliação do potencial tóxico de dentifrícios como um modelo alternativo ao teste de irritação da mucosa oral em hamsters.

II. OBJETIVOS

II.1 Objetivo Geral

Avaliar a aplicabilidade do método HET-CAM como uma alternativa ao teste de irritação da mucosa oral na avaliação do potencial tóxico de dentifrícios.

II.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar o potencial irritante de produtos de uso adulto, apreendidos por Secretarias Estaduais e/ou Municipais de Saúde; e de uso infantil, adquiridos comercialmente no município do Rio de Janeiro através do teste de irritação da mucosa oral em hamsters;
2. Analisar a natureza e o grau de severidade dos efeitos induzidos na mucosa oral de hamsters pelas diferentes classes de produtos, *i.e.* não irritante (NI), minimamente irritante (IMin), irritante leve (IL), irritante moderado (IM) e irritante severo (IS);
3. Avaliar a reprodutibilidade do método HET-CAM, comparando resultados obtidos por um mesmo analista em ensaios independentes e entre análises realizadas por dois diferentes analistas;
4. Avaliar a correlação existente entre os achados macroscópicos e microscópicos na mucosa oral de hamsters (teste de irritação da mucosa oral) com resultados obtidos *in vitro* (HET-CAM), abordando as vantagens e desvantagens de cada método;
5. Avaliar parâmetros como precisão, sensibilidade e especificidade do método proposto em comparação com o teste de irritação da mucosa oral.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

III.1 Solução empregada

Solução Salina 0,9%

NaCL	9g	
Água destilada	<i>qsp</i>	1000ml

III.2 Equipamentos utilizados

- Balança Digital Mettler PE 3600
- Cronômetro
- Placa aquecedora Corning PC600
- Luminária Fiber Lite série 180
- Incubadora de ovos Premiun Ecológica
- Motor de dentista
- Tesouras para íris curva
- Pinças para íris curva
- Lupa
- Otoscópio
- Microscópio Olympus BH-2

III.3 Materiais e reagentes de uso geral

- Bechers 10ml e 250ml
- Seringas de 1 e 5 ml
 - Balões volumétricos de 10ml
 - Micropipeta de volume variável (110 a 100ul)
 - Gaze
 - Álcool etílico 70% v/v

III.4 Produtos

Foram analisados 20 produtos acabados (*e.g.* dentifrícios de uso adulto e infantil) representativos das cinco classificações quanto ao potencial de irritação da mucosa oral em hamsters (*i.e.* produtos não irritantes, minimamente irritante, irritantes leves, irritantes moderados e irritantes severos), comercializados no município do Rio de Janeiro ou apreendidos por Secretarias Estaduais e/ou Municipais de Saúde. Todos os produtos analisados foram numerados, sendo que os da linha adulta receberam numeração de 01 a 10 (DT01 a DT10) e da linha infantil de 11 a 20 (DT11 a DT20). A relação dos produtos analisados, seus fabricantes, marcas e composições encontram-se descritos na Tabela 1.

Os produtos avaliados foram produzidos por 8 diferentes fabricantes e receberam códigos conforme descrito a seguir: FB01, FB02, FB03, FB04, FB05, FB06, FB07 e FB08. Ao todo foram avaliadas 14 marcas, codificadas com 01 dígito e 01 letra. O dígito se refere ao fabricante e a letra, a marca em si. Assim, os produtos receberam os seguintes códigos:

Fabricante 1 (FB01) : M01/A e M01/B

Fabricante 2 (FB02) : M02/A

Fabricante 3 (FB03): M03/A, M03/B, M03/C e M03/D

Fabricante 4 (FB04): M04/A, M04/B e M04/C

Fabricante 5 (FB05): M05/A

Fabricante 6 (FB06): M06/A

Fabricante 7 (FB07): M07/A

Fabricante 8 (FB08): M08/A

Alguns produtos da linha adulta são de uma mesma marca, apresentam formulações idênticas e por isso receberam códigos idênticos (DT02, DT03, DT04, DT05, DT09 e DT10 = M01/B e DT07 e DT08 = M03/A), porém cada um destes produtos é proveniente de um determinado lote e foi apreendido em locais e datas distintas.

Os produtos do fabricante FB01 (M01/A e M01/B) foram produzidos em localidades diferentes, apresentam nomes de marca diferentes, porém têm formulações idênticas (Tabela 1).

Os produtos da linha adulta ingressaram no INCQS entre os meses de novembro de 2002 e maio de 2004 através de denúncias de terem causado danos à saúde bucal de seus consumidores. Os produtos da linha infantil foram adquiridos no comércio do município do Rio de Janeiro, no mês de abril de 2005, exclusivamente para a realização deste estudo.

Tabela 1: Dentifrícios: uso, código, fabricante, marca e composição.

Produto	Uso	Código	Fabricante /Marca	Composição
Creme Dental	Adulto	DT01	M01/A	1500ppm de Flúor, Água Desmineralizada, Álcool Etílico, Aroma de Menta, Carbonato de Cálcio, Carboximetilcelulose, Glicerina, Lauril Sulfato de Sódio, Metilparabeno, Sacarina Sódica, Silicato de Sódio e Sorbitol. (Monofluorfosfato de Sódio)
Creme Dental	Adulto	DT02	M01/B	Idem DT01
Creme Dental	Adulto	DT03		
Creme Dental	Adulto	DT04		
Creme Dental	Adulto	DT05		
Creme Dental	Adulto	DT06	M02/A	1500ppm de Flúor; Bicarbonato de Sódio, Glicerina, Sorbitol, Carbonato de Cálcio, Lauril Sulfato de Sódio, Carboximetilcelulose, Composição Aromática e Água. (Monofluorfosfato de Sódio)
Creme Dental	Adulto	DT07	M03/A	1200ppm de Flúor, Sorbitol, Carboximetilcelulose, Carbonato de Cálcio, Lauril Sulfato de Sódio, Sacarina Sódica, Composição Aromática, Formaldeído e Água. (Monofluorfosfato de Sódio)
Creme Dental	Adulto	DT08		
Creme Dental	Adulto	DT09	M01/B	Idem DT01
Creme Dental	Adulto	DT10		

[continuação tabela 1]

Produto	Uso	Código	Fabricante /Marca	Composição
Gel Dental	Infantil	DT11	M04/A	1100ppm de flúor, Sorbitol, Água, Silica, Polietilenoglicol 600, Carboximetilcelulose, Lauril Sulfato de Sódio, Aroma, Sacarina Sódica, Corantes: CI 77891, CI 77019, CI 42090, CI 47005. (Fluoreto de Sódio)
Gel Dental	Infantil	DT12	M04/B	500ppm de Flúor, Sorbitol, Água, Silica, Polietilenoglicol, Carboximetilcelulose, Lauril Sulfato de Sódio, Composição Aromática, Sacarina Sódica, CI42090. (Fluoreto de Sódio)
Creme Dental	Infantil	DT13	M05/A	1100ppm de Flúor, Água Desmineralizada, carbonato de Cálcio, Sorbitol, Aroma Artificial de Morango, Lauril Sulfato de Sódio, Carboximetilcelulose, Sacarina Sódica, Benzoato de Sódio, Água, CI 14720. (Monofluorfosfato de Sódio)
Gel Dental	Infantil	DT14	M04/C	1100 ppm de Flúor, Sorbitol, Silica, Lauril Sulfato de Sódio, Polietilenoglicol, Carboximetilcelulose, Sacarina Sódica, Composição Aromática, Corantes: CI 42090, CI 77019, CI 77891. (Fluoreto de sódio)
Gel Dental	Infantil	DT15	M06/A	Glicerina, Sorbitol, Água Desmineralizada, Sílica, PEG-400, Lauril Sulfato de Sódio, Aroma menta, Benzoato de Sódio, Goma-celulose, Sacarina Sódica, CI 19140, CI 42090. Não contém flúor.

[continuação tabela 1]

Gel Dental	Infantil	DT16	M03/B	1100 ppm de Flúor, Sorbitol, Carboximetilcelulose, Dióxido de Silício, PEG-400, Lauril Sulfato de Sódio, Sacarina Sódica, Composição Aromática, CI 45.430, CI 77.019, CI 77.891, Formaldeído, Água. (Fluoreto de sódio)
Creme Dental	Infantil	DT17	M07/A	1000ppm de Flúor, Carbonato de Cálcio, Lauril Sulfato de Sódio, Sacarina Sódica, Dióxido de Silício, Sorbitol, Carboximetilcelulose, metil e propil parabenos, composição aromática, CI 16.255 e Água (Monofluorfosfato de Sódio)
Gel Dental	Infantil	DT18	M08/A	Benzoato de sódio, Carboximetilcelulose, Dióxido de Silício, Essência de Tutti-fruti, Extrato de Malva, Glicerina, Sarcosil, Sorbitol, Sucralose, Xilitol, Água Desmineralizada, CI 45.430. Não contém flúor.
Gel Dental	Infantil	DT19	M03/C	1100 ppm de Flúor, Sorbitol, Carboximetilcelulose, Dióxido de Silício, PEG-400, Lauril Sulfato de Sódio, Sacarina Sódica, Composição Aromática, CI 45.430, CI 77.019, CI 77.891, Formaldeído, Água. (Fluoreto de sódio)
Gel Dental	Infantil	DT20	M03/D	1100 ppm de Flúor, Sorbitol, Carboximetilcelulose, Dióxido de Silício, Lauril Sulfato de Sódio, Sacarina Sódica, Composição Aromática, CI 42.090, CI 77.019, CI 77.891; PEG-400, Formaldeído, Água. (Fluoreto de sódio)

III.5 Teste HET-CAM

A metodologia que foi utilizada está descrita no *Journal Officiel de La Republique Française – Arreté du 29 Novembre 1996* – relativa ao método oficial de avaliação do potencial irritante por aplicação sobre a membrana corion-alantóide (MCA) do ovo de galinha, tendo como princípio a observação dos efeitos irritantes (hiperemia, hemorragia, coagulação/opacidade) determinados por substâncias químicas ou produtos acabados quando em contato com a MCA no décimo dia de incubação.

3.5.1 Procedimento

A) Ovos - Foram utilizados, para cada produto, 4 ovos SPF fertilizados de galinha da raça Leghorn, provenientes da Granja Resende, pesando entre 50 e 60 gramas. No momento do recebimento, todos ovos passaram por inspeção visual e os que apresentaram lesão na casca foram descartados; os demais pesados, identificados e incubados por 10 dias.

B) Condições da Incubadora - Temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de aproximadamente 70%.

C) Tratamento dos ovos para o ensaio - No 10º dia de incubação, o ovo posto em posição vertical, sobre um suporte e com a câmara de ar voltada para cima, teve casca retirada expondo a membrana da casca. Este procedimento foi executado com o auxilio de pinça, tesoura de pontas curva e motor utilizado por dentistas. A membrana da casca foi umidificada com solução salina a 0,9% à 37°C . O excesso de solução salina foi eliminado inclinndo-se o ovo horizontalmente, e com o auxilio de uma pinça, a membrana da casca foi removida expondo a MCA. Antes da aplicação do produto, a MCA passa por observação visual e qualquer tipo de alteração na membrana implica no descarte do ovo. Aplicou-se 0,3 mL do produto (puro ou diluído), mantido à 37°C sobre a MCA e após 20 segundos de contato, este foi retirado com 5 ml de solução salina à 37°C .

D) Leitura - A MCA foi examinada e graduada para os efeitos irritantes (hiperemia, hemorragia e coagulação/opacidade), observados no período de 5 minutos, conforme a escala de Luepke.

Tabela 2: Graduação dos fenômenos em relação ao tempo

	TEMPO		
	≤ 30 segundos (s)	$30\text{ s} < t \leq 2$ minutos	$2\text{ min} < t \leq 5$ min
Hiperemia	5	3	1
Hemorragia	7	5	3
Coagulação	9	7	5

E) Classificação – A graduação dos fenômenos é tempo-dependente e os valores numéricos são somados para a obtenção de um valor único. A classificação do produto é obtida pelo valor médio dos 4 ovos onde o valor máximo é 21, segundo a escala de Luepke descrita abaixo:

Média dos Escores	Classificação
0,0 a 0,99	não irritante (NI)
1,0 a 4,99	irritante leve (IL)
5,0 a 8,99	irritante moderado (IM)
9,0 a 21	irritante severo (IS)

Seguindo a recomendação de alguns autores que avaliaram a aplicabilidade do teste HET-CAM como método substitutivo do Teste de irritação ocular de Draize, cada produto foi avaliado puro (100%) e em diluição de 10% (EEC, 1991; Blein *et al.*, 1991 & Silva *et al.*, 1992). O ensaio para cada produto na concentração a 10% foi realizado em triplicata, por dois analistas e em ensaios independentes. Os ensaios para cada produto a 100% foram realizados também por dois analistas, em ensaios independentes. Os produtos receberam códigos e a análise foi realizada sem que cada analista tivesse conhecimento dos resultados obtidos previamente *in vivo* ou pelo outro analista, no próprio ensaio HET-CAM. Ao final do estudo, avaliamos a concordância entre os resultados obtidos em cada uma das leituras independentes.

III.6 Teste de irritação da mucosa oral em hamsters

O teste foi realizado conforme preconizado pela ISO 10.993 – Parte 10. Foram utilizados hamsters provenientes do CECAL/FIOCRUZ (N=5/produto). O produto (0,5ml) foi aplicado na bolsa gútural direita de cada animal por 4 vezes, com intervalo de 1 hora entre cada aplicação e retirada com 5 ml de água destilada 5 minutos após cada aplicação. Antes de cada aplicação, a bolsa gútural direita de cada animal foi examinada macroscopicamente e as alterações ocorridas na mucosa foram registradas para o controle do ensaio. A observação de lesões severas nesse exame inviabiliza o prosseguimento do teste. Um grupo controle (N=5) permaneceu sem tratamento. Vinte quatro horas após o término do tratamento fez-se a última leitura macroscópica e os animais foram então eutanasiados por inalação de CO₂ e as bolsas gútrais foram retiradas e fixadas em formalina a 10% tamponada, processadas para corte em parafina, cortadas em secções de 5 micra e coradas com hematoxilina-eosina para serem submetidas à análise microscópica.

III.6.1 Análise microscópica

Os efeitos irritantes ocorridos na mucosa oral foram avaliados com base no sistema de classificação microscópica para reações no tecido da mucosa oral descrita na ISO10,993- Parte 10 (Tabela 3). Os escores encontrados na avaliação microscópica de todos os animais são somados e divididos pelo número de observações para se obter a média de cada grupo de animais (controle e teste). O índice de irritação (Ii) é obtido subtraindo a média dos escores dos animais tratados pela média dos escores dos controles [Ii = (Média dos animais tratados) – (Média do controle)], onde o valor máximo é 16, conforme descrito na Tabela 4.

Tabela 3: Sistema de classificação microscópica

Reações	Graduação Numérica	Reações	Graduação Numérica
Epitélio		Infiltrado Leucocitário ^ψ	
Normal, intacto	0	Ausente	0
Degeneração celular	1	Mínimo – menos que 25	1
Metaplasia	2	Médio – 26 a 50	2
Erosão Local	3	Moderado – 51 a 100	3
Erosão Generalizada	4	Marcante - maior que 100	4
Congestão		Edema	
Ausente	0	Ausente	0
Mínimo	1	Mínimo	1
Médio	2	Médio	2
Moderado	3	Moderado	3
Marcante	4	Marcante	4

^ψ: É realizada uma avaliação preliminar (aumento de 4X), selecionando-se a área que apresenta maior concentração de células inflamatórias , que são então contabilizadas em aumento de 20X.

Tabela 4: Classificação final do teste de irritação de mucosa oral em hamsters.

Média dos escores	Classificação
0 a 0,99	Não Irritante (NI)
1 a 4,99	Mínimo (IMin)
5 a 8,99	Leve (IL)
9 a 11,99	Moderado (IM)
12 a 16	Severo (IS)

III.7 Análise Estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando a Versão 14 do Minitab®. (Minitab Statistical Software, Minitab Inc., PA, USA, 2004). Os coeficientes de correlação de Pearson e de Spearman foram utilizados para comparar os escores observados no método HET-CAM com os obtidos *in vivo*.

Avaliou-se ainda a sensibilidade, especificidade e precisão do ensaio HET-CAM em relação ao ensaio *in vivo*, observando-se a frequência de concordância e discordância de resultados entre os dois ensaios. Para esta análise foi montada uma tabela de contingência, como se pode observar a seguir:

		<i>In vitro</i>	
		Negativo	Positivo
<i>In vivo</i>	Negativo	a	b
	Positivo	c	d

Onde:

- 1) Sensibilidade é a capacidade da metodologia *in vitro* detectar os produtos positivos = $d / c+d \times 100$;
- 2) Especificidade é a capacidade da metodologia *in vitro* detectar os produtos negativos = $a / a+b \times 100$;
- 3) Precisão é a capacidade da metodologia *in vitro* fornecer os mesmos resultados que o teste *in vivo* = $a+d / a+b+c+d \times 100$.

IV. RESULTADOS

IV.1 Ensaio *in vivo*

Todos os produtos foram testados quanto ao seu potencial de irritação utilizando modelos *in vivo* e *in vitro*. Os resultados obtidos no ensaio *in vivo*, bem como os valores de pH encontrados para cada produto, estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5: Resultados obtidos no teste de irritação da mucosa oral em hamsters.

Código		<i>In vivo</i>		
		pH	Ii*	Classificação
DT01		10,80	14,25	IS
DT02	A	9,70	11,75	IM
DT03	D	9,90	12,75	IS
DT04	U	9,10	9,00	IM
DT05	L	8,90	9,25	IM
DT06	T	9,30	8,00	IL
DT07	O	9,86	10,25	IM
DT08		9,75	6,50	IL
DT09		8,80	12,50	IS
DT10		8,90	7,00	IL

[continuação tabela 5]

<i>In vivo</i>				
Código		pH	Ii*	Classificação
DT11		6,72	0,25	NI
DT12	I	6,97	1,25	IMin.
DT13	N	8,09	8,00	IL
DT14	F	6,90	2,25	IMin.
DT15	A	5,25	1,50	IMin.
	N			
DT16	T	7,05	6,00	IL
DT17	I	7,97	8,00	IL
DT18	L	6,23	0,50	NI
DT19		6,52	7,75	IL
DT20		6,68	2,50	IMin.

Ii*: Índice de Irritação

IV.1.1 Produtos da linha adulta

Todos os produtos da linha adulta foram considerados irritantes no teste *in vivo* (Tabela 5). Neste teste, 03 produtos (30%) foram classificados como irritantes leves (IL), 04 produtos (40%) foram classificados como irritantes moderados (IM) e 03 produtos (30%) receberam a classificação máxima quanto ao seu potencial de irritação, *i.e.* foram classificados como irritantes severos (IS), apresentando valores de índice de irritação maiores que 12,00.

É importante ressaltar que neste estudo, não há produtos de um mesmo lote e que os 10 produtos de uso adulto foram apreendidos em localidades e ocasiões diferentes. A maioria dos produtos de uso adulto aqui estudados (70%) foram produzidos pelo mesmo fabricante (FB01) e apresentavam formulações idênticas (Tabela 1). Apesar de conterem a mesma formulação, o pH (entre 8,80 e 10,80) e o grau de severidade das reações induzidas na mucosa oral de hamsters (Ii = 7,00 a 14,25) variou significativamente entre os diferentes lotes avaliados. Dentre os produtos com formulações idênticas, 03 produtos foram classificados como irritantes severos (DT01,

DT03 e DT09) e 03 como moderados (DT02, DT04 e DT05), enquanto o produto DT10 apresentou índice de irritação relativamente baixo ($I_i = 7,00$), sendo assim considerado irritante leve.

Todos os produtos da linha adulta apresentavam flúor em sua composição (vide Tabela 1), embora em concentrações diferentes. Os produtos DT07 e DT08 - do fabricante FB03 - apresentavam formulações idênticas e com concentrações mais baixas de flúor (1200ppm) do que os demais produtos. Mesmo entre estes produtos, observa-se que a classificação quanto ao potencial de irritação variou (DT07 = IM e DT08 = IL).

Todos os cremes dentais da linha adulta apresentaram pH entre 8,80 e 10,80. O pH é uma das características mais importantes dos dentífrícios e, de acordo com a norma internacional ISO 11.609 (ISO 11.609, de dezembro de 1995: *Toothpastes – Requirements, Test Methods and Marking*), ele deve estar dentro de uma faixa considerada de segurança, que vai de 4,5 a 10,5. Embora somente 01 produto tenha apresentado o valor de pH fora da faixa de segurança (DT01, pH=10,8), 06 outros produtos da linha adulta apresentaram pH maior que 9,00

IV.1.2 Produtos da linha infantil

No teste *in vivo*, apenas 02 produtos (20%) foram classificados como não irritantes (NI), enquanto 08 produtos (80%) foram considerados irritantes (Tabela 5). Ao contrário do que foi observado para produtos de uso adulto, nenhum produto da linha infantil apresentou valor de índice de irritação maior que 8,00; indicando um menor potencial de irritação por parte destes produtos. Dentre os 08 produtos infantis que induziram irritação na mucosa oral em hamsters, 04 foram classificados como minimamente irritantes (IMin) e 04 como irritantes leves (IL).

Os produtos desta linha apresentaram faixa de pH mais baixa (entre 5,25 e 8,09) do que aqueles da linha adulta. Mesmo o produto infantil que apresentou o valor de pH mais elevado deste estudo (DT13 = 8,09), teve valor inferior ao mais baixo encontrado para a linha adulta (DT09 = 8,80). Vale ainda ressaltar, que dentre os 04 produtos que obtiveram a classificação máxima encontrada para produtos infantis, isto é, produtos classificados como irritantes leves, 03 apresentam valores de pH maiores que 7,00 (DT13, DT16 e DT17). Além disso, 02 dos

produtos classificados como IL (DT16 e DT19) são do mesmo produtor (FB03), dos produtos DT07 e DT08 da linha adulta, apreendidos com denúncias de causarem severos danos à mucosa oral de seus consumidores. Os demais produtos que causaram danos a mucosa oral de hamsters compatíveis com a classificação de irritante leve (DT13 e DT17) são dos fabricantes FB05 e FB07, respectivamente, e foram as únicas marcas provenientes destes fabricantes.

Dentre os produtos da linha infantil observamos 06 diferentes fabricantes (FB03, FB04, FB05, FB06, FB07 e FB08), conforme pode ser visto na Tabela 1. Cada um dos produtos apresentava uma formulação específica, embora muitos dos ingredientes sejam comuns em algumas das formulações (*e.g.* corantes, lauril sulfato de sódio, carboximetilcelulose, sorbitol etc.). Com exceção dos produtos DT15 (Imin) e DT18 (NI), todos os outros apresentavam flúor (500ppm a 1100ppm) em concentrações menores que aquelas observadas para produtos da linha adulta (1200 ppm a 1500ppm). Dentre os produtos que apresentam maior concentração de flúor (1100ppm) há uma variação significativa quanto aos potenciais de irritação. Por exemplo, o DT01 foi classificado com não irritante (tendo inclusive apresentado o menor índice de irritação observado neste estudo, $I_i = 0,25$), enquanto que os produtos DT13, DT16, DT17 e DT19 foram todos classificados como irritantes leves ($I_i = 6,00$ a $8,00$).

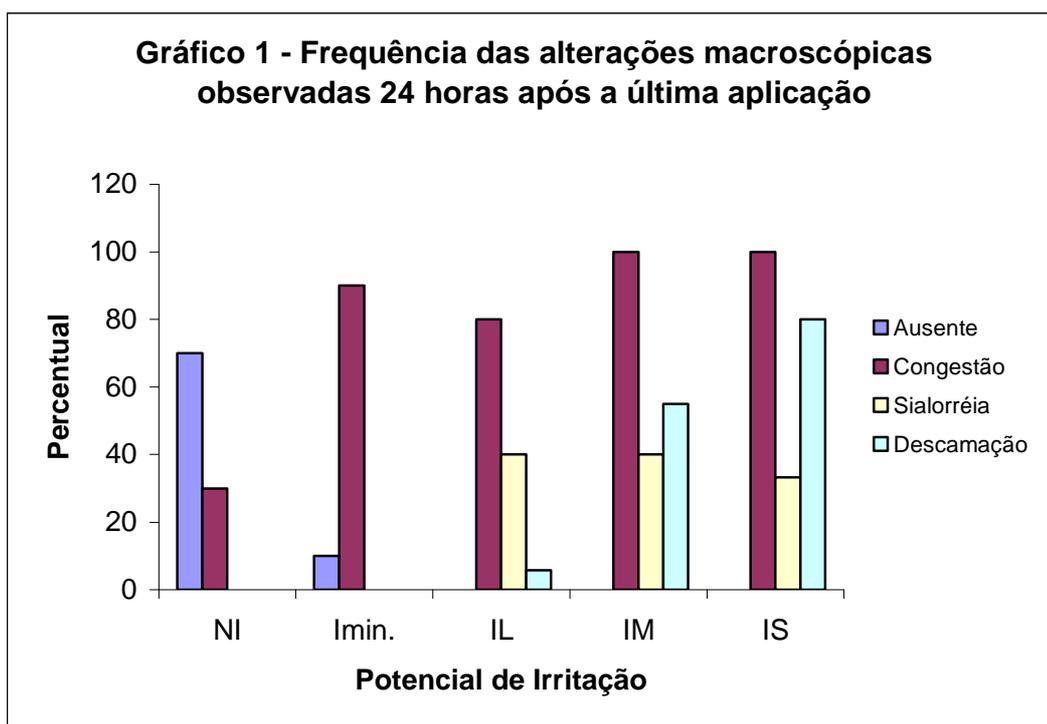
Não havia nos rótulos dos produtos aqui estudados informações a respeito da concentração de outros ingredientes, como *e.g.* do tensoativo lauril sulfato de sódio ou de corantes, que são - a partir de determinadas concentrações - sabidamente irritantes para mucosas e alergênicos.

Vale lembrar, que ao contrário da situação observada para produtos da linha adulta, que foram todos apreendidos com suspeita de desvio da qualidade, os produtos infantis aqui avaliados foram adquiridos comercialmente.

IV.1.3 Análise macroscópica das alterações induzidas por dentifrícios

A avaliação macroscópica das alterações causadas pelos produtos 24 horas após a última aplicação demonstrou que os produtos com baixo potencial de irritação (não irritante / minimamente irritante) induziram apenas reação congestiva dos vasos da mucosa da bolsa gutural. Já os produtos que tiveram a classificação final como irritantes leves (IL), moderados (IM) e severos (IS) causaram congestão, sialorréia e descamação epitelial.

O Gráfico 1 mostra a análise da frequência dos achados macroscópicos na leitura de 24 horas em relação aos diferentes potenciais de irritação (N=100 animais, *i.e.* 5 animais/produto). Nos produtos classificados como não irritantes, 70% dos animais não apresentaram qualquer tipo de alteração e 30% mostraram apenas congestão dos vasos da mucosa oral. Dentre os produtos classificados como minimamente irritantes, em 10% dos animais não observou-se alterações e 90% deles apresentaram congestão. Para os produtos classificados como irritantes leves, 80% dos animais apresentaram quadro congestivo; 40% sialorréia e cerca de 6% descamação do epitélio. Dos produtos classificados como irritantes moderados, 100% dos animais tiveram processo congestivo, 40% em associação com sialorréia e 55% com apresentação de descamação. Esses dados são semelhantes aos observados para os produtos classificados como irritantes severos, onde 100% dos animais apresentaram congestão, 33% com sialorréia e 80% com descamação epitelial.



IV.1.4 Análise microscópica das alterações induzidas por dentifrícios

O Gráfico 2 demonstra as reações teciduais ocorridas após a aplicação dos produtos na bolsa gular de hamsters. Dos produtos classificados como não irritantes, 100% apresentaram epitélio normal (Figura 4a) após a aplicação dos produtos. Dos produtos classificados como minimamente irritantes, 85% apresentaram epitélio normal e 15% apresentaram epitélio com degeneração celular compatível com a classificação de grau 1, conforme demonstrado na Figura 4b.

Dos produtos classificados como irritantes leves, menos de 3,0% apresentaram epitélio normal, cerca de 57,0% apresentaram fenômenos epiteliais de grau 1 e 40,0% de grau 2 (presença de metaplasia, conforme demonstrado na Figura 4c).

Já dentre os produtos classificados como irritantes moderados, nenhum apresentou epitélio normal após a aplicação do produto; cerca de 10,0% apresentaram fenômenos epiteliais de grau 1; 60,0% apresentaram fenômenos epiteliais de grau 2 e aproximadamente 30,0% apresentaram fenômenos epiteliais de grau 3 (presença de erosão local, conforme Figura 4d). Os produtos classificados como irritantes severos apresentaram respectivamente 33,4% de fenômenos epiteliais de grau 2 e 66,6% fenômenos epiteliais de grau 3. Neste estudo não foi observado – em nenhum dos 100 animais avaliados - a presença de erosão generalizada na mucosa, reação compatível com a classificação de grau 4.

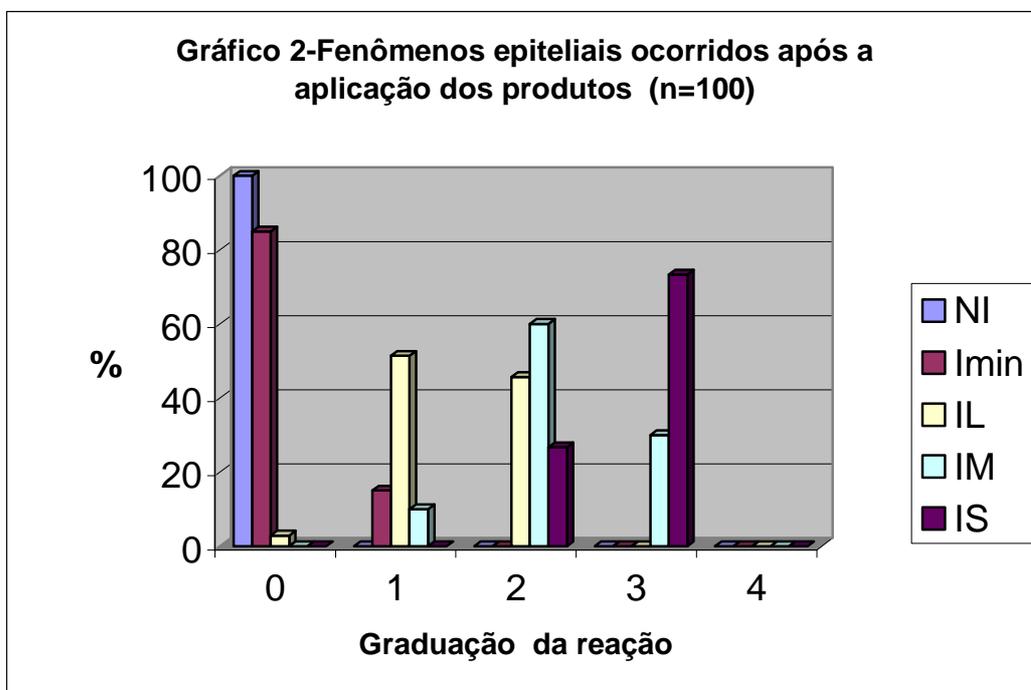


Figura 4: Fenômenos epiteliais ocorridos após aplicação de produtos na bolsa gular de hamsters.

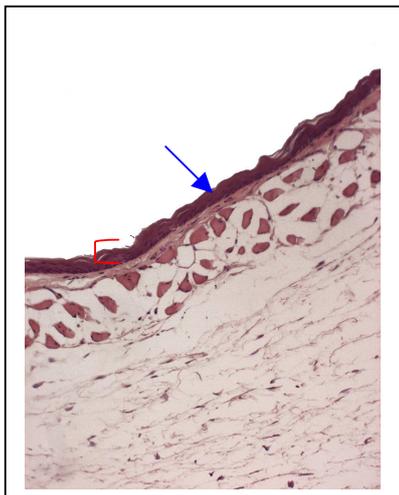


Fig. 4a: Epitélio normal (seta) – 20X



Fig. 4b: Epitélio grau 1 (seta) – 20X

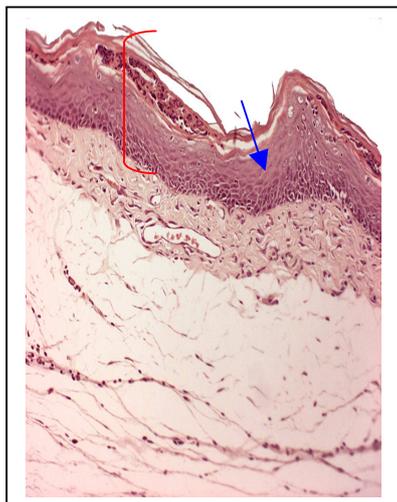


Fig. 4c: Epitélio grau 2 (seta)- 20X

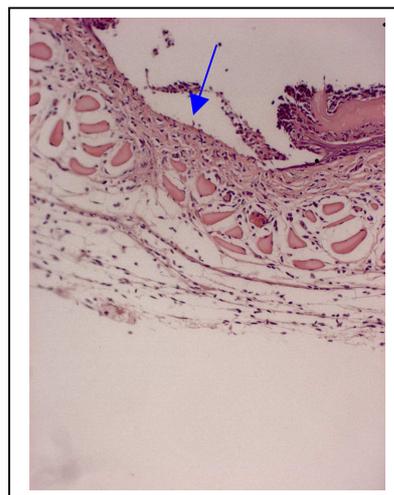


Fig. 4d: Epitélio grau 3 (seta) - 20X

O Gráfico 3 apresenta as graduações de infiltrado leucocitário ocorrido após a aplicação dos produtos na bolsa gutural. Dentre os animais tratados com produtos classificados como não irritantes, 80,0% não apresentaram infiltrado leucocitário (Figura 5a), enquanto que 20,0% apresentaram infiltrado leucocitário compatível com a classificação de grau 1 (*i.e.* menor que 25 células inflamatórias, Figura 5b). Dos animais tratados com produtos classificados como irritantes mínimos, 35,0% não apresentaram infiltrado leucocitário, 40,0% apresentaram infiltrado leucocitário de grau 1, 20,0% de grau 2 (com a presença de 25 a 50 células inflamatórias, Figura 5c) e 5,0% de grau 3 (com 51 a 100 células inflamatórias, Figura 5d).

Nos grupos classificados como irritantes leves, moderados e severos, a análise histopatológica evidenciou, em 100% dos animais analisados, a presença de células inflamatórias. Dos animais que receberam produtos classificados como irritantes leves, 17,1% apresentaram infiltrado leucocitário de grau 1; 20,0% de grau 2; 45,7% de grau 3 e 17,2% de grau 4 (com mais de 100 células inflamatórias, Figura 5e).

Dentre os animais tratados com produtos irritantes moderados e severos, todos apresentaram infiltrado leucocitário de - no mínimo - grau 2. Assim, dentre os animais do grupo dos irritantes moderados, 10% apresentaram infiltrado leucocitário de grau 2; 40% de grau 3 e 50% de grau 4; enquanto que dos animais tratados com os produtos considerados como irritantes severos, 13,3% apresentaram infiltrado leucocitário de grau 2; 33,3% de grau 3 e 53,4% de grau 4.

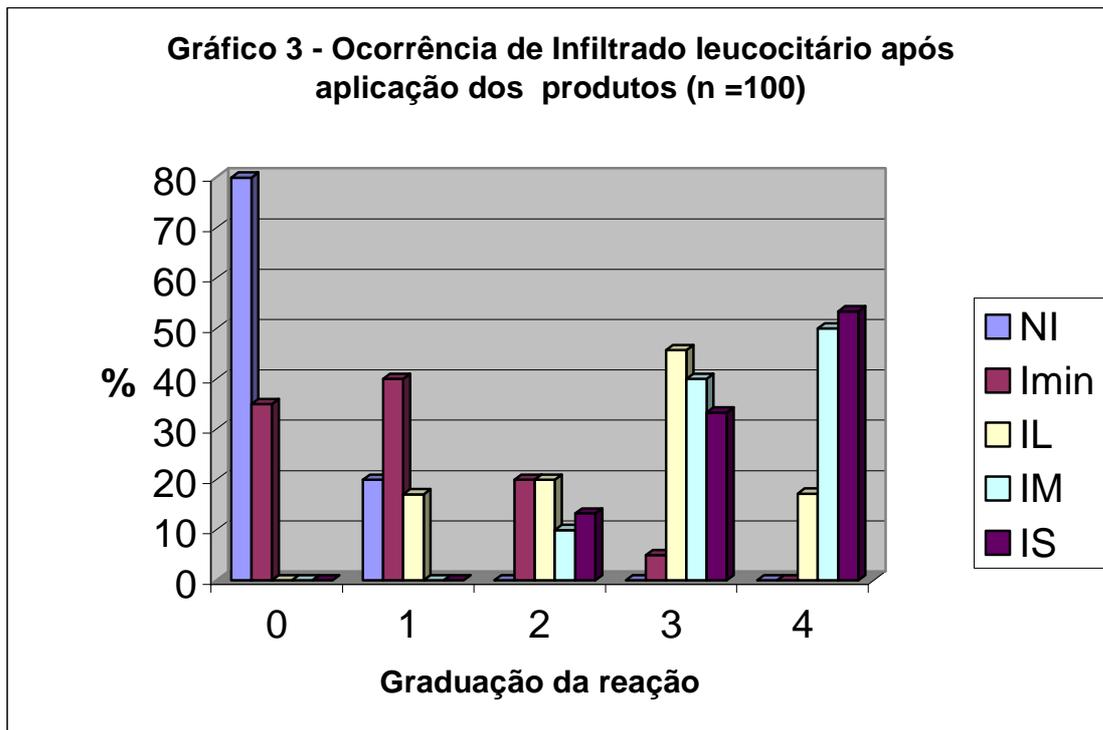


Figura 5: Infiltrado leucocitário ocorrido após aplicação de produtos na bolsa gular de hamsters.

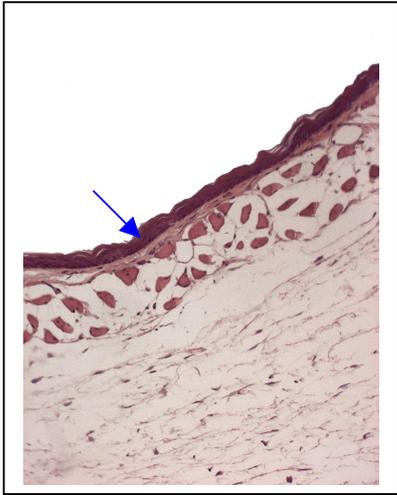


Fig. 5a: Infiltrado grau 0 – 20X

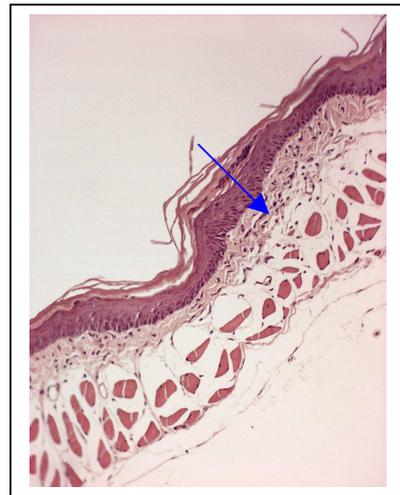


Fig. 5b: Infiltrado grau 1 – 20X

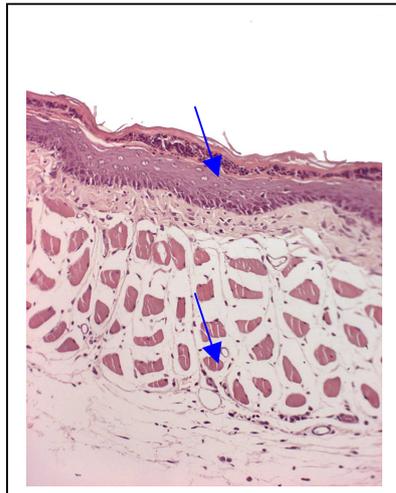


Fig. 5c: Infiltrado grau 2 – 20X

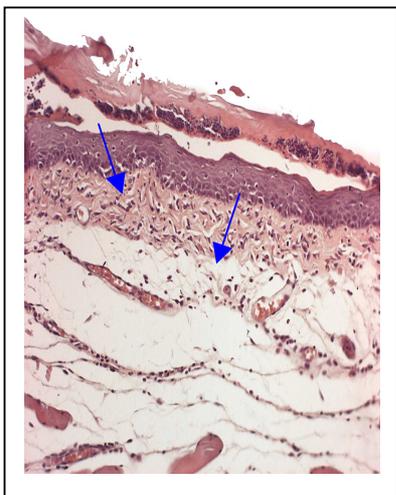


Fig. 5d: Infiltrado grau 3 – 20X

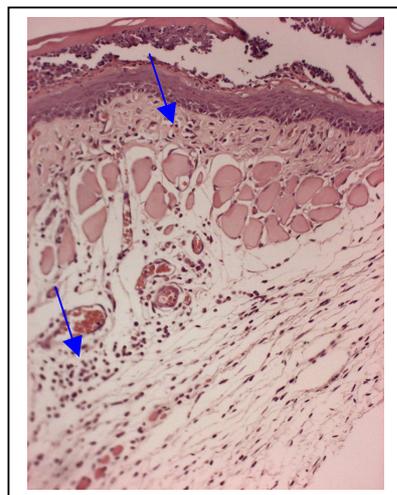


Fig. 5e: Infiltrado grau 4 - 20X

O Gráfico 4 demonstra as reações congestivas ocorridas após a aplicação dos produtos na bolsa gular de hamsters. Dentre animais tratados com produtos classificados como não irritantes, 70,0% não apresentaram qualquer sinal de processo congestivo após a aplicação dos produtos (Figura 6a) e 30,0% apresentaram congestão compatível com a classificação mínima, *i.e.* grau 1 (Figura 6b). Esta proporção é inversa para os animais expostos aos produtos classificados como irritantes mínimos; onde somente 30,0% não apresentaram qualquer tipo de processo congestivo e 70,0% apresentaram congestão mínima (grau 1).

Dos animais tratados com produtos classificados como irritantes leves, apenas 2,9% não apresentaram processo congestivo; 57,1% apresentaram congestão compatível com grau 1; 34,3% com grau 2 (Figura 6c) e 5,7% com grau 3 (Figura 6d). Dos produtos classificados como irritantes moderados, 5,0% apresentaram congestão de grau 1; 85,0% de grau 2 e 10,0% de grau 3. Dentre os animais tratados com produtos classificados como irritantes severos, 33,6% apresentaram congestão de grau 2 e 66,4% de grau 3. Nenhum animal deste estudo apresentou reações congestivas marcantes, acompanhadas de hemorragia, compatíveis com a classificação de grau 4.

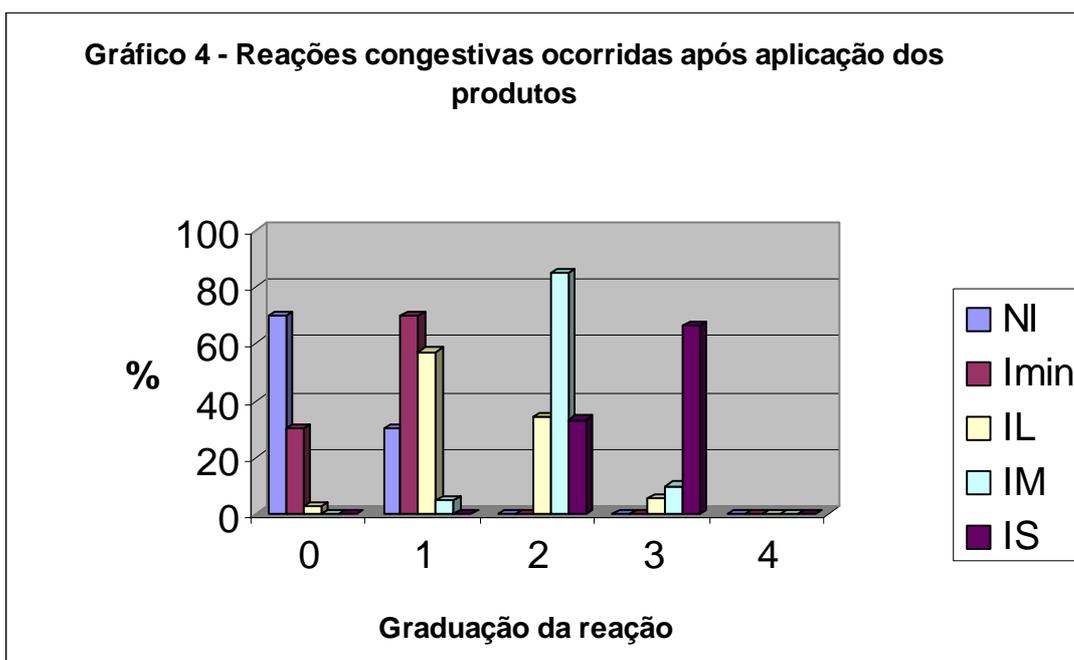


Figura 6: Fenômenos congestivos ocorridos após aplicação de produtos na bolsa gular de hamsters.

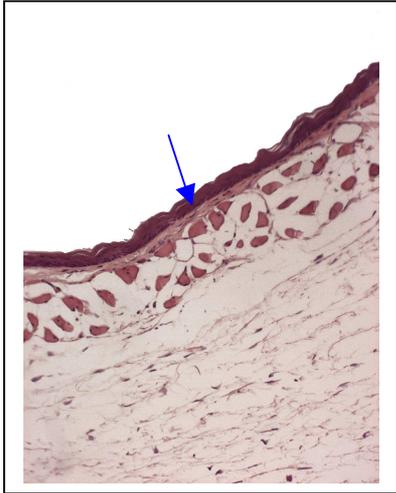


Fig. 6a: Congestão grau 0 – 20X

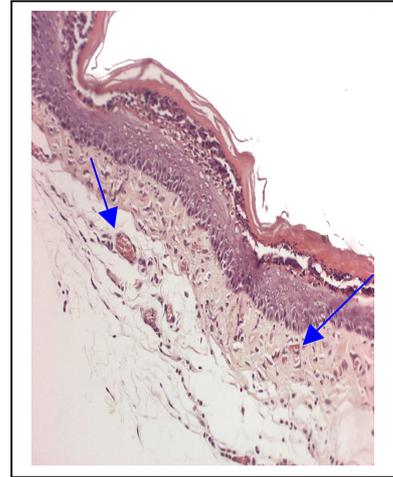


Fig. 6b: Congestão grau 1 – 20X

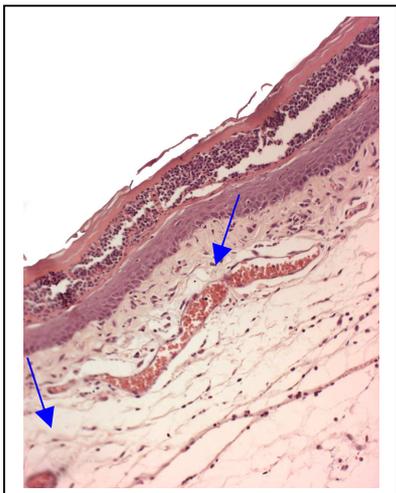


Fig. 6c: Congestão grau 2 – 20X

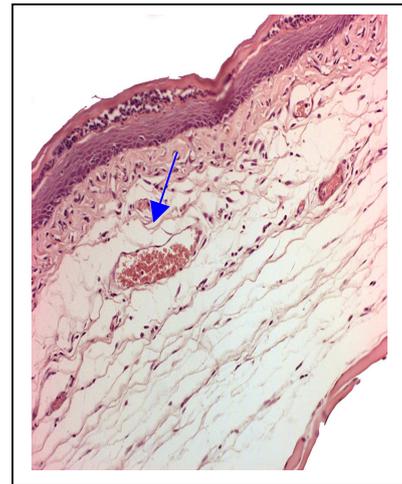


Fig. 6d: Congestão grau 3 – 20X

O Gráfico 5 mostra a presença de edema após a aplicação dos produtos na bolsa gatural de hamsters. Nenhum dos animais tratados com produtos do grupo classificado como não irritante apresentou edema (Figura 7a). Dentre os animais tratados com produtos classificados como irritantes mínimos, 85,0% não apresentaram qualquer sinal de edema após a aplicação dos produtos e 15,0% apresentaram edema mínimo, compatível com o grau 1 (Figura 7b). Dos animais tratados com produtos classificados como irritantes leves; 42,8% não apresentaram edema, 48,6% apresentaram edema de grau 1 e 8,6% de grau 2 (edema médio, segundo classificação ISO 10.993, Figura 7c). Dos animais expostos a produtos classificados como irritantes moderados, apenas 5,0% não apresentaram edema, 90,0% apresentam edema de grau 1 e 5,0% de grau 2. Dos animais tratados com produtos classificados como irritantes severos; 33,6% apresentaram edema de grau 1 e 66,4% de grau 2. Não observamos neste estudo a ocorrência de edema dos graus 3 (moderado) e 4 (marcante).

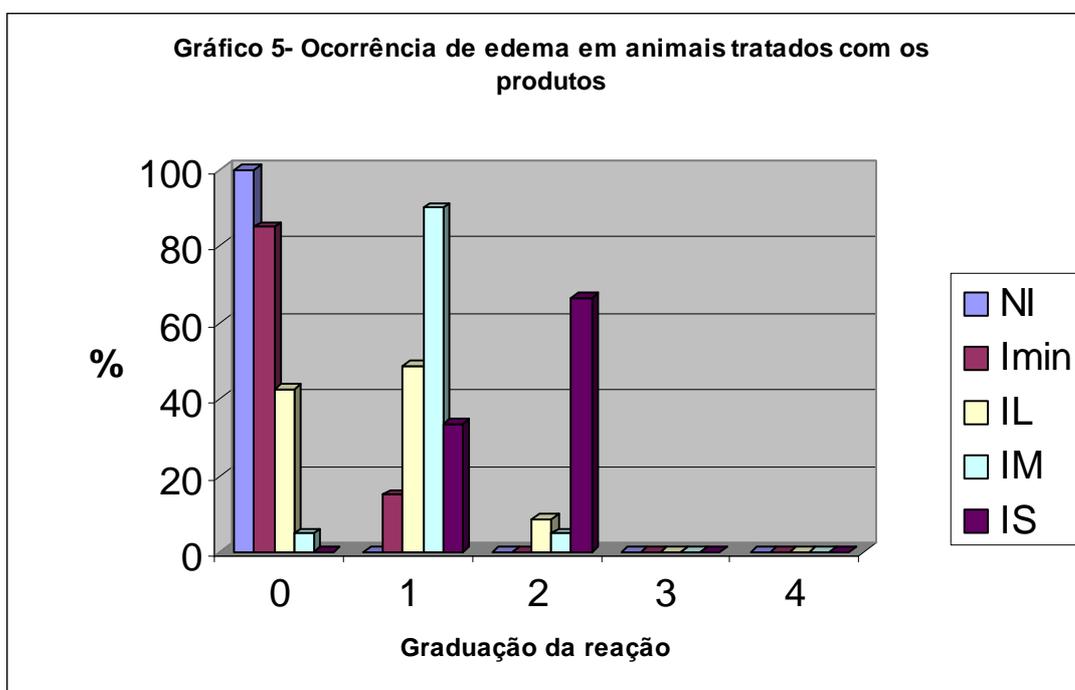


Figura 7: Edemas ocorridos após aplicação de produtos na bolsa gular de hamsters.



Fig. 7a: Edema grau 0 – 20X

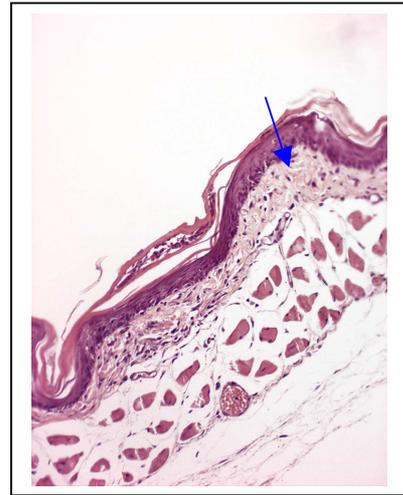


Fig. 7b: Edema grau 1 – 20X

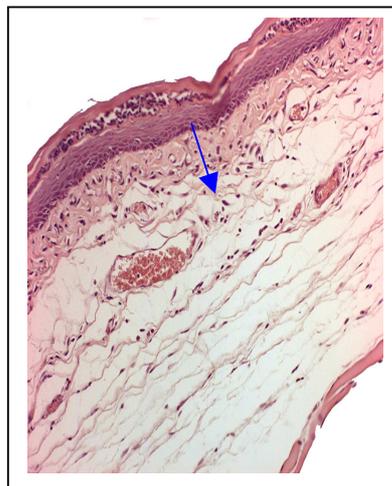


Fig. 7c: Edema grau 2 – 20X

IV.2 Ensaio in vitro

O ensaio HET-CAM foi realizado por dois analistas, em ensaios independentes e com todos os 20 produtos analisados *in vivo*, nas concentrações 10% (em triplicata) e 100%. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 6.

IV.2.1 Variação intra-laboratorial: variação dos resultados obtidos entre analistas

Os resultados dos testes realizados com produtos a 10% pouco variaram entre os analistas (Tabela 6). Apesar do valor médio dos escores encontrados nos ensaios independentes (três ensaios para cada analista) não ser idêntico para a maioria dos produtos (DT01, DT03, DT04, DT06, DT07, DT08, DT11, DT12, DT14, DT15, DT17, DT18 e DT19), os valores finais obtidos para cada produto são muito semelhantes entre si e ambos analistas atribuíram a mesma classificação final para todos os produtos estudados (Tabela 6).

Na análise dos produtos puros, observou-se discordância na classificação atribuída pelos analistas para os produtos DT9, DT10, DT12 e DT18 (Tabela 6). Pela análise do analista 1, os produtos DT9 e DT18 foram considerados irritantes severos e os produtos DT10 e DT12 irritantes moderados, enquanto que para o analista 2 esses mesmos produtos foram irritantes moderados e irritantes severos, respectivamente.

Tabela 6: Resultados obtidos no ensaio HET-CAM.

Código	HET-CAM			
	10% Analista 1	Analista 2	100% Analista 1	Analista 2
DT01				
Por ensaio	6,75 / 8 / 8	8 / 8 / 8	-	-
Final Ψ	7,58 (IM)	8,0(IM)	15,5 (IS)	12,0 (IS)
DT02				
Por ensaio	8 / 8 / 8	8 / 8 / 8	-	-
Final Ψ	8,0(IM)	8,0(IM)	10,4 (IS)	11,5 (IS)
DT03				
Por ensaio	8,45 / 8,5 / 7,25	8 / 8 / 8	-	-
Final Ψ	7,87(IM)	8,0(IM)	13,0 (IS)	11,5 (IS)
DT04				
Por ensaio	8 / 8 / 8,5	8 / 8 / 8	-	-
Final Ψ	7,93(IM)	8,0(IM)	11,25 (IS)	10,5 (IS)
DT05				
Por ensaio	8 / 8 / 8	8 / 8 / 8	-	-
Final Ψ	8,0(IM)	8,0(IM)	10,5 (IS)	11,5 (IS)
DT06				
Por ensaio	8 / 8 / 9,5	8 / 8 / 9	-	-
Final Ψ	8,5(IM)	8,33 (IM)	13,25 (IS)	10,0 (IS)
DT07				
Por ensaio	6,75 / 8 / 8	8 / 8 / 8	-	-
Final Ψ	7,58(IM)	8,0(IM)	12,0(IS)	12,0(IS)
DT08				
Por ensaio	6,75 / 5,5 / 8	8 / 8 / 8	-	-
Final Ψ	6,75(IM)	8,00(IM)	9,5 (IS)	10,0 (IS)
DT09				
Por ensaio	8 / 8 / 8	8 / 8 / 8	-	-
Final Ψ	8,0(IM)	8,0(IM)	10,0 (IS)	8,0 (IM)
DT10				
Por ensaio	8 / 8 / 8	8 / 8 / 8	-	-
Final Ψ	8,0(IM)	8,0(IM)	8,5 (IM)	10,0 (IS)

[continuação da Tabela 6]

Código	HET-CAM			
	10% Analista 1	Analista 2	100% Analista 1	Analista 2
DT11				
Por ensaio	1,25 / 2,25 / 3	4 / 4 / 3	-	-
Final Ψ	2,17(IL)	3,67(IL)	9,0 (IS)	9,0 (IS)
DT12				
Por ensaio	2,25 / 4,2 / 4	2,5 / 2,5 / 3	-	-
Final Ψ	3,48(IL)	2,67(IL)	8,75 (IM)	10,0 (IS)
DT13				
Por ensaio	8 / 8 / 8	8 / 8 / 8	-	-
Final Ψ	8,0(IM)	8,0(IM)	10,0 (IS)	10,5 (IS)
DT14				
Por ensaio	8 / 8 / 8	6,5 / 8 / 6,5	-	-
Final Ψ	8,0(IM)	7,0(IM)	11,25 (IS)	10,0 (IS)
DT15				
Por ensaio	8 / 6,75 / 8,5	8 / 8 / 6	-	-
Final Ψ	7,75(IM)	7,33(IM)	10,5 (IS)	10,0 (IS)
DT16				
Por ensaio	8 / 8 / 8	8 / 8 / 8	-	-
Final Ψ	8,0(IM)	8,0(IM)	15,0 (IS)	9,5 (IS)
DT17				
Por ensaio	6,25 / 7,0 / 8	8 / 8 / 8	-	-
Final Ψ	7,08 (IM)	8,0 (IM)	11,0 (IS)	10,0 (IS)
DT18				
Por ensaio	4,5 / 3 / 2,75	4,5 / 2,5 / 2,25	-	-
Final Ψ	3,42(IL)	3,08(IL)	11,25 (IS)	8,0 (IM)
DT19				
Por ensaio	8,5 / 8 / 8	8 / 8 / 8	-	-
Final Ψ	8,17(IM)	8,0(IM)	8,25 (IM)	8,5 (IM)
DT20				
Por ensaio	8 / 8 / 8	8 / 8 / 8	-	-
Final Ψ	8,0(IM)	8,0(IM)	9,5 (IS)	10,0 (IS)

Ψ: para os produtos a 10% o valor final se refere a média das triplicatas obtidas por cada analista.

Com relação à análise da correlação existente entre os valores de índice de irritação obtidos por cada um dos analistas, pode-se dizer que a concordância muito foi maior com os resultados obtidos com os produtos testados diluídos a 10%, do que quando testados puros (Tabela 7).

Tabela 7: Coeficientes de correlação de Pearson e Spearman entre os resultados obtidos pelos diferentes analistas.

	Teste <i>in vivo</i>	
	Pearson	Spearman
Teste <i>in vitro</i>		
Produtos a 10%	0,944	0,617
Produtos a 100%	0,396	0,383

Há uma forte correlação entre os valores obtidos pelos 02 analistas quando os produtos foram testados na concentração de 10%. Os coeficientes de correlação obtidos foram de 0,944 ($p=0,000$) pelo coeficiente de correlação de Pearson e 0,617 ($p=0,004$) pelo coeficiente de correlação de Spearman, conforme demonstrado na tabela 7. Os valores de p , tanto no teste de Pearson quanto no teste de Spearman mostram o alto nível de significância estatística de ambos os testes.

Não observou-se boa correlação entre os resultados obtidos entre os analistas 1 e 2 quando os produtos foram testados puros. Os coeficientes de Pearson e Spearman obtidos para a concentração de 100% foram de 0,396 ($p=0,084$) e 0,383 ($p=0,095$), respectivamente, conforme mostra a Tabela 7. Não há, portanto, correlação estatisticamente significativa entre as análises dos 02 analistas, quando os produtos foram avaliados puros.

No caso específico de dentifrícios, vale ainda ressaltar a dificuldade encontrada pelos analistas para realização das análises com os produtos puros. A natureza dos cremes e géis

dentais (*i.e.* viscosidade, coloração e opacidade) dificulta enormemente as leituras dos fenômenos induzidos na membrana córion-alantóide. Esta dificuldade foi contornada com todos os produtos quando estes foram diluídos a 10%.

IV.2.2 Variação intra-laboratorial: variação dos resultados em repetições realizadas pelo mesmo analista

Repetições de ensaios por um mesmo analista foram realizadas somente para os produtos diluídos a 10%. Embora o valor médio dos escores encontrados em cada ensaio independente seja diferente para alguns produtos, em todas as repetições os analistas atribuíram a mesma classificação, com uma única exceção o produto DT06 ($I_i \leq 8,0 = IM$ e $I_i \geq 9,0 = IS$). É importante ressaltar que os produtos foram codificados e os analistas não tinham conhecimento dos resultados prévios obtidos com cada produto analisado.

IV.3 Correlação entre o teste *in vivo* e o teste HET-CAM

Os produtos testados na concentração de 10% apresentaram classificações mais próximas as obtidos no teste *in vivo* do que quando testados puros. As únicas exceções foram os produtos DT01 e DT03, que foram considerados irritantes severos *in vivo* e no HET-CAM a 100%, mas que na avaliação dos produtos a 10% foram classificados como irritantes moderados (Tabela 8).

Tabela 8: Classificação dos produtos em relação aos testes *in vivo* e o HET-CAM

Produto	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i> (100%)	<i>In vitro</i> (10%)
DT01	IS	IS	IM
DT02	IM	IS	IM
DT03	IS	IS	IM
DT04	IM	IS	IM
DT05	IM	IS	IM
DT06	IL	IS	IM
DT07	IM	IS	IM
DT08	IL	IS	IM
DT09	IS	IS/IM*	IM
DT10	IL	IM/IS*	IM
DT11	NI	IS	IL
DT12	IMin.	IM/IS*	IL
DT13	IL	IS	IM
DT14	IMin.	IS	IM
DT15	IMin.	IS	IM
DT16	IL	IS	IM
DT17	IL	IS	IM
DT18	NI	IS/IM*	IL
DT19	IL	IM	IM
DT20	IMin.	IS	IM

*: discordância de resultados entre os dois analistas.

A análise dos escores obtidos no hamster e no HET-CAM (média dos valores obtidos pelos 02 analistas) mostra que há uma correlação estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os dois métodos, mesmo quando os produtos foram testados puros (Tabela 9).

Os coeficientes de correlação obtidos com os produtos testados na concentração de 10% foram de 0,660 ($p=0,002$) pelo coeficiente de correlação de Pearson e 0,510 ($p=0,022$) pelo coeficiente de correlação de Spearman.

Conforme mostra a Tabela 9, os coeficientes de Pearson e Spearman obtidos para a concentração de 100% foram levemente inferiores, *i.e.* 0,517 ($p=0,019$) e 0,488 ($p=0,032$), respectivamente, porém estatisticamente significativos.

Tabela 9: Coeficientes de correlação de Pearson e Spearman entre teste *in vivo* e HET-CAM.

	Teste <i>in vivo</i>	
	Pearson	Spearman
Teste <i>in vitro</i>		
Produtos a 10%*	0,660	0,510
Produtos a 100% *	0,517	0,488

*Valores: média dos valores obtidos pelos analistas

A análise da correlação existente entre os escores obtidos no teste HET-CAM com produtos a 10% e a 100% e aqueles obtidos na avaliação de cada parâmetro medido na mucosa oral de hamsters (alterações de epitélio, infiltrado inflamatório, congestão e edema) encontra-se na Tabela 10.

Tabela 10: Coeficientes de correlação de Pearson e Spearman entre os diferentes parâmetros avaliados no teste *in vivo* e HET-CAM.

	Teste <i>in vitro</i>	
	Produtos a 10%*	Produtos 100%*
Coeficiente de Pearson		
Teste <i>in vivo</i>		
Alterações de epitélio	0,611 ($p = 0,004$)	0,437 ($p = 0,054$)
Infiltrado inflamatório	0,663 ($p = 0,001$)	0,502 ($p = 0,024$)
Congestão	0,551 ($p = 0,012$)	0,446 ($p = 0,049$)
Edema	0,547 ($p = 0,013$)	0,498 ($p = 0,026$)
Coeficiente de Spearman		
Teste <i>in vivo</i>		
Alterações de epitélio	0,480 ($p = 0,032$)	0,402 ($p = 0,0709$)
Infiltrado inflamatório	0,453 ($p = 0,045$)	0,514 ($p = 0,020$)
Congestão	0,464 ($p = 0,039$)	0,354 ($p = 0,125$)
Edema	0,450 ($p = 0,047$)	0,465 ($p = 0,039$)

**Valores: média dos valores obtidos pelos analistas*

No caso dos produtos testado a 10%, a correlação existente entre os achados microscópicos no teste *in vivo* e o teste HET-CAM foi estatisticamente significativa para todos os parâmetros avaliados. Porém, a correlação observada entre o teste *in vivo* e o HET-CAM não mostrou-se significativa para fenômenos relacionados a alterações de epitélio e congestão, no caso dos produtos testados puros.

IV.4 Grau de preditibilidade do teste HET-CAM em relação ao teste de irritação da mucosa oral em hamsters

Considerando a baixa incidência de produtos não irritantes *in vivo* neste estudo (10%, N=2), optamos por não avaliar a preditibilidade do ensaio HET-CAM para produtos “não irritantes” ($I_i \leq 0,99$), e sim para produtos com “baixo potencial irritante”. Agrupamos, assim, todos os produtos com baixo potencial irritante (BPI), estipulando novo ponto de corte de $I_i \leq 4,99$ para classificar esta nova categoria de produtos. Destarte, considerou-se produtos BPI todo e qualquer produto que tenha produzido escores *in vivo* ou *in vitro* menores ou iguais a 4,99 (BPI = $I_i \leq 4,99$).

Foi, então, montada uma tabela de contingência, levando-se em consideração os resultados obtidos no modelo *in vivo* e os resultados obtidos com produtos testados a 10% no HET-CAM. Calculou-se a sensibilidade, a especificidade e a precisão do teste *in vitro* com relação aos resultados obtidos no modelo animal, como pode ser observado na Tabela 11.

Tabela 11: Frequência de concordância e discordância de resultados entre os ensaios *in vivo* e *in vitro* (Ponto de corte 4,99).

		<i>in vitro</i>	
		NI (=BPI)	I
<i>in vivo</i>	NI (=BPI)	3 a	3 b
	I	0 c	14 d

NI: não irritante (=BPI: baixo potencial irritante)

e I: irritante

Assim, considerando o ponto de corte para produtos não irritantes como $I_i \geq 4,99$; observamos que a precisão do teste HET-CAM foi de 85%, a sensibilidade de 100%, e a especificidade foi de 50% (Tabela 11).

Os produtos de uso infantil (DT14, DT15 e DT20) foram considerados de baixo potencial irritante *in vivo*, pois apresentaram valores de $I_i \leq 4,99$ no ensaio em hamster (I_i *in vivo* = 2,25, 1,50 e 2,50, respectivamente), porém na membrana córion alantóide estes mesmos produtos induziram efeitos que levaram a um $I_i > 4,99$. Embora pela nossa classificação estes produtos tenham sido considerados falso-positivos (BPI *in vivo*, mas não *in vitro*), devemos considerar que dentre os seis produtos BPI, estes foram exatamente os três que apresentaram os valores mais altos de índice de irritação *in vivo* (vide Tabela 5).

V. DISCUSSÃO

A análise dos processos de apreensão dos dentifrícios que ingressaram no INCQS mostra um quadro de sinais e sintomas comuns a todos os usuários dos produtos de uso adulto aqui avaliados. Entre os sintomas descritos com maior frequência, destacam-se: ulcerações na mucosa oral, reação alérgica, queimação nos lábios, língua e gengivas, queixas de ardência após o uso e aparecimento de bolhas nos lábios.

A observação de tais denúncias torna-se particularmente preocupante se levado em consideração as condições de uso destes produtos (*i.e.* o fato de serem produtos com aplicação regular e prolongada) e seu uso inadequado, com possíveis desvios de seu emprego por parte do mercado consumidor, como por exemplo, o fato de haver entre os laudos de apreensão relatos de danos à mucosa oral de mais de uma criança, apesar de se tratar de produtos de uso adulto.

Além disso, o fato de que dentifrícios são produtos de higiene bucal e, portanto, produtos que podem ser parcialmente ingeridos, sobretudo quando usados por crianças, deve ser considerado um fator agravante na avaliação do risco deste tipo de exposição. O grau de permeação da mucosa oral - independente da ingestão parcial ou não do produto - deve ser igualmente considerado, haja vista que há nesta mucosa, estruturas mais permeáveis que as de outras partes do corpo comumente exposta a produtos cosméticos (*e.g.* pele íntegra), oferecendo assim um menor grau de proteção no que diz respeito à absorção de ingredientes tóxicos. (Corbett *et al*, 1999)

Na avaliação do risco de produtos cosméticos, três tipos principais de reações podem ser observados: (i.) “irritação”: uma intolerância local podendo corresponder a reações de desconforto menores, mas também há reações mais ou menos agudas, variando sua intensidade, desde ardor, coceira e pinicação podendo chegar até a corrosão e destruição do tecido. No processo de irritação todas estas reações se restringem à área em contato direto com o produto; (ii.) “sensibilização”: corresponde a um tipo de alergia, que pode ser uma reação de efeito imediato (de contato ou urticária) ou tardio (hipersensibilidade). Ela envolve mecanismos imunológicos e pode aparecer em área diferente da área de aplicação. Portanto, é importante insistir que no campo da imunologia deve-se, não apenas, verificar se um produto pode

desencadear uma resposta alérgica em pessoas pré-sensibilizadas, mas também, verificar se o próprio produto não é capaz de induzir uma reação alérgica ao consumidor; e (iii.) “efeito sistêmico”: resultante da passagem de quaisquer ingredientes do produto para a circulação geral, diretamente por via oral, inalatória, transcutânea ou transmucosa; metabolizados ou não (ANVISA, 2003).

Apesar do teste de irritação da mucosa oral ter se mostrado útil, confirmando as denúncias quanto ao potencial irritante dos produtos de uso adultos aqui avaliados, ele *per se* não é suficiente para indicar as causas que levaram ao desvio da qualidade. Para isso, teria sido necessária a realização de ensaios adicionais, tais como a identidade e a determinação dos teores de princípios ativos (substâncias abrasivas, umectantes, flavorizantes, corantes, tensoativos, entre outros), além da investigação sobre o grau de pureza dos princípios ativos presentes em cada formulação estudada. No entanto, avaliações quanto às especificações de identidade e pureza não foram realizados no INCQS. Os aspectos que impediram a realização destes ensaios vão desde o alto custo destas avaliações e a dificuldade de aquisição de padrões específicos para cada avaliação em particular, até o fato de não haver - até o momento - metodologias oficiais para certas avaliações. Além disso, salvo casos mais específicos, cabe à indústria produtora pesquisar as causas que levaram ao desvio da qualidade de seus produtos, e não ao laboratório oficial.

A presença de impurezas na matéria prima utilizada nos produtos aqui estudados é uma provável causa para o aparecimento dos efeitos danosos observados na mucosa oral, mesmo que os teores de cada princípio ativo estejam em conformidade com os recomendados pela ANVISA. O fato de que mais de um fabricante (FB01, FB02 e FB03) de produtos de uso adulto tenham tido seus produtos apreendidos por denúncias de irritação e reprovados nos testes de segurança do INCQS, aponta para a hipótese de que o desvio da qualidade tenha ocorrido em decorrência do uso de alguma matéria prima de uso comum em todas as formulações avaliadas (*e.g.* presença de impurezas em algum dos ingredientes como carbonato de cálcio, monofluorofosfato de sódio, lauril sulfato de sódio, carboximetilcelulose, entre outros). Além disso, as apreensões ocorreram entre o segundo semestre de 2002 e o primeiro semestre de 2004, e após este período, não houve mais registro de apreensões e/ou análises fiscais de dentifrícios no INCQS, apontando mais uma vez para um desvio da qualidade pontual e contornado pelos fabricantes em questão.

Vale ressaltar que embora as apreensões tenham ocorrido com produtos de 03 fabricantes diferentes e que o desvio da qualidade tenha sido confirmado por laudos do INCQS para todos os produtos de uso adulto, somente os lotes do fabricante FB01 foram suspensos para uso e comercialização por determinação da ANVISA (RESOLUÇÃO n° 192, de 4 de fevereiro de 2003 e RESOLUÇÃO n° 61, de 13 de janeiro de 2003 da ANVISA). Além disso, é digno de nota o fato de que as resoluções de suspensão de uso e comercialização datem de janeiro e fevereiro de 2003, mas que os produtos impróprios para consumo tenham continuado em uso pelo mercado consumidor, já que as apreensões por denúncia perduraram até maio de 2004. Não foi possível realizar levantamento quanto à existência de sanções (*e.g.* inspeções, multas etc) aos outros fabricantes, que podem ter sido tomadas pelas autoridades locais (Secretarias Municipais ou Estaduais de Saúde), onde as indústrias estão estabelecidas.

Enquanto há na legislação vigente (RDC/ANVISA No 215 de 2005) referência quanto aos limites permitidos de alguns princípios ativos em dentifrícios e enxaguatórios bucais (como *e.g.* monofluorfosfato de amônio, monofluorfosfato de cálcio, monofluorfosfato de potássio, monofluorfosfato de sódio, fluoreto de sódio, fluoreto de potássio, fluoreto de amônio, fluoreto de alumínio, dihidrofluoreto de 3-(N-hexadecil-N-2-hidroxiethylamônio) propilbis- (2-hidroxiethyl) amônio, fluorsilicato de sódio, entre outros), outros ingredientes como por exemplo os tensoativos, que deveriam ser considerados devido ao seu alto potencial irritante, não são sequer citados (Quadro 2). Sendo assim, produtores de dentifrícios podem - *a priori* - utilizar as concentrações de tensoativos que considerarem seguras em suas formulações, desde que as mesmas estejam em consonância com o que foi declarado no registro do produto junto à ANVISA.

Há muito se sabe que a toxicidade de tensoativos está diretamente relacionada à sua concentração e ao comprimento de sua cadeia do grupo lipofílico, sendo que os tensoativos iônicos freqüentemente exibem maior efeito do que os não-iônicos (Gloxhuber, 1974).

Os tensoativos causam danos significativos tanto na estrutura lipídica como na protéica da membrana, podendo alterar a capacidade de barreira biológica conferida à pele e mucosas (Froebe *et al.*, 1990; Veys *et al.*, 1994). Segundo alguns autores, tensoativos empregados em dentifrícios são responsáveis pela redução do índice de queratinização do epitélio da mucosa

oral humana devido, provavelmente, à ruptura de junções intercelulares (Flores de Jacoby *et al.*, 1975). Götze (1977) reportou aumento da descamação do epitélio da mucosa oral em decorrência do uso de tensoativos e Guarnieri (1970) investigou os efeitos dos componentes da formulação de dentifrícios na mucosa oral de hamsters adultos e concluiu que os tensoativos - dependendo da concentração de uso - são irritantes para a mucosa da gengiva.

Além do potencial irritante de tensoativos, cabe ressaltar que alguns estudos apontam para uma ação específica destas substâncias sobre a camada mucilaginosa da mucosa oral (Herlofson & Barkvoll, 1994). Dependendo das concentrações em que estão presentes nos produtos, tais substâncias são capazes de desnaturar a camada de mucina da mucosa, perturbando assim o equilíbrio que confere à membrana mucosa proteção não-imune contra a entrada de agentes exógenos. Assim, o epitélio estará mais susceptível a passagem de outros agentes irritantes e alergênicos, sobretudo em indivíduos com lesões bucais pré-existentes, como no caso da presença de úlceras aftosas (aftas), doença comum com incidência de cerca de 20% da população brasileira (Biosaude, 2007).

Quadro 2: Lista de substâncias que - segundo a RDC/ANVISA 215/2005 - os produtos de higiene bucal não devem conter, exceto nas condições e restrições aqui estabelecidas.

	<i>Substância</i>	Campo de aplicação e/ou uso	Concentração máxima autorizada no produto final	Condições de uso e advertências que devem constar no rótulo
01	Monofluorofostato de amônio	a) Dentifrícios b) Enxaguatório bucal	a) 0,15% expresso em flúor. Quando misturado com outros compostos de flúor permitidos nesta lista, a concentração total de flúor não excederá à 0,15% b) 202,5-247,5 ppm	(a) e (b) - Contém monofluorofosfato de amônio (b) - Não usar em crianças com menos de 6 anos de idade
02	Monofluorofostato de cálcio	a) Dentifrícios b) Enxaguatório bucal	a) 0,15% expresso em flúor. Quando misturado com outros compostos de flúor permitidos nesta lista, a concentração total de flúor não excederá à 0,15% b) 202,5-247,5 ppm	(a) e (b) - Contém monofluorofosfato de cálcio (b) - Não usar em crianças com menos de 6 anos de idade
03	Monofluorofostato de potássio	a) Dentifrícios b) Enxaguatório bucal	a) 0,15% expresso em flúor. Quando misturado com outros compostos de flúor permitidos nesta lista, a concentração total de flúor não excederá à 0,15% b) 202,5-247,5 ppm	(a) e (b) - Contém monofluorofosfato de potássio (b) - Não usar em crianças com menos de 6 anos de idade -

04	Monofluorofostato de sódio	a) Dentifrícios b) Enxaguatório bucal	a) 0,15% expresso em flúor. Quando misturado com outros compostos de flúor permitidos nesta lista, a concentração total de flúor não excederá à 0,15% b) 202,5-247,5 ppm	(a) e (b) - Contém monofluorofostato de sódio (b) - Não usar em crianças com menos de 6 anos de idade
05	Fluoreto de alumínio	a) Dentifrícios b) Enxaguatório bucal	a) 0,15% expresso em flúor. Quando misturado com outros compostos de flúor permitidos nesta lista, a concentração total de flúor não excederá à 0,15% b) 202,5-247,5 ppm	(a) e (b) - Contém fluoreto de alumínio (b) - Não usar em crianças com menos de 6 anos de idade
06	Fluoreto estanoso	a) Dentifrícios b) Enxaguatório bucal	a) 0,15% expresso em flúor. Quando misturado com outros compostos de flúor permitidos nesta lista, a concentração total de flúor não excederá à 0,15% b) 202,5-247,5 ppm	(a) e (b) - Contém fluoreto de estanoso (b) - Não usar em crianças com menos de 6 anos de idade
07	Fluoreto de Magnésio	a) Dentifrícios b) Enxaguatório bucal	a) 0,15% expresso em flúor. Quando misturado com outros compostos de flúor permitidos nesta lista, a concentração total de flúor não excederá à 0,15% b) 202,5-247,5 ppm	(a) e (b) - Contém fluoreto de magnésio (b) - Não usar em crianças com menos de 6 anos de idade
08	Fluoreto de cálcio	a) Dentifrícios b) Enxaguatório bucal	a) 0,15% expresso em flúor. Quando misturado com outros compostos de flúor permitidos nesta lista, a concentração total de flúor não excederá à 0,15% b) 202,5-247,5 ppm	(a) e (b) - Contém fluoreto de cálcio (b) - Não usar em crianças com menos de 6 anos de idade -

09	Fluoreto de hexadecilamônio	a) Dentifrícios b) Enxaguatório bucal	a) 0,15% expresso em flúor. Quando misturado com outros compostos de flúor permitidos nesta lista, a concentração total de flúor não excederá à 0,15% b) 202,5-247,5 ppm	(a) e (b) - Contém fluoreto de hexadecilamônio (b) - Não usar em crianças com menos de 6 anos de idade
10	Dihidrofluoreto de 3-(N-hexadecil-N-2-hidroxietilamônio) Propil-bis (2-hidroxietil) amônio	a) Dentifrícios b) Enxaguatório bucal	a) 0,15% expresso em flúor. Quando misturado com outros compostos de flúor permitidos nesta lista, a concentração total de flúor não excederá à 0,15% b) 202,5-247,5 ppm	(a) e (b) - Contém Dihidrofluoreto de 3-(n-hexadecil-n-2-hidroxietilamônio) Propil-bis (2-hidroxietil) amônio (b) - Não usar em crianças com menos de 6 anos de idade
11	Dihidrofluoreto de NN'N'- tris (polioxietileno)-N-hexadecil propilenodiamina	a) Dentifrícios b) Enxaguatório bucal	a) 0,15% expresso em flúor. Quando misturado com outros compostos de flúor permitidos nesta lista, a concentração total de flúor não excederá à 0,15% b) 202,5-247,5 ppm	(a) e (b) - Contém Dihidrofluoreto de NN'N'- tris (polioxietileno)-N-hexadecil propilenodiamina (b) - Não usar em crianças com menos de 6 anos de idade
12	Hidrofluoridrato de nicometanol	a) Dentifrícios b) Enxaguatório bucal	a) 0,15% expresso em flúor. Quando misturado com outros compostos de flúor permitidos nesta lista, a concentração total de flúor não excederá à 0,15% b) 202,5-247,5 ppm	(a) e (b) - Contém hidrofluoridrato de nicometanol (b) - Não usar em crianças com menos de 6 anos de idade -

13	fluoreto de octadecenil amônio	a) Dentifrícios b) Enxaguatório bucal	a) 0,15% expresso em flúor. Quando misturado com outros compostos de flúor permitidos nesta lista, a concentração total de flúor não excederá à 0,15% b) 202,5-247,5 ppm	(a) e (b) - Contém fluoreto de octadecenil amônio (b) - Não usar em crianças com menos de 6 anos de idade
14	Fluorsilicato de sódio	a) Dentifrícios b) Enxaguatório bucal	a) 0,15% expresso em flúor. Quando misturado com outros compostos de flúor permitidos nesta lista, a concentração total de flúor não excederá à 0,15% b) 202,5-247,5 ppm	(a) e (b) - Contém Fluorsilicato de sódio (b) - Não usar em crianças com menos de 6 anos de idade
15	Fluorsilicato de amônio	a) Dentifrícios b) Enxaguatório bucal	a) 0,15% expresso em flúor. Quando misturado com outros compostos de flúor permitidos nesta lista, a concentração total de flúor não excederá à 0,15% b) 202,5-247,5 ppm	(a) e (b) - Contém Fluorsilicato de amônio (b) - Não usar em crianças com menos de 6 anos de idade
16	Fluorsilicato de potássio	a) Dentifrícios b) Enxaguatório bucal	a) 0,15% expresso em flúor. Quando misturado com outros compostos de flúor permitidos nesta lista, a concentração total de flúor não excederá à 0,15% b) 202,5-247,5 ppm	(a) e (b) - Contém Fluorsilicato de potássio (b) - Não usar em crianças com menos de 6 anos de idade

[Continuação Quadro 2].

17	Fluorsilicato de magnésio	a) Dentifrícios b) Enxaguatório bucal	a) 0,15% expresso em flúor. Quando misturado com outros compostos de flúor permitidos nesta lista, a concentração total de flúor não excederá à 0,15% b) 202,5-247,5 ppm	(a) e (b) - Contém Fluorsilicato de magnésio (b) - Não usar em crianças com menos de 6 anos de idade
18	Acetato de estrôncio semihidratado	a) Dentifrício	3,5% Calculado como estrôncio. Quando misturado com outras substâncias permitidas que contenham estrôncio, o conteúdo não deve ser superior a 3,5%	Contém cloreto de estrôncio. Não é recomendado o uso freqüente em crianças.
19	Cloreto de estrôncio hexahidratado	a) Dentifrício	3,5% Calculado como estrôncio. Quando misturado com outras substâncias permitidas que contenham estrôncio, o conteúdo não deve ser superior a 3,5%	Contém cloreto de estrôncio. Não é recomendado o uso freqüente em crianças.

Fonte: Resolução RDC 215 de 2005, da ANVISA

V.1 Toxicologia de Produtos Cosméticos

Segundo dados da Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (ABIHPEC), este setor da indústria brasileira apresentou um crescimento médio deflacionado composto de 10,7% nos últimos anos, tendo passado de um faturamento líquido de impostos sobre vendas de R\$ 7,5 bilhões em 2000 para R\$ 15,4 bilhões em 2005 (ABIHPEC, 2007)

Segundo a ABIHPEC, vários fatores têm contribuído para o excelente crescimento do setor, dentre os quais destacam-se: (i.) a participação crescente da mulher brasileira no mercado de trabalho, (ii.) a utilização de tecnologia de ponta e o conseqüente aumento da produtividade, favorecendo os preços praticados pelo setor, que tem aumentos menores do que os índices de preços da economia em geral; (iii.) lançamentos constantes de novos produtos atendendo cada vez mais às necessidades do mercado e (iv.) 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. O entusiasmo no crescimento de vendas do setor pode induzir o surgimento de novas empresas, que devem, todavia, atender a um criterioso grau de exigência quanto à 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 efeitos adversos 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.* 0,92% do total de casos registrados de intoxicação humana notificados nos Centros de Informação e Assistência Toxicológica no âmbito nacional, durante o ano de 2004. (SINITOX, 2007) 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. 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 de Corbett *et al.*, 1999. Segundo estes autores, os casos de intoxicações em decorrência da exposição a cosméticos e produtos de higiene pessoal representaram a 3^a principal causa de registros 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. Estes mesmo 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.

O Quadro 3 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 o que induziram o mais número de reações adversas. Embora em menor escala, há também neste período registro de reações adversas induzidas por dentifrícios nos EUA.

Quadro 3: Registro do FDA quanto à incidência de reações adversas provocadas por produtos cosméticos nos EUA, entre 1987 e 1995.

Número de reações adversas observadas	Natureza do produto
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	Xampus 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 de intoxicações

V.2 Uso do método HET-CAM na avaliação do potencial irritante de dentífrícios

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.

Os resultados provenientes do presente trabalho vêm contribuir neste sentido, indicando que - nas condições experimentais definidas neste estudo - há uma boa concordância entre os ensaios independentes realizados por um mesmo analista e entre avaliações realizadas por diferentes analistas. Nossos dados permitem concluir que, apesar dos desfechos do método HET-CAM serem qualitativos (observação individual do aparecimento de hiperemia, hemorragia, coagulação/opacidade em função do tempo), a subjetividade das leituras pode ser contornada com treinamento adequado de pessoal especializado.

É importante ressaltar que existem entre diferentes laboratórios diferentes protocolos de estudo, baseados no método original proposto por Luepke na Alemanha, em 1985 (Spielmann *et al*, 1997; Hagino *et al*, 1999; Wilson & Steck 2000; Vinardell & Garcia, 2000; Murillo *et al*, 2003). Apesar dos nossos dados indicarem que a subjetividade da leitura pode ser contornada com treinamento de pessoal especializado, vale citar que este é considerado por alguns autores um limitante do HET-CAM, sobretudo no que diz respeito à variação de resultados entre diferentes laboratórios. Assim, alguns autores utilizam uma variante do método HET-CAM, *i.e.* o método CAM-TBS, cuja avaliação final dos efeitos irritantes é absolutamente quantitativa, através da detecção espectrofotométrica do corante Trypan blue absorvido pela membrana córion-alantóide (Hagino *et al.*, 1991). A absorção do corante pela MCA é um indicativo de destruição e desnaturação da membrana e segundo Hagino *et al.*, 1999 apresenta uma boa correlação com os escores obtidos para as lesões de córnea observados no teste de Draize em coelhos.

Uma das limitações detectadas em nosso estudo sobre a avaliação de dentifrícios pelo método HET-CAM foi o uso de produtos não diluídos. A natureza dos cremes e géis dentais (*i.e.* viscosidade, coloração e opacidade) dificulta enormemente as leituras dos fenômenos induzidos na membrana córion-alantóide. No entanto, esta dificuldade foi contornada com todos os produtos quando estes foram testados diluídos. Além disso, os resultados obtidos *in vitro* se correlacionaram melhor com os obtidos no modelo animal, quando os produtos foram testados a 10% no HET-CAM, do que quando foram testados puros.

Embora o método HET-CAM já tenha sido aplicado na avaliação do potencial irritante de uma variedade de produtos, entre eles tensoativos, xampus, condicionadores, extratos de plantas e até de produtos utilizados em terapias ortodônticas e cremes e géis fixadores de dentaduras (Silva *et al.*, 1992; Schendel *et al.*, 1994, Spielmann *et al.*, 1997; Hagino *et al.*, 1999; Wilson & Steck 2000; Debbasch *et al.*, 2005; Al *et al.*, 2005 e Mehling *et al.*, 2006), não encontramos na literatura nenhum estudo que avaliasse o potencial irritante de dentifrícios pelo HET-CAM, nem a correlação deste método com o método de irritação da mucosa oral de hamsters.

V.3 Considerações sobre o método HET-CAM

Ovos embrionados de galinha têm sido usados em muitos laboratórios e há mais de duas décadas na avaliação da toxicidade de uma variedade de substâncias químicas. Sua aplicação pode ser observada em estudos de teratogenicidade, embriotoxicidade, avaliação de efeitos sistêmicos, estudos de vias metabólicas e na avaliação do potencial irritante induzido por ingredientes ou produtos acabados sobre membranas (Luepke, 1985). O fato de Luepke (1985) ter observado uma boa correlação do método HET-CAM com dados obtidos no Teste de irritação ocular de Draize gerou novos trabalhos com o intuito de avaliação da aplicação deste método como um possível substituto aos modelos animais preditivos do potencial irritante de substâncias isoladas e produtos acabados (Silva *et al.*, 1992; Spielmann *et al.*, 1997; Hagino *et al.*, 1999; Wilson & Steck 2000; Murillo *et al.*, 2003; Debbasch *et al.*, 2005; Al *et al.*, 2005; Mehling *et al.*, 2006)

Testes *in vitro* apresentam vantagens significativas como *e.g.* a redução de custos, a possibilidade de realização de repetições ou análises simultâneas dentro de um período curto de tempo, a produção de menores volumes de resíduos tóxicos etc. O teste HET-CAM - em particular – apresenta as seguintes vantagens:

1. É econômico;
2. Não requer equipamentos especializados;
3. Sua implantação é simples (não requer grande espaço físico);
4. Apenas um técnico treinado é suficiente para realização do teste;
5. A duração média do teste é de 1 hora (o teste de irritação da mucosa oral tem duração de 24 horas, porém só é concluído após a análise microscópica, podendo totalizar dias);
6. Enquanto pelo menos 5 hamsters são necessários por amostra para a realização do teste *in vivo*, apenas 4 ovos são utilizados por amostra no teste *in vitro*.

Apesar das vantagens descritas acima, as limitações dos ensaios *in vitro* são bem conhecidas da comunidade científica e em muitos casos dificultam sua validação (Quadro 4). Nestes modelos não há, por exemplo, a possibilidade de se avaliar as características morfológicas e fisiológicas observadas nos métodos *in vivo*, além de serem - via de regra - estudos de curta duração, apresentando limitações quanto à avaliação de efeitos tóxicos a longo prazo.

Quadro 4: Perspectiva de validação de métodos alternativos para avaliação de segurança de produtos cosméticos.

★	★
Toxicidade aguda (por via oral)	Toxicidade aguda (por via inalatória e dérmica)
Irritação cutânea	Toxicidade de doses repetidas (28 dias, 90 dias e exposição crônica)
Irritação ocular	Fotosensibilização
Dermo-sensibilização	Toxicidade Reprodutiva
Embriotoxicidade	Detecção de órgãos-alvo
Genotoxicidade	Toxicidade sistêmica
	Carcinogenicidade (compostos não-genotóxicos)
	Toxicocinética

Fonte: Pauwels *et al.*, 2004

Embora se observe um crescente número de publicações sobre métodos alternativos nos últimos anos, nenhum dos modelos *in vitro* já propostos foi capaz de substituir completamente os testes de irritação ocular, dérmica e de mucosas. Dentre os fatores que dificultam a validação de tais métodos alternativos, destacam-se (Curren & Harbell, 1998).

1. A complexidade de algumas estruturas teciduais (*e.g.* mucosa oral, estruturas oculares etc);
2. Altos custos relacionados aos processos de validação (segundo Liebsch & Spielmann, 2002, o processo de validação de 03 ensaios alternativos ao uso de animais para avaliação de efeitos embriotóxicos de xenobióticos custou cerca de US\$ 1,6 milhões);
3. Diferenças entre espécies, *e.g.* entre o próprio modelo animal que se deseja substituir (*e.g.* Teste de Draize) e a situação de exposição humana;

Mesmo sabendo-se que a correlação entre dados gerados em animais e a situação real no homem não é plena - existindo diferenças importantes entre espécies, como por exemplo, no metabolismo de xenobióticos, na predisposição genética etc - o uso de determinadas espécies animais é consagrado (*e.g.* camundongos e ratos) e muitas vezes controles históricos para determinados desfechos (*e.g.* estudos de carcinogenicidade e teratogenicidade) estão disponíveis nos laboratórios especializados neste tipo de estudo. O volume de dados existentes nestes casos é um enorme facilitador do processo de interpretação de resultados e da extrapolação destes dados para o homem.

Apesar de ainda não ser uma metodologia oficialmente validada, o método HET-CAM é um modelo alternativo comumente utilizado pelas grandes indústrias de cosméticos (Quadro 5) e é aceito pelas autoridades regulatórias de alguns países membros da Comunidade Econômica Européia, como *e.g.* França e Alemanha, como modelo para avaliação de segurança desta classe de produtos (Liebsch & Spielmann, 2002). A Directiva 86/906/EEC prevê a utilização de 04 metodologias alternativas ao uso de animais para avaliação do potencial irritante ocular de ingredientes isolados, suas classificações e indicações de rótulo. As 04 metodologias previstas na Directiva 86/906/EEC são: o HET-CAM, o BCOP e outros dois testes realizados em olhos isolados de coelhos e galinhas. Os animais, cujos olhos são isolados, devem ser provenientes de abatedouros ou sacrificados por outros propósitos. Segunda esta Directiva, nos casos em que os ingredientes testados apresentam resultados negativos em qualquer uma das 04 metodologias, tais resultados devem ser - ainda assim - confirmados pelo teste de irritação ocular de Draize.

Quadro 5: Exemplos de métodos alternativos válidos para avaliação da toxicidade de produtos acabados, comumente usados pela indústria de cosméticos.

Desfecho	Métodos
Irritação ocular	HET-CAM, BCOP, RBC, testes de citotoxicidade.
Irritação dérmica	Modelos com pele isolada, testes de citotoxicidade, teste com orelha de porco, SIFT

Fonte: Pauwels *et al.*, 2004; SIFT: *skin integrity function test*

V.4 Concordância de resultados entre o método HET-CAM e o teste de irritação da mucosa oral em hamsters

Em nosso estudo, a avaliação macroscópica das alterações causadas pelos produtos 24 horas após a última aplicação demonstrou que os produtos não irritante e minimamente irritante induziram apenas reação congestiva dos vasos da mucosa da bolsa gútural. Já os produtos que tiveram a classificação final como irritantes leves (IL), moderados (IM) e severos (IS) causaram congestão, sialorréia e descamação epitelial. A análise dos fenômenos microscópicos apontaram - igualmente - para uma maior similaridade na natureza e severidade dos efeitos induzidos por produtos minimamente irritante com produtos não irritantes, do que com os demais grupos (IL, IM e IS).

Além disso, deve-se considerar que na maioria dos testes preditivos, as condições de exposição dos animais são maximizadas se comparadas com a situação real de exposição do homem. Esta situação - observada nos testes de dermosensibilização (Teste de Buehler, Teste de Maximização) e nos testes de irritação ocular e dérmica de Draize - é igualmente observado no teste de irritação da mucosa oral em hamsters (*i.e.* 04 aplicações do produto em intervalos de 1 hora entre cada aplicação e a não retirada/lavagem imediata do produto). Tal fato aliado à interpretação de nossos dados (similaridade da natureza dos efeitos dos grupos NI e IMin) permite concluir que os efeitos induzidos em hamsters por produtos IMin devem ser considerados de menor relevância em termos de avaliação do risco humano.

No presente estudo optamos por avaliar a predictibilidade do ensaio HET-CAM para produtos com “baixo potencial irritante” (ponto de corte de $I_i \leq 4,99$, para ambos os ensaios). Considerando este ponto de corte, observamos que a precisão do teste HET-CAM foi de 85%, a sensibilidade de 100%, e a especificidade foi de 50%.

Estes resultados demonstram a boa capacidade do HET-CAM em detectar produtos irritantes *in vivo*. Confirmou-se, porém, em nosso estudo sua tendência em superestimar os resultados obtidos *in vivo*, já que este método foi capaz de detectar somente 03 dos 06 produtos classificados como produtos com baixo potencial irritante (*i.e.* 03 resultado falso-positivos). Dados semelhantes foram obtidos por Hagino *et al.*, 1999, quando estes autores avaliaram a correlação existente entre o HET-CAM e o teste de irritação ocular de Draize.

Um dos aspectos que pode se responsável pela maior sensibilidade do método HET-CAM, quando comparado ao modelo animal, é o fato de que neste método aplica-se o produto diretamente na membrana corion-alantóide, sem que haja nenhuma barreira protetora neste tipo de exposição. Assim, como a especificidade do método HET-ACM se mostrou de 50%, recomendamos que os produtos testados neste método sejam submetidos a outros ensaios *in vitro* (*e.g.* citotoxicidade, RBC, olho isolado etc), que avaliam diferentes desfechos para confirmação da classificação irritante. Nesse contexto, alguns dos dentifrícios aqui estudados já encontram-se em análise em nosso laboratório na avaliação de seu potencial tóxico pelos métodos RBC e citotoxicidade com células SIRC e 3T3 pelos métodos NRU e MTT.

Mesmo que não se possa - com o atual nível de conhecimento - substituir totalmente o uso dos animais por um único método *in vitro*, a criação de uma bateria de testes pode significar uma redução substancial no número total de animais usados na avaliação de segurança de certos produtos. Tal conduta, além de reduzir bastante o número de produtos que deverão ser testados em animais, minimiza grandemente as chances de expor animais a produtos com alto potencial tóxico. A possibilidade de se usar animais somente para confirmar a ausência de efeito irritante, significa diminuir as chances de expor os mesmos ao sofrimento e a dor.

VI. CONCLUSÃO

A análise dos resultados obtidos neste estudo nos permite concluir que:

1. Quanto aos resultados obtidos após tratamento das bolsas guturais de hamsters (teste *in vivo*):
 - Todos os produtos da linha adulta – apreendidos por Secretarias Estaduais e/ou Municipais de Saúde por suspeita de desvio da qualidade - foram considerados irritantes no teste de irritação da mucosa oral em hamsters, confirmando as denúncias quanto ao potencial irritante dos produtos de uso adultos aqui avaliados.
 - Dentre os produtos infantis, 60% foram considerados como não-irritantes ou minimamente irritantes no teste *in vivo*, os demais foram classificados como irritantes leves.
 - Com exceção de um produto da linha adulta, todos os dentifrícios aqui estudados apresentaram valores de pH dentro da faixa de segurança recomendada pela norma internacional ISO11.609.
 - A avaliação macroscópica das alterações causadas pelos produtos 24 horas após a última aplicação demonstrou que os produtos não irritante (NI) e minimamente irritante (IMin) induziram apenas reação congestiva dos vasos da mucosa da bolsa gutural. Já os produtos que tiveram a classificação final como irritantes leves (IL), moderados (IM) e severos (IS) causaram congestão, sialorréia e descamação epitelial. A análise da natureza e do grau de severidade dos efeitos microscópicos aponta - igualmente - para uma grande similaridade entre os grupos NI e IMin. Com base nessa observação e pelo fato de que - se comparada com a situação real de exposição humana - as condições de exposição em hamsters são maximizadas (4 aplicações em intervalos de 1 hora entre cada aplicação e a não retirada/lavagem imediata do produto), entendemos que os efeitos induzidos em hamsters por produtos

IMin devem ser considerados de menor relevância em termos de avaliação do risco humano;

2. Quanto aos resultados obtidos no método HET-CAM:

- Apesar dos desfechos qualitativos do método HET-CAM (graduação dos fenômenos em função do tempo) serem considerados por alguns autores um fator limitante deste método, nossos resultados demonstraram que a subjetividade das leituras pode ser contornada com treinamento adequado de pessoal especializado.
- No caso específico de produtos de higiene bucal, pode-se dizer que a natureza dos cremes e géis dentais (*i.e.* viscosidade, coloração e opacidade) é um fator dificultante das leituras dos fenômenos induzidos na membrana córion-alantóide. Esta dificuldade pôde ser contornada quando os produtos foram testados diluídos.
- Os resultados obtidos *in vitro* se correlacionaram melhor como os achados microscópicos (alterações de epitélio, infiltrado inflamatório, congestão e edema) obtidos no modelo animal, quando os produtos foram testados a 10% no HET-CAM do que quando foram testados puros.
- Quanto ao grau de preditibilidade do método HET-CAM em relação ao teste de irritação da mucosa oral em hamsters os seguintes resultados foram obtidos: precisão = 85%, sensibilidade = 100% e especificidade = 50%.
- O método HET-CAM tende a superestimar resultados obtidos *in vivo*, indicando que resultados positivos neste teste devem ser cuidadosamente analisados. Como a especificidade do teste foi de 50%, recomenda-se, que os produtos considerados positivos no HET-CAM sejam submetidos a outros ensaios *in vitro* (*e.g.* citotoxicidade, RBC e etc) para confirmação da classificação irritante.

- O uso do método HET-CAM - em combinação com uma bateria de ensaios alternativos - pode reduzir significativamente o número de animais utilizados na avaliação do potencial tóxico de dentifrícios e outros produtos de higiene bucal.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al, R.H., Dahl J.E., Morisbak, E., Polyzois, J. Irritation and cytotoxic potential of denture adhesives. *Gerodontology* 2005; 22: 177-183.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos. Brasília: ANVISA; 2003.

Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (ABIHPEC): Disponível em <http://www.abihpec.org.br/index.php>. Acesso em março de 2007.

Balls, M. & Fentem, J. Progress towards the validation of alternative tests. *Alternatives to Laboratory Animals* 1997; 21(1):33-43.

Balls, M. & Karcher, W. The validation of alternative methods. *ATLA* 1995; 23:884-886

Balls, M., Zeller AM., Halder M. Progress in reduction, refinement and replacement of animal experimentation. *Proceedings of 3th World Congress on alternative and Animal Use in the life Sciences*; 2000; Netherlands: Elsevier; 2000.

Biosaúde. Afta – Tudo o que você precisa saber sobre esta doença. Disponível em <http://www.biosaude.com.br>. Acesso em Março de 2007.

Blein, O. & Dossou, K.G. Correlation and validation of alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicology in vitro* 1991; 5: 555-557.

Brasil - Câmara Federal. Projeto de lei no 1.153/95. Regulamenta o inciso VII, do parágrafo 1º do artigo 225, da Constituição Federal, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e dá outras providências. *Diário Oficial de Republica Federativa do Brasil, Brasília, DF, 1995*

Brasil - Câmara Federal. Projeto de lei no 3.964/97 Estabelece Normas e defini as responsabilidades administrativa, penal e civil para a criação e uso científico de animais. Diário Oficial de Republica Federativa do Brasil, Brasília, DF, 1997

Brasil - Câmara Federal. Relatório do Deputado Federal Fernando Gabeira, de 25 de junho de 2003, na Comissão de Defesa do Consumidor, Meio Ambiente e Minorias, acerca dos Projetos no 1.153 e no 3.964, e seu Substitutivo.

Brasil, Câmara Municipal do Rio de Janeiro. Projeto de Lei no 325/2005 de autoria do vereador Cláudio Cavalcante. Proíbe a vivissecção assim como o uso de animais em práticas experimentais que provoquem sofrimento físico ou psicológico sendo estas com finalidade pedagógicas, industriais, comerciais ou de pesquisa científica, e dá outras providências. 2005.

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 os medicamentos, insumos farmacêuticos, drogas, correlatos, cosméticos, produtos de higiene, saneantes e outros. Diário Oficial de Republica Federativa do Brasil, Brasília, DF , 1977.

Brasil - Decreto-Lei nº 24.645, de 10 de julho de 1934. Estabelece Medidas de Proteção aos Animais. Diário Oficial, Suplemento 162, de 14 de julho de 1934

Brasil - Lei nº 6.638, de 08 de maio de 1979. Normas para a Prática Didático-Científica da Vivissecção de Animais. Diário Oficial de Republica Federativa do Brasil, Brasília, DF, 1979.

Brasil - Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998. Dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, e dá outras providências. Diário Oficial de Republica Federativa do Brasil, Brasília, DF, 1998

Brasil - Município do Rio de Janeiro. Decreto nº 19.432, de 1 de janeiro de 2001. Proíbi a prática de vivissecção e de experiências com animais em instituições veterinárias públicas municipais, igualmente, quando existe tecnologia alternativa à experimentação. Rio de Janeiro, RJ, 2001.

Brasil - Resolução n.º 192, de 4 de fevereiro de 2003
Determina a suspensão de comércio e uso, em todo território nacional do produto creme dental com flúor KI-PASTA, 90g, lotes n.ºs. B247, B248, B249, B250, B253, B254 e B255. Diário Oficial de República Federativa do Brasil de 06/02/2003, Brasília, DF 2003.

Brasil - Resolução n.º61 de 14 de junho de 2003. Determina a suspensão em todo o território nacional do produto creme dental com flúor Ki-Pasta, 30g, lotes n.ºs B250Ae B254A. Diário Oficial de República Federativa do Brasil de 15/01/2003, Brasília, DF, 2003.

Brasil - Resolução n.º211 de 14 de junho de 2005. Ficam estabelecidos a Definição e a Classificação de produtos de higiene Pessoal, Cosméticos e perfumes, conforme Anexos I e II desta Resolução. Diário Oficial de República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2005.

Brasil - Resolução n.º215 de 25 de julho de 2005. Diário Oficial de República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2005.

Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Princípios Éticos na Experimentação Animal : Disponível em <http://www.cobea.org.br/etica.htm#3>. Acesso em março de 2007.

Corbett JF, Sharma RK and Dressler WE. Cosmetic Toxicology . IN: Toxicology. Hans Marquardt, Siegfried G Schafer, Roger McClellan and Frank Welsch. 1ed, USA, Academic Press, 1330p, p. 899- 918, 1999.

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

Curren, R.D. & Harbell, J.W. In vitro Alternatives for ocular Irritation. Environmental Health Perspectives 1998; 106(2): 485-492.

De Torres, E.P., Larrauri, A.G., Kuhn, G.R. Ensayos alternativos a la experimentación animal. Animales de Experimentación 1997; 3(2):30-36.

Debbasch, C., Ebenhahn, 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* 2005; 43 155-165

Draize, J.H., Wooddard, G., Calvery, O.H. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membrane. *Journal of Pharmacology and Experimental therapeutics* 1944; 83: 377-399

EEC Collaborative study on the evaluation of alternative methods to the eye irritation test 1991; Doc.XI/632/91-V/E/1/131/91.

Eun, H.C. & Suh, D.H. Comprehensive outlook of in vitro test for assessing skin irritancy as alternatives to Draize Test. *Journal of dermatological Science* 2000; 24: 77-91

Europa Notes of guidance for testing of cosmetic ingredients for their safety evaluation. The rules governing cosmetic products in the European Union. *Cosmetic products* 1999; Guidelines, volume 3. European Commission.

Eveson JW. Animal models of intra-oral chemical carcinogenesis: a review. *Journal of Oral Phathology*. 1981; 10: 129-246

Flores de Jaboby, L., Thor, G., Lange, D.E. Vergleichend klinische und zytotogische Untersuchungen nach Anwendung von zwel Zahnpasten. *Dtsch Zahnärztt*. 1975; Z. 30: 385-388.

Froebe, C.L., Simion, F.A, Rhein, L.D., Cagan, R.H., Kligman, A. Stratum corneum lipid removal by surfactants: relation to in vivo irritation. *Dermatology* 1990; 181: 277-283.

Garnieri, L.J. The effect of dentifricie components on the tissues of humans and guinea pigs. Thesis Indiana University 1970. Bloomington, Ind.

Glohuber, C.H. Toxicological proprieties of surfactants. Archives of Toxicology 1974; 32: 245-270

Götze, W. Untersuchungen zum Einflu von Zahnpasten auf die gingival. Dtsch Zahnärztl 1977. Z 32: 448-449.

Hagino S., Itagaki H., Kato S., Kobayashi, T. and Tanaka, M. Quantitative evaluation to predict the eye irritancy of chemicals: modification of chorioallantoic membrane test by using trypan blue. Toxicology in vitro. 1991; 5: 301-304.

Hagino, S., Kinoshita, S., Tani, N., Nakamura, T., Ono, N., Kojima, H. and Ohano, Y. Interlaboratory validation of in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients. (2) Chorionallantoic Membrane (CAM) test. Toxicology in vitro. 1999; 13:99-113.

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

Herlofson, B.B. & Barkvoll P. Sodium lauryl sulfate and recurrent aphthous ulcers – A preliminary study. Acta Odontol Scand 1994; 52: 257-260.

Holden, C. Cosmetic firms drops Draize Test. Science 1989; 245: 125.

Institute for Laboratory Animal Research (ILAR). Science, medicine and animals. The National Academics Press; 2004.

ISO. International Standardization Organization. Biological Evaluation of Medical Devices. ISO 10993-10, Test for irritation and Sensitization. 1ed, Suíça, 1995.

Jirová, D., Kejlová, K., Brabec, M., Bendova, H., Kolarova, H. The benefits of 3T3 NRU test in the safety assessment of cosmetics: long-term experience from pre-marketing testing in the Czech Republic. Toxicology in Vitro 2003; 17: 791-796

Jones, P.A., King, A.V., Earl, L.K. and Lawrence, R.S. Toxicology in Vitro 2003; 17: 471-480

Jones P.A. and King A.V. High throughput screening (HTS) for phototoxicity hazard using the in vitro 3T3 neutral red uptake assay. *Toxicology in vitro* 2003; 17: 703-708.

Journal Officiel de La Republique Française – Arrêté du 29 Novembre 1996. Relatif aux Méthodes Officielles d'analyse Nécessaires aux Contrôles des Produits Cosmétiques. 26.Décembre, 1996.

Liebsch, Manfred. & Spielmann, H. Currently available in vitro methods used in the regulatory toxicology *Toxicology Letters* 2002; 127: 127-134

Luepke, N.P. Hen's eggs chorioallantoic membrane test for irritation potential. *Food Chemical Toxicology* 1985; 23: 287-291.

Luepke, N.P. & Kemper, FH. The HET-CAM test: An alternative to the Draize Eye Test. *Food Chemical Toxicology*. 1986; 6/7: 287-291.

Marques, R.G., Miranda M.L., Caetano, C.E.R., Biondo-Simões M.L.P. (2005) Rumo à regulamentação da utilização de animais de laboratório no ensino e na pesquisa científica no Brasil. *Acta Cirúrgica Brasileira* 2005; 20 (3).

Manfred, L & Spielmann, H. Currently available in vitro methods used in the regulatory toxicology. *Toxicology Letters* 2002; 127: 127-134.

Mehling, A., Kleber, M and Hensen, H. Comparative studies on the ocular dermal irritation potential of surfactants. *Food and Chemical Toxicology* 2006, doi:10.1016/j.fct.2006.10.024.

Mizushima, J., Kawasaki, Y., Tabohashi, T., Kitano, T., Kawashima, M. Effect of surfactants on human stratum corneum: electron paramagnetic resonance study. *International Journal Pharmaceutics* 2000; 197: 193-202.

Murillo, G., Pérez, M.U., Tur, E., Vinardell, M.P., Gracia, S.G. Pascual, J.R. Estudio comparativo de tres variantes del ensayo de la membrana corioalantoidea del huevo de la gallina para la evaluación de la irritación ocular. *Rev.toxicol.* 2003; 20: 187-192

Nourse, W.L., Tyson, C.A., Bednarz, R.M. Mechanisms of mild ocular irritation. *Toxicology in Vitro*; 9(6): 967-976.

Pauwls, M. & Rogiers, V. Safety evaluation of cosmetic in EU reality and challenges for the toxicologist. *Toxicology Letters* 2004; 151: 7-17.

Presgrave, O.A. Alternativas para animais de laboratório: do animal ao computador. In: Andrade A, Pinto SC, de Oliveira RS, organizadores. *Animais de laboratório – criação e experimentação*. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ; 2002.

Presgrave O.A. & Bhogal N. EMALT: a Brazilian Meeting on Alternative Methods to Animal Use for Regulatory Purposes. *Altern. Lab Anim.* 2005; 33 (6): 670-672.

Renzi, D., Valtolina, M., Forster, R. The evaluation of a multi-endpoint cytotoxicity assay system. *Italian Tissue Culture meeting. Alternative to Laboratory Animals* 1993; 21: 89-96

Riordan, T. *Investing beauty: A history of innovations that have made us beautiful*. Broadway books; 2004.

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

Schendel K.U., Erdinger L., Komposch G., Sonntag H.G. Orthodontic material studies in the HET-CAM test for mucosa-irritating effects. *Fortschr. Kieferorthop.* 1994; 55(1):28-35.

Silva, O., Rougier, A., Dossou, K.G. The HET-CAM test: A study of the irritation potential of chemicals and formulations. 1992; *ATLA* 20: 432-437.

Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX): Disponível em <http://www.fiocruz.br/sinitox/>. Acesso em março de 2007.

Spielmann, H., Liebsch, M., Moldenhauer F. CAM-based Assay. Food and Chemical toxicology. 1997; 35: 39-66.

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

UNIÃO EUROPÉIA, 1986. Directiva 86/906/EEC of European Parliament and of Council Directive 67/548/EEC of 27 June 1967 on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances.

Veys, R.J., Baert, J.H. and DE Boever, J.A. Histological changes in hamsters cheek pouch epithelium induce by topical application of sodium lauryl sulphate. International Journal of Pathology 1994; 75, 203-209.

Vinardell, M.P & Garcia, L. The quantitative Chlorioallantoic membrane test using trypan blue stain to predict the eye irritancy of liquid scintillation cocktails. Toxicology in Vitro 2000; 14: 551-555.

Wilhelmus, K.R. Therapeutic reviews: the Draize Eye Test. Survey of Ophthalmology 2001; 45 Suppl 6: 393-397.

Wilson, T.D., Steck F. A modified HET-CAM assay approach to the assessment of anti-irritant properties of plants extracts. Food and Chemical toxicology 2000; 38 867-872.

Wolf, R., Wolf, D., Tüzün, B., Tüzün, Y. Soaps, Shampoos and detergents. Clinics in Dermatology 2001; 19: 393-397.

Worth, A. P & Balls, M. (2001) The importance of the prediction model in the validation of alternative test. *Alternative Laboratory Animal* 29: 135-143

Worth, A. P. & Cronin, M. T. D. (2001) Prediction models for eye irritation potential based on endpoints of HET-CAM and Neutral Red Uptake test. *In Vitro & Molecular Toxicology* 14, 143-156.