

# POTENCIAL TÓXICO DE DENTIFRÍCIOS: AVALIAÇÃO COMPARATIVA ENTRE O TESTE DE IRRITAÇÃO DA MUCOSA ORAL EM HAMSTERS E O MÉTODO HET-CAM

## TOXIC POTENTIAL OF DENTIFRICES: COMPARATIVE EVALUATION BETWEEN ORAL MUCOSAL HAMSTER IRRITATION TEST AND HET-CAM

### RESUMO

Certos ensaios toxicológicos utilizados no controle de qualidade de produtos têm sido questionados por grupos defensores do bem estar animal por levarem ao sacrifício e ao sofrimento de um número significativo de animais. Além de implicações éticas, a busca por métodos alternativos é uma questão de grande relevância para os laboratórios oficiais de controle da qualidade. Neste contexto, o método HET-CAM (*Hens Egg Test-Chorion Allantoic Membrane*) vem sendo estudado como modelo alternativo ao teste de irritação ocular em coelhos. No entanto, estudos que busquem avaliar a relação entre os efeitos irritantes induzidos *in vivo* em outras mucosas, como por exemplo a mucosa oral, e o HET-CAM são ainda escassos. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial preditivo do modelo HET-CAM em relação ao teste de irritação de mucosa oral em hamsters preconizado pela norma ISO 10.993 – Parte 10. Foram analisados dentifrícios de uso adulto, apreendidos por Secretarias Estaduais 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. Os produtos testados no modelo HET-CAM foram analisados a 10% e 100%. Nossos dados demonstraram que quando testados diluídos a 10%, os produtos apresentaram resultados mais próximos àqueles obtidos no teste *in vivo*. Nestas condições experimentais, o modelo HET-CAM apresentou precisão de 85%, sensibilidade de 100% e especificidade de 50% em relação ao ensaio *in vivo*. A tendência do HET-CAM em superestimar resultados quando comparado ao modelo animal foi confirmada.

**Palavras-chave:** Irritação. Dentifrícios. Toxicidade *in vitro*. Controle da Qualidade. Métodos Alternativos. Vigilância Sanitária.

### ABSTRACT

Animal welfare groups criticize some toxicological assays, applied in the quality control of products because of the suffering of a considerable 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 HET-CAM method (*Hens Egg Test-Chorion Allantonic Membrane*) is under study as an alternative for the Draize eye irritation test, which is normally performed in rabbits. However, studies that seek to evaluate the relationship between the effects induced *in vivo* in other mucous membranes - such as oral mucosa - and the HET-CAM are scarce. In this logic, the present study aimed to evaluate the predictive potential of the HET-CAM model in relation to the oral mucosa irritation test performed in hamsters,

Márcia da Conceição Corrado<sup>1</sup>,  
Eloísa Nunes Alves<sup>1</sup>,  
Octavio Augusto França  
Presgrave<sup>1</sup>,  
Rosaura de Farias Presgrave<sup>1</sup>,  
Rodrigo Netto Costa<sup>2</sup> e  
Isabella Fernandes Delgado<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Farmacologia e  
Toxicologia

<sup>2</sup>Departamento de Imunologia

<sup>3</sup>Vice Diretoria de Ensino,  
Pesquisa e Projetos Estratégicos  
do Instituto Nacional de Controle  
de Qualidade em Saúde,  
FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil.

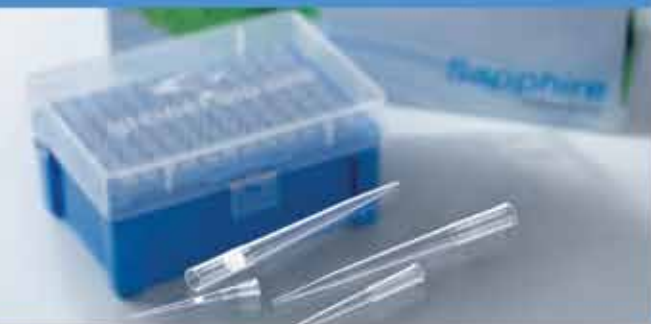
\*Correspondência  
E-mail: isabella.delgado@incqs.  
fiocruz.br



## Baixa Retenção e Máxima Precisão

### Nova Linha de Ponteiros Sapphire da Greiner Bio-One

A nova geração de Ponteiros Sapphire tem como principais vantagens extraordinária precisão e mínima retenção. Encaixam-se perfeitamente em qualquer pipetador, combinando fácil instalação e remoção, com enchimento preciso e rápido. Extremamente finas, permitem um excelente controle visual durante o processo de pipetagem.



- ◀ Ponteiros com e sem filtro
- ◀ Fabricadas em polipropileno de alta qualidade
- ◀ Com tratamento: livre de DNase, RNase e traços de DNA humano; sem pirogênio
- ◀ Vedação e ajuste ideais
- ◀ Disponíveis em rack e refil
- ◀ Volumes de 10µl, 20µl, 300µl e 1,250µl

as established by ISO 10.993 - Part 10. Adult's dentifrices, apprehended by the Secretary of Health from Rio de Janeiro, as well as infant's dentifrices, commercially purchased in the municipality of Rio de Janeiro, were analysed, comparing the results obtained *in vivo* with those obtained in the HET-CAM assay. The products were tested *in vitro* pure (100%) and diluted at 10%. Our data showed that when test products were diluted at 10%, the results correlate better to those obtained in the *in vivo* test. At these experimental conditions, the HET-CAM model has achieved an accuracy of 85%, a sensitivity of 100% and a specificity of 50% in relation to the *in vivo* model. The tendency of the HET-CAM to overestimate results in comparison to the animal model was confirmed.

**Keywords:** Irritation. Dentifrices. *in vitro* Toxicity. Quality Control. Alternative Methods. Sanitary Surveillance.

## INTRODUÇÃO

O ovo embrionado de galinha foi inicialmente utilizado no meio científico como teste toxicológico para obtenção de informações sobre embriotoxicidade, teratogenicidade e toxicidade sistêmica (LUEPKE; KEMPER, 1986). A partir de então foi desenvolvido o método HET-CAM (do inglês, *Hens Egg Test - Chorion Allantoide Membrane*), que passou a ser também empregado como método alternativo ao teste de irritação ocular em coelhos (WORTH; BALLS, 2001; WORTH; CRONIN, 2001). Neste contexto, podemos destacar um número considerável de investigações (HAGINO *et al* 1999; NOBREGA *et al* 2012; SCHEEL *et al* 2011; STEILING *et al* 1999; VINARDELL; MITJANS, 2006). No entanto, estudos que busquem avaliar a relação entre os efeitos induzidos *in vivo* em outras mucosas, como por exemplo, a mucosa oral e o método HET-CAM são escassos e se justificam, sobretudo, devido à absoluta ausência de metodologias *in vitro* para avaliação deste tipo de desfecho toxicológico.

O teste de irritação da mucosa oral, descrito na norma ISO 10.993 – Parte 10 referente à avaliação da segurança de produtos para saúde (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2010a) consiste na aplicação do produto em questão na bolsa gútural de hamsters e posterior análise macroscópica e anatomo-histológica do epitélio estratificado desta mucosa. Em contraste com os testes de irritação dérmica e irritação ocular de Draize (DRAIZE; WOODDARD; CALVERY, 1944), o teste de irritação da mucosa oral em hamsters é pouco reportado na literatura científica. No entanto, sob o ponto de vista da avaliação do risco à saúde humana, é de grande relevância a avaliação de segurança de artigos de higiene dental e bucal, tanto devido à significativa frequência de uso desta classe de produtos por parte da população em geral, quanto pelos relatos de desvio da qualidade de dentifícios no cenário nacional; desvios estes que levaram a denúncias de agravos à saúde como queimaduras, edema e demais processos inflamatórios na mucosa oral de consumidores, culminando na suspensão de uso e comercialização de alguns produtos em todo território nacional (BRASIL, 2003a, 2003b).

Neste contexto, o presente estudo pretende contribuir para uma maior compreensão da aplicabilidade do método HET-CAM como um modelo alternativo ao teste da mucosa oral em hamsters na avaliação do potencial irritante de artigos de higiene bucal.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foram analisadas 20 amostras de dentifícios de uso adulto e infantil (Tabela 1).

Os produtos da linha adulta foram apreendidos por Secretarias Estaduais ou Municipais de Saúde e ingressaram no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (IN-CQS) a partir de denúncias de agravos à saúde bucal de seus consumidores. Já os produtos da linha infantil foram adquiridos comercialmente no município do Rio de Janeiro.

### Teste da irritação da mucosa oral em hamster

O teste foi realizado conforme preconizado pela ISO 10.993 – Parte 10 (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2010a) e aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) da Fiocruz. Foram utilizados hamsters provenientes do Centro de Criação de Animais de Laboratório - Cecal/Fiocruz (N=5/produto). O produto (0,5 mL) foi aplicado na bolsa gútural direita de cada animal por quatro vezes, com intervalo de 1 hora entre 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 CO<sub>2</sub> 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.

**Tabela 1.** Composição dos dentífricos

Amostra	Fabricante	Composição
DT01	F1	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, sorbitol, monofluorofosfato de sódio
DT02	F1	Idem DT01
DT03	F1	Idem DT01
DT04	F1	Idem DT01
DT05	F1	Idem DT01
DT06	F2	1500ppm de flúor; bicarbonato de sódio, glicerina, sorbitol, carbonato de cálcio, lauril sulfato de sódio, carboximetilcelulose, composição aromática, água, monofluorofosfato de sódio
DT07	F3	1200 ppm de flúor, sorbitol, carboximetilcelulose, carbonato de cálcio, lauril sulfato de sódio, sacarina sódica, composição aromática, formaldeído, água, monofluorofosfato de Sódio
DT08	F3	Idem DT07
DT09	F1	Idem DT01
DT10	F1	Idem DT01
DT11	F4	1100 ppm de flúor, sorbitol, água, sílica, polietilenoglicol 600, carboximetilcelulose, lauril sulfato de sódio, composição aromática, sacarina sódica, fluoreto de sódio, corantes: CI 77891, CI 77019, CI 42090, CI 47005
DT12	F4	500ppm de flúor, sorbitol, água, sílica, polietilenoglicol, carboximetilcelulose, lauril sulfato de sódio, composição aromática, sacarina sódica, CI42090, fluoreto de sódio
DT13	F5	1100 ppm 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, monofluorofosfato de sódio
DT14	F4	1100 ppm de flúor, sorbitol, sílica, lauril sulfato de sódio, polietilenoglicol, carboximetilcelulose, sacarina sódica, composição aromática, fluoreto de sódio, corantes: CI 42090, CI 77019, CI 77891
DT15	F6	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)
DT16	F3	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
DT17	F7	1000 ppm 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, água, monofluorofosfato de sódio
DT18	F8	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)
DT19	F3	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
DT20	F3	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

DT01 a DT10: Cremes dentais de uso adulto.

DT11 a DT20: géis dentais de uso infantil.

## 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 ISO 10.993-Parte 10 (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2010a). Os escores encontrados na avaliação microscópica de todos os animais foram 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) foi obtido subtraindo a média dos escores dos animais tratados pela média dos escores dos controles [Ii = (Média dos animais tratados) – (Média do controle)]. O teste da irritação da mucosa oral em hamster permite as seguintes classificações: não irritante (NI = 0,0 a 0,99), irritante mínimo (IMin = 1,0 a 4,99), irritante leve (IL = 5,0 a 8,99), irritante moderado (IM = 9,0 a 11,99) ou irritante severo (12,0 a 16,0).

## Método HET-CAM

A metodologia utilizada está descrita no *Journal Officiel de la Republique Française* (FRANCE, 1996) relativa ao método oficial de avaliação do potencial irritante por aplicação sobre a membrana corion-alantoide (MCA) do ovo embrionado de galinha, tendo como princípio a observação dos efeitos irritantes (hiperemia, hemorragia, coagulação/opacidade) induzidos por substâncias químicas ou produtos acabados quando em contato com a MCA no décimo dia de incubação.

Foram utilizados, para cada produto, quatro ovos SPF (do inglês, *Specific Pathogen Free*) fertilizados de galinha da raça Leghorn, provenientes da Granja Resende S/A (Uberlândia – MG), pesando entre 50 e 60 gramas. Os ovos foram pesados, identificados e incubados por 10 dias a temperatura de 37 ± 0,5°C e umidade relativa de aproximadamente



70%. No 10º dia de incubação, retirou-se a casca de cada ovo. A membrana da casca foi umidificada com solução salina a 0,9% a 37°C e a membrana da casca foi removida expondo a MCA. Aplicou-se 0,3 mL do produto, mantido a 37°C sobre a MCA e após 20 segundos de contato, retirou-se o produto com 5 mL de solução salina a 37°C. Todos os produtos foram testados puros e a 10%. A MCA foi então examinada e graduada para os efeitos irritantes observados no período de 5 minutos, conforme escala de Luepke (LUEPKE; KEMPER, 1986). O método HET-CAM permite as seguintes classificações: não irritante (NI = 0,0 a 0,99), irritante leve (IL = 1,0 a 4,99), irritante moderado (IM = 5,0 a 8,99) ou irritante severo (IS = 9,0 a 21,0).

### Análise estatística

A partir da elaboração de uma tabela de contingência, foram obtidos dados sobre o potencial preditivo do ensaio HET-CAM em relação ao ensaio *in vivo*, tais como: *i.* sensibilidade (capacidade do método *in vitro* detectar produtos irritantes), *ii.* especificidade (capacidade do método *in vitro* detectar produtos não irritantes) e *iii.* precisão (capacidade do método *in vitro* fornecer os mesmos resultados que o teste *in vivo*), observando-se ainda a frequência de concordância e discordância de resultados entre os dois ensaios em questão.

## RESULTADOS

### Teste da irritação da mucosa oral em hamster

Todos os dez produtos da linha adulta (DT01 e DT10) foram considerados irritantes no teste *in vivo* (Tabela 2). Para esta classe de produtos o índice de irritação (Ii) variou entre 6,50 a 14,25. É importante ressaltar que neste estudo, não há produtos de um mesmo lote e que todos os produtos de uso adulto foram apreendidos em localidades e ocasiões diferentes. Sete dentifrícios de uso adulto foram produzidos pelo mesmo fabricante (F1) e apresentam formulações idênticas, conforme mostra a Tabela 1. Apesar de conterem a mesma formulação, os valores de pH e o grau de severidade das reações induzidas em hamsters variaram significativamente entre os diferentes lotes avaliados. Os cremes dentais da linha adulta apresentaram pH entre 8,80 e 10,80. O pH é uma característica importante dos dentifrícios e, de acordo com a norma internacional ISO 11.609 (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2010b), deve estar dentro de uma faixa considerada de segurança, compreendida entre 4,50 e 10,50.

Ao contrário do que foi observado para produtos de uso adulto, nenhum produto da linha infantil (DT11 a DT20) apresentou valor de índice de irritação (Ii) maior que 8,00, tendo apresentado ainda faixa de pH entre 5,25 e 8,09.

### Grau de preditibilidade do método HET-CAM em relação ao teste da irritação da mucosa oral em hamsters

Considerando a baixa incidência de produtos não irritantes *in vivo* neste estudo (N=2), optamos por não avaliar a preditibilidade do ensaio HET-CAM para produtos “não irritantes”, e sim para produtos com “baixo potencial irritante”. Agrupamos, assim, todos os produtos não irritantes ( $I_i \leq 0,99$ ) e irritantes mínimos ( $I_i = 1,0$  a 4,99) em um novo grupo denominado baixo potencial irritante (BPI), estipulando novo ponto de corte de  $I_i \leq 4,99$ . Desta maneira, consideramos 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 puros e diluídos a 10% no HET-CAM (Tabela 3). Calculou-se, assim a sensibilidade, a especificidade e a precisão do método HET-CAM com relação aos resultados obtidos no modelo animal, como pode ser observado na Tabela 4. Com isso, observamos que os produtos testados diluídos a 10% apresentaram classificações mais próximas àquelas obtidas no teste *in vivo* do que quando testados puros. A precisão do método HET-CAM foi de 85%, a sensibilidade de 100%, e a especificidade de 50%, quando o produto foi testado diluído a 10%. Estes valores caem para 70% (precisão) e 0% (especificidade), mantendo 100% de sensibilidade, quando tais produtos foram testados a 100%. 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-alantoide. Esta dificuldade foi contornada com todos os produtos quando estes foram diluídos a 10%.

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 ( $I_i = 2,25, 1,50$  e 2,50, respectivamente), porém na membrana córion-alantoide estes mesmos produtos induziram efeitos que levaram a  $I_i > 4,99$ , tendo sido, portanto, considerados falso-positivos. Deve-se, no entanto, considerar que dentre os produtos classificados como BPI *in vivo*, estes foram exatamente os três que apresentaram os maiores valores de índice de irritação (Tabela 2).

## DISCUSSÃO

A avaliação macroscópica no ensaio *in vivo* das alterações causadas pelos produtos 24 horas após a última aplicação demonstrou que os produtos que apresentaram  $I_i \leq 4,99$  induziram apenas reação congestiva dos vasos da mucosa da bolsa gutural. Já os produtos que apresentaram  $I_i > 4,99$  causaram congestão, sialorreia e descamação epitelial. A análise

Excelente durabilidade  
e reprodutibilidade,  
menores custos  
e maior rendimento.



**Colunas UHPLC e HPLC,  
semi-preparativas e preparativas.  
Fase estacionária em Bulk.**

Mais de 30 diferentes fases  
estacionárias – 20 diferentes fases reversas

Troca iônica (IEX) para análises de peptídeos,  
proteínas, oligonucleotídeos, DNA e mAb

Exclusão por tamanho (SEC)

Fluído Supercrítico (SFC)



DISTRIBUIÇÃO

**TediaBrasil**

[www.tediabrazil.com.br](http://www.tediabrazil.com.br)

**YMC**  
**AMERICA, INC.**

[www.ymcamerica.com](http://www.ymcamerica.com)

**Tabela 2.** Resultados do teste da irritação da mucosa oral em hamsters e do método HET-CAM

Cód.	pH		<i>in vivo</i>			<i>in vitro</i>		
			li	Classif.	li (10%)	Classif.	li (100%)	Classifi.
DT01	10,80	A D U L T O	14,25	Irritante	7,58	Irritante	15,50	Irritante
DT02	9,70		11,75	Irritante	8,00	Irritante	10,40	Irritante
DT03	9,90		12,75	Irritante	7,87	Irritante	13,00	Irritante
DT04	9,10		9,00	Irritante	7,93	Irritante	11,25	Irritante
DT05	8,90		9,25	Irritante	8,00	Irritante	10,50	Irritante
DT06	9,30		8,00	Irritante	8,50	Irritante	13,25	Irritante
DT07	9,86		10,25	Irritante	7,58	Irritante	12,00	Irritante
DT08	9,75		6,50	Irritante	6,75	Irritante	9,50	Irritante
DT09	8,80		12,50	Irritante	8,00	Irritante	10,00	Irritante
DT10	8,90		7,00	Irritante	8,00	Irritante	8,50	Irritante
DT11	6,72	I N F A N T I L	0,25	<b>BPI</b>	2,17	<b>BPI</b>	9,00	Irritante
DT12	6,97		1,25	<b>BPI</b>	3,48	<b>BPI</b>	8,75	Irritante
DT13	8,09		8,00	Irritante	8,00	Irritante	10,00	Irritante
DT14	6,90		2,25	<b>BPI</b>	8,00	Irritante	11,25	Irritante
DT15	5,25		1,50	<b>BPI</b>	7,75	Irritante	10,50	Irritante
DT16	7,05		6,00	Irritante	8,00	Irritante	15,00	Irritante
DT17	7,97		8,00	Irritante	7,08	Irritante	11,00	Irritante
DT18	6,23		0,50	<b>BPI</b>	3,42	<b>BPI</b>	11,25	Irritante
DT19	6,52		7,75	Irritante	8,17	Irritante	8,25	Irritante
DT20	6,68		2,50	<b>BPI</b>	8,00	Irritante	9,50	Irritante

li\*: Índice de Irritação. *Ponto de corte*: BPI = li ≤ 4,99

**Tabela 3.** Tabela de contingência

Classificação <i>in vitro</i>		Classificação <i>in vivo</i>	
		BPI*	Irritante
Produtos a 10%	BPI*	3	0
	Irritante	3	14
Produtos a 100%	BPI*	0	0
	Irritante	6	14

\* BPI: Baixo Potencial Irritante, *i.e.* produtos que apresentaram li ≤ 4,99 (NI e IMin).

**Tabela 4.** Potencial preditivo do método HET-CAM em relação ao teste da membrana oral em hamsters

	HET-CAM	
	Produtos a 10%	Produtos a 100%
<b>Sensibilidade</b>	100%	100%
<b>Especificidade</b>	50%	0%
<b>Precisão</b>	85%	70%
<b>Falso Negativos</b>	0	0
<b>Falso Positivos</b>	3 (15%)	6 (30%)

dos fenômenos microscópicos apontou - igualmente - para uma maior similaridade na natureza e severidade dos efeitos induzidos por produtos minimamente irritantes com os não irritantes, do que com os demais grupos irritantes (IL, IM, 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 (como *e.g.* no Teste de Buehler e Teste de Maximização) e nos testes de irritação ocular e dérmica de Draize - é igualmente observada no teste de irritação da mucosa oral em hamsters (*i.e.* quatro 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) nos permite concluir que os efeitos induzidos em hamsters por produtos com li entre 0,99 e 4,99 (Imim) devem ser considerados de menor relevância em termos de avaliação do risco humano.

Quando comparamos os resultados dos ensaios do presente estudo (ponto de corte de li ≤ 4,99, para ambos os ensaios), observamos que o potencial preditivo do HET-CAM é superior quando os dentífricos são testados diluídos. De fato, uma das limitações detectadas em nosso estudo foi o uso de



# ERWEKA

## Mais de 50 anos de Qualidade e Experiência



### Dissolutores / Sistema de Dissolução

Consulte-nos sobre as várias alternativas de  
automação tipo Off Line e On Line



### Durômetros

Durômetros para teste semi-automáticos ou automáticos de até 5 parâmetros: peso, espessura, diâmetro, largura e dureza

### Outros Aparelhos:

- Desintegradores
- Friabilômetros
- Fluidez
- Densidade e Volume Aparente
- Equipamentos para Desenvolvimento de Produtos
- Teste Integridade Blisters



Representante Comercial

Tel.: (11) 5587-4777

Fax: (11) 5589-2746

e-mail: [pharmagtec@pharmagtec.com.br](mailto:pharmagtec@pharmagtec.com.br)

### Serviços:

- Reforma de Aparelhos
- Calibração Física
- Calibração Química
- Qualificação IQ/OQ/PQ
- Treinamentos
- Manutenção
- Contratos

## CATENA

Assistência Técnica Autorizada

Tel/Fax: (11) 2441-1475

e-mail: [catena@catena.srv.br](mailto:catena@catena.srv.br)

# ALEMMAR

COMERCIAL E INDUSTRIAL S.A.



Moinho de disco  
P13 Premium line



Britador de Mandíbulas  
P1 Premium line



Moinho de bolas planetário  
P6 Premium line



Moinho de rotor até 20.000 rpm  
P14 Premium line



Analísadores de  
tamanho e formato de  
partículas  
Analysette 28

# FRITSCH

Conheça a nova linha de moinhos e  
analísadores de tamanho e formato  
de partículas para preparação de  
amostras.

Alem Mar Comercial Industrial S.A.

11-3229-8344

[comercial@alemmar.com.br](mailto:comercial@alemmar.com.br)

[www.alemmar.com.br](http://www.alemmar.com.br)



produtos não diluídos. No entanto, esta dificuldade foi contornada com todos os produtos quando estes foram testados diluídos a 10% no HET-CAM, apresentando dessa forma, uma melhor correlação com os resultados obtidos no modelo animal. Confirmou-se, porém, a tendência do modelo HET-CAM em superestimar resultados obtidos no modelo animal, já que mesmo no teste com produtos diluídos a 10%, este método foi capaz de detectar somente três dos seis produtos classificados como produtos com baixo potencial irritante (*i.e.* 03 resultados falso-positivos).

Dados semelhantes foram obtidos anteriormente (HAGINO *et al* 1999; NOBREGA *et al* 2008; NOBREGA *et al* 2012), quando se avaliou a correlação existente entre o HET-CAM e o teste de irritação ocular de Draize. Um dos aspectos que pode ser 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 córion-alantoide, sem que haja nenhuma barreira protetora neste tipo de exposição. Assim, diante dos resultados do presente estudo, recomendamos que (*i.*) os produtos sejam testados diluídos no método HET-CAM, e (*ii.*) os resultados obtidos neste método sejam confirmados através de outros métodos *in vitro* (*e.g.* citotoxicidade, RBC, modelos de órgãos isolados etc.), que avaliam diferentes desfechos para confirmação da classificação irritante.

Por fim, diante do aumento no consumo de produtos cosméticos e devido a questões éticas relacionadas à diminuição do número de animais em pesquisa científica, sobretudo na avaliação da qualidade dessa 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. 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.

## CONCLUSÕES

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

- (i) Os dados *in vitro* se correlacionaram melhor com os achados macro e microscópicos obtidos no modelo animal, quando os produtos foram testados a 10% no HET-CAM do que quando testados puros.
- (ii) Quanto ao grau de preditibilidade do modelo HET-CAM (produto a 10%) em relação ao teste de irritação da mucosa oral em hamsters, os seguintes resultados foram obtidos: sensibilidade = 100%, especificidade = 50% e precisão = 85%.
- (iii) O método HET-CAM tende a superestimar resultados obtidos *in vivo*, indicando que resultados positivos neste modelo 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 etc) para confirmação da classificação irritante.

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho é parte da dissertação de mestrado de Márcia da Conceição Corrado apresentada ao Programa de Mestrado em Vigilância Sanitária do INCQS/FIOCRUZ. Isabella Fernandes Delgado é bolsista pesquisadora do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (DT-II/CNPq). Apoio financeiro: MCT/CNPq 14/2008.

## REFERÊNCIAS

BRASIL. Resolução nº61, de 14 de junho de 2003. Determina a suspensão em todo o território nacional do produto creme dental com flúor Ki-Pasta, 30g, lotes nºs B250Ae B254A. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Poder Executivo, Brasília, DF, 15 jan. 2003.

BRASIL. Resolução n.º192, de 04 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 nºs. B247, B248, B249, B250, B253, B254 e B255. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Poder Executivo, Brasília, DF, 06 fev. 2003.

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*, v. 83, p. 377-399, 1944.

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

## REFERÊNCIAS

HAGINO, S. *et al.* Interlaboratory validation of in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients. (2) Chorionallantoic Membrane (CAM) test. *Toxicology In vitro*, v. 13, n. 01, p. 99-113, feb. 1999.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 10993-10: Biological evaluation of medical devices — Part 10: Tests for irritation and delayed-type hypersensitivity. 2010.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 11609: Dentistry – Dentifrices – Requirements, test methods and marking. 2010.

LUEPKE, N.P.; KEMPER, FH. The HET-CAM test: An alternative to the Draize Eye Test. *Food and Chemical Toxicology*, v. 6, n. 7, p. 287-291, 1986.

NOBREGA, A.M. *et al.* Avaliação da irritabilidade ocular induzida por ingredientes presentes em produtos cosméticos através do teste de Draize e dos métodos HET-CAM e RBC. *Universitas Ciências da Saúde*, v. 6, n. 2, p. 103-120, jul./dez. 2008.

NOBREGA, A.M. *et al.* Determination of eye irritation potential of low-irritant products: comparison of in vitro results with the in vivo Draize rabbit test. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Curitiba, v. 55, n. 3, p. 381-388, may/june 2012.

SCHEEL, J. *et al.* Eye irritation potential: Usefulness of the HET-CAM under the Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (GHS). *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 59, n. 03, p. 471-492, apr. 2011.

STEILING, W. *et al.* The HET-CAM, a useful In vitro assay for assessing the eye irritation properties of cosmetic formulations and ingredients. *Toxicology In Vitro*, v. 13, n. 2, p. 375-384, apr. 1999.

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

WORTH, A. P.; BALLS, M. The importance of the prediction model in the validation of alternative test. *Alternative Laboratory Animal*, v. 29, p. 135-143, 2001.

WORTH, A. P.; CRONIN, M. T. D. Prediction models for eye irritation potential based on endpoints of HET-CAM and Neutral Red Uptake test. *In Vitro & Molecular Toxicology*, v. 14, p. 143-156, 2001.



## SOLUÇÕES PARA PROBLEMAS ANALÍTICOS

Análises químicas  
e desenvolvimento  
de projetos.

(19) 3521-3007  
[www.ca.iqm.unicamp.br](http://www.ca.iqm.unicamp.br)