UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos
Área de Produção e Controles Farmacêuticos

TESTE DE CITOTOXICIDADE *IN VITRO* COMO
ALTERNATIVA AO TESTE *IN VIVO* DE DRAIZE NA
AValiação DE PRODUTOS COSMÉTICOS

AUREA SILVEIRA CRUZ

Tese para obtenção do grau de DOUTOR

Orientadora
Prof^a Titular Terezinha de Jesus Andreoli Pinto

São Paulo
2003

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Cruz, Aurea Silveira
C957p Teste de citotoxicidade *in vitro* como alternativa ao teste
in vivo de Draize na avaliação de produtos cosméticos /
Aurea Silveira Cruz. -- São Paulo, 2003.
107p

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Pinto, Terezinha de Jesus Andreoli

1. Ensaios biológicos : Farmacologia 2. Cosméticos :
Segurança : Tecnologia 3. Célula : Cultura : Biologia. I. T.
II. Pinto, Terezinha de Jesus Andreoli, orientador.

615.19018 CDD

AUREA SILVEIRA CRUZ

**TESTE DE CITOTOXICIDADE *IN VITRO* COMO ALTERNATIVA
AO TESTE *IN VIVO* DE DRAIZE NA AVALIAÇÃO DE PRODUTOS
COSMÉTICOS**

COMISSÃO JULGADORA
da
Tese para obtenção do grau de DOUTOR

Prof^a Titular Terezinha de Jesus Andreoli Pinto
Orientador / Presidente

1º. Examinador

2º. Examinador

3º. Examinador

4º. Examinador

São Paulo, de de 2003

A Deus pela minha existência, amparo e
ajuda nos momentos de aflição

Aos meus pais pela minha formação

A meu marido, Wilson e minha filha,
Nathalia pelo apoio e pelos momentos
que deixamos de aproveitar juntos para
que este trabalho fosse realizado

Agradecimentos

Minha gratidão a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e em especial à:

Profa. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto pela orientação, compreensão e confiança durante o desenvolvimento deste trabalho

Funcionários da Seção de Culturas Celulares do Instituto Adolfo Lutz: Tamiko I. Ikeda, Rizolina P. Santos, Marlene X. R. de Sena, Miriam S. Alves, Graciosa P. Palmieri, Sirlene M. P. Schneidwind, Paulo C. G. Conceição, Márcia C. T. Silva e Maria D. Silva e a todos aqueles que indiretamente colaboraram para o andamento do Laboratório

Tamiko I. Ikeda, Rizolina Pereira dos Santos e Sirlene M. P. Schneidwind pela colaboração nos testes *in vitro*

Sizue Ota Rogero pela colaboração na padronização do método de captura do vermelho neutro

Funcionários da Seção de Cosméticos do Instituto Adolfo Lutz, em especial a Ligia L. Miyamaru e Cristina S. Bárbara, pela colaboração nos testes *in vivo*

Antonio Roberto de Souza Ferreira pela confecção das fotografias

Mônica Casajús pela orientação e auxílio na parte estatística

Bibliotecárias Adriana de Almeida Barreiros e Leila Aparecida Bonadio pela orientação e revisão das bibliografias

Valter Ruvieri pela valorosa contribuição e sugestões na formatação deste trabalho

Dra. Maria Luisa Barbosa pela amizade, incentivo, sugestões, críticas e disposição em ajudar sempre neste e outros trabalhos

Janice Campos de Azevedo pelo incentivo, apoio, amizade e coleguismo, desde o início do curso

Dra. Clélia H. O Martinez pelos ensinamentos em culturas celulares

Dr. Luis Florêncio de Salles-Gomes pelo constante incentivo ao meu crescimento profissional

Dra. Luiza T. M. de Souza, Diretora do Serviço de Virologia e Dra. Julia F. M. de Souza, Diretora da Divisão de Biologia Médica do Instituto Adolfo Lutz por permitirem a execução deste trabalho

Amigos e companheiros de todas as horas que apoiaram, incentivaram, opinaram e colaboraram para que este trabalho fosse concluído

Instituto Adolfo Lutz que possibilitou esta jornada

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Cosméticos.....	3
2.2 Testes <i>In Vivo</i>	6
2.3 Testes <i>In Vitro</i>	10
2.3.1 <i>Culturas Celulares</i>	10
2.3.2 <i>Testes In Vitro</i>	13
3 - OBJETIVOS	28
4 - MATERIAL E MÉTODO	29
4.1 Amostras	29
4.2 Avaliação de Segurança Biológica	30
4.2.1 <i>Avaliação In Vivo</i>	30
4.2.1.1 Teste de Irritação Cutânea primária.....	30
4.2.1.2 Teste de Irritação Ocular.....	32
4.2.1.3 Teste de Irritação de Mucosa Oral.....	34
4.2.2 <i>Avaliação In Vitro</i>	34
4.2.2.1 <i>Culturas Celulares</i>	35
4.2.2.2 <i>Método de Difusão em Ágar</i>	36
4.2.2.3 <i>Método de Captura de Vermelho Neutro</i>	37
4.3 Avaliação Estatística.....	39
5 - RESULTADOS	40
5.1 Testes <i>In Vivo</i>	40
5.1.1 <i>Irritação Cutânea Primária</i>	40
5.1.2 <i>Irritação Ocular</i>	43
5.1.3 <i>Irritação de Mucosa Oral</i>	46
5.2 Testes <i>In Vitro</i>	48
5.2.1 <i>Citotoxicidade das amostras pelo método de difusão em ágar</i>	48
5.2.2 <i>Método de Captura do Vermelho Neutro</i>	69
5.3 Análise Estatística.....	72
5.3.1 <i>Método de Difusão em Ágar</i>	72
5.3.2 <i>Método de Captura do Vermelho Neutro</i>	75
6 - DISCUSSÃO	77
7 - CONCLUSÃO.....	90
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
9 - RESUMO.....	104

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Índices de irritação cutânea das amostras de sabonetes líquidos quando avaliadas na concentração de 100%	41
Figura 02 - Teste de irritação cutânea durante avaliação da amostra 12 de sabonete líquido: a) coelho albino com pele e pêlo normal, b) quatro áreas tricotomizadas no dorso do animal, c) áreas superiores, em relação a cabeça, com amostra aplicada e áreas inferiores como controle, d) oclusão das quatro áreas, e) e f) leitura após 24 horas e 72 horas com observação de edema e eritema	43
Figura 03 - Índices de irritação ocular e índices de irritação obtidos em particular para a íris, conjuntiva e córnea, das amostras de sabonetes líquidos avaliadas na concentração de 100%	45
Figura 04 - Teste de irritação ocular durante avaliação da amostra 14 de sabonete líquido: a) olho normal do coelho como controle, b), c), d), e) 24 horas, 48 horas, 72 horas e sete dias após aplicação da amostra, apresentando opacidade de córnea, irite, hiperemia, quemose e secreção	46
Figura 05 - Teste de irritação de mucosa oral: a) mucosa oral do coelho antes da aplicação da amostra de batom, b) mucosa oral, onze dias após a aplicação da amostra mostrando ausência de irritação	47
Figura 06 - Amostras irritantes quando avaliadas nos diferentes testes <i>in vivo</i>	47
Figura 07 - Citotoxicidade de diferentes concentrações das 60 amostras de batom, quando avaliadas <i>in vitro</i> nas linhagens celulares NCTC clone 929 e FPC-IAL	48
Figura 08 - Citotoxicidade de diferentes concentrações das 18 amostras de batom com protetor solar, quando avaliadas <i>in vitro</i> nas linhagens celulares NCTC clone 929 e FPC-IAL	50
Figura 09 - Citotoxicidade de diferentes concentrações das 16 amostras de <i>blush</i> , quando avaliadas <i>in vitro</i> nas linhagens celulares NCTC clone 929 e FPC-IAL	51
Figura 10 - Citotoxicidade de diferentes concentrações das 15 amostras de pó compacto, quando avaliadas <i>in vitro</i> nas linhagens celulares NCTC clone 929 e FPC-IAL	52
Figura 11 - Citotoxicidade de diferentes concentrações das 15 amostras de base facial, quando avaliadas <i>in vitro</i> nas linhagens celulares NCTC clone 929 e FPC-IAL	53
Figura 12 - Citotoxicidade de diferentes concentrações das 33 amostras de sombra para os olhos, quando avaliadas <i>in vitro</i> nas linhagens celulares NCTC clone 929 e SIRC	54
Figura 13 - Citotoxicidade de diferentes concentrações das 15 amostras de máscara para os cílios, quando avaliadas <i>in vitro</i> nas linhagens celulares NCTC clone 929 e SIRC	55

Figura 14 - Citotoxicidade de diferentes concentrações das 15 amostras de lápis ou delineador para os olhos, quando avaliadas <i>in vitro</i> nas linhagens celulares NCTC clone 929 e SIRC	56
Figura 15 - Citotoxicidade de diferentes concentrações das 17 amostras de sabonete líquido, quando avaliadas <i>in vitro</i> nas linhagens celulares NCTC clone 929, FPC-IAL e SIRC	57
Figura 16 - Placas das linhagens celulares utilizadas no método de difusão em ágar, mostrando o halo claro ao redor do controle positivo e ausência de halo ao redor ou sob o controle negativo: a) linhagem celular NCTC clone 929, b) linhagem celular FPC-IAL e c) linhagem celular SIRC.....	67
Figura 17 - Fotomicrografias das monocamadas das linhagens celulares utilizadas no método de difusão em ágar apresentando as células coradas e as células claras e lisadas caracterizadas pela presença do efeito tóxico a) linhagem celular NCTC clone 929, b) linhagem celular FPC-IAL e c) linhagem celular SIRC – 100X.....	67
Figura 18 - Amostras que apresentaram efeito tóxico nas linhagens celulares e que apresentaram $IZ > 2$, de acordo com a região de aplicação da amostra a) cutânea, b) ocular e c) mucosa oral	68
Figura 19 - Resultados obtidos nos testes <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de acordo com a região de aplicação das amostras: a) cutânea, b) ocular e c) mucosa oral.....	69
Figura 20 - Curvas dose-resposta obtidas de cada amostra de sabonete líquido e dos controles positivos e negativos para obtenção dos IC_{50} nas linhagens celulares NCTC clone 929, FPC-IAL e SIRC	70
Figura 21 - Microplacas utilizadas no método de captura do vermelho neutro, mostrando os gradientes de coloração obtidos nas diferentes concentrações utilizadas na avaliação das amostras de sabonete líquido: a) linhagem celular NCTC clone 929, b) linhagem celular FPC-IAL e c) linhagem SIRC.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Graduações das reações observadas nos diferentes tecidos de acordo com a escala de Draize	33
Tabela 02 - Valores edema e eritema utilizados para o cálculo dos índices de irritação cutânea das amostras de sabonetes líquidos avaliadas na concentração de 100%	42
Tabela 03 - Valores de irritação nos diferentes tecidos e valores de irritação ocular obtidos de acordo com a escala de Draize, após 24 horas de instilação das amostras de sabonetes líquidos avaliadas na concentração de 100%	44
Tabela 04 - Diâmetros dos halos de toxicidade (cm) obtidos nas diferentes concentrações das amostras de batom para as linhagens celulares NCTC clone 929 e FPC-IAL.....	49
Tabela 05 - Diâmetros dos halos de toxicidade (cm) obtidos nas diferentes concentrações das amostras de batom com protetor solar para as linhagens celulares NCTC clone 929 e FPC-IAL	50
Tabela 06 - Diâmetros dos halos de toxicidade (cm) obtidos nas diferentes concentrações das amostras de <i>blush</i> para as linhagens celulares NCTC clone 929 e FPC-IAL.....	51
Tabela 07 - Diâmetros dos halos de toxicidade (cm) obtidos nas diferentes concentrações das amostras de pó compacto para as linhagens celulares NCTC clone 929 e FPC-IAL.....	52
Tabela 08 - Diâmetros dos halos de toxicidade (cm) obtidos nas diferentes concentrações das amostras de base facial para as linhagens celulares NCTC clone 929 e FPC-IAL	53
Tabela 09 - Diâmetros dos halos de toxicidade (cm) obtidos nas diferentes concentrações das amostras de sombra para os olhos para as linhagens celulares NCTC clone 929 e SIRC	54
Tabela 10 - Diâmetros dos halos de toxicidade (cm) obtidos nas diferentes concentrações das amostras de máscara para os cílios para as linhagens celulares NCTC clone 929 e SIRC	55
Tabela 11 - Diâmetros dos halos de toxicidade (cm) obtidos nas diferentes concentrações das amostras de lápis ou delineador para os olhos para as linhagens celulares NCTC clone 929 e SIRC.....	56
Tabela 12 - Diâmetros dos halos de toxicidade (cm) obtidos nas diferentes concentrações das amostras de sabonete líquido para as linhagens celulares NCTC clone 929 FPC-IAL e SIRC.....	58
Tabela 13 - Citotoxicidade das amostras de batom graduada em índice de zona, segundo a USP 25	60
Tabela 14 - Citotoxicidade das amostras de batom com protetor solar graduada em índice de zona, segundo a USP 25.....	61
Tabela 15 - Citotoxicidade das amostras de <i>blush</i> graduada em índice de zona, segundo a USP 25.....	61

Tabela 16 - Citotoxicidade das amostras de pó compacto graduada em índice de zona, segundo a USP 25	61
Tabela 17 - Citotoxicidade das amostras de base facial graduada em índice de zona, segundo a USP 25	62
Tabela 18 - Citotoxicidade das amostras de sombra para os olhos graduada em índice de zona, segundo a USP 25.....	63
Tabela 19 - Citotoxicidade das amostras de máscara para os cílios graduada em índice de zona, segundo a USP 25.....	63
Tabela 20 - Citotoxicidade das amostras de lápis ou delineador para os olhos graduada em índice de zona, segundo a USP 25	64
Tabela 21 - Citotoxicidade das amostras de sabonetes líquidos graduada em índice de zona, segundo a USP 25.....	65
Tabela 22 - Citotoxicidade do total de amostras graduada em índice de zona, segundo a USP 25	66
Tabela 23 - Valores de IC ₅₀ obtidos nas amostras de sabonetes líquidos quando avaliadas nas linhagens celulares NCTC clone 929, FPC-IAL e SIRC	71
Tabela 24 - Coeficiente de correlação de Pearson (r) e nível de significância (p) entre os diâmetros de toxicidade das linhagens celulares na avaliação das diferentes amostras, quando analisadas nas concentrações de 100%, 10% e 1%	73
Tabela 25 - Coeficiente de correlação de Pearson (r) e nível de significância (p) entre os índices de irritação primária (IIP) e os diâmetros de toxicidade obtidos nas linhagens celulares durante avaliação das amostras de sabonetes líquidos em diferentes concentrações	73
Tabela 26 - Coeficiente de correlação de Pearson (r) e nível de significância (p) entre os índices de irritação ocular (IIO) e os diâmetros de toxicidade obtidos nas linhagens celulares durante avaliação das amostras de sabonetes líquidos em diferentes concentrações	74
Tabela 27 - Coeficiente de correlação de Pearson (r) e nível de significância (p), entre os índices de irritação dos tecidos e os diâmetros de toxicidade obtidos nas linhagens celulares durante avaliação das amostras de sabonetes líquidos em diferentes concentrações.....	74
Tabela 28 - Valores de sensibilidade e especificidade obtidos no método de difusão em ágar com relação aos resultados de todas as amostras avaliadas nos testes <i>in vivo</i>	75
Tabela 29 - Coeficientes de correlação de Pearson e nível de significância (p), entre os valores de IC ₅₀ obtidos nas três linhagens celulares utilizadas	75
Tabela 30 - Coeficientes de correlação de Pearson e nível de significância (p), entre os valores de IC ₅₀ obtidos nas linhagens celulares e os índices de Irritação Primária (IIP)	75
Tabela 31 - Coeficientes de correlação de Pearson e nível de significância (p), entre os valores de IC ₅₀ obtidos nas linhagens celulares e os índices de irritação ocular (IIO) e individual dos tecidos	76

Tabela 32 - Valores de sensibilidade e especificidade obtidos no método de captura do vermelho neutro nas três linhagens celulares em relação aos testes <i>in vivo</i> na avaliação das amostras de sabonete líquido	76
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASTM	American Society for Testing and Materials
ATCC	American Type Culture Collection
ATV	Associação de Tripsina 0,20% e Versene 0,02%
BCOP	Opacidade e Permeabilidade de Córnea Bovina (Bovine Corneal Opacity and Permeability)
CAMVA	Teste de Membrana Córion-alantóica (Chorion allantoic membrane vascular assay)
CEET	Olho Isolado de Galinha (Chicken enucleated eye test)
COLIPA	European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association
CTFA	Cosmetic Toiletry and Fragrance Association
EC/HO	European Commission/British Home Office
ECVAM	European Center for Validation of Alternatives Methods
FDA	Food and Drug Administration
FPC-IAL	Cultura de células fibroblástica de pele de coelho
HeLa	Cultura celular de carcinoma de cervix uterina
HET-CAM	Teste de Membrana Córion-alantóica (Hen's egg-chorion allantoic membrane test)
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IC₅₀	Índice de citotoxicidade 50%
IIO	Índice de Irritação Ocular
IIP	Índice de Irritação Primária
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IRAG	Interagency Regulatory Alternative Group
IRE	Olho Isolado de Coelho (Isolated rabbit eye)
ISO	International Organization for Standardization
IZ	Índice de Zona
LAL	Limulus Amebócito Lisado
LDH	Lactato Desidrogenase
MDCK	Cultura celular de rim de cachorro
MEM	Meio Mínimo de Eagle
MEM+L-15	Meio Mínimo de Eagle + Meio Leibovitz n° 15
MTT	Brometo de (4,5-dimetiltiazol-2-IL)2,5 difeniltetrazólio
NCTC clone 929	Cultura de células de tecido conjuntivo de camundongo
NHEK	Cultura de células de queratinócitos humano
NRR	Teste de Liberação de vermelho Neutro (neutral red release)
OECD	Organisation for Economic Cooperation and Development
PGE2	Prostaglandina
QSAR	Quantitation Structure Activity Relationship
SFB	Soro Fetal Bovino
SIRC	Cultura de células de córnea de coelho
TEA	Teste de Tecido Equivalente (Tissue equivalent assay)
TER	Teste de Resistência Elétrica Transcutânea (transcutaneous electrical resistance)
USP	United States Pharmacopeia

1 - INTRODUÇÃO

O potencial irritante de várias substâncias e produtos de uso humano vêm sendo avaliado em experimentos que utilizam animais de laboratório, desde a década de 40. Alguns dos ensaios adotados para tal finalidade, denominados testes de irritação ocular ou cutânea, ainda hoje adotados pelos órgãos oficiais, foram inicialmente descritos por Draize.

Procedimentos severos que afetam a segurança dos animais resultam em críticas e discussões por parte de entidades não governamentais. Métodos alternativos vêm sendo investigados para tentar minimizar este conflito.

O estabelecimento das linhagens celulares em monocamadas, após a segunda metade do século XX, impulsionou a elaboração e execução de diferentes estudos em áreas como a microbiologia, imunologia, patologia, genética e toxicologia, entre outras. Os estudos de toxicidade *in vitro*, a partir dos anos 60, têm mostrado que os testes com culturas celulares são sensíveis, rápidos, de baixo custo e reprodutíveis quando utilizados na avaliação de materiais plásticos de uso médico. Muitas vezes possibilitam a substituição, mesmo pelos órgãos oficiais, dos testes de implantes realizados em coelhos para este tipo de produto.

Atualmente, diferentes estudos estão sendo desenvolvidos para validar os testes de citotoxicidade *in vitro*, como substitutos dos ensaios de irritação ocular e cutânea, na avaliação de produtos cosméticos e outros. Entre as metodologias que empregam o cultivo celular, a constatação da viabilidade das

células com auxílio de diferentes corantes vitais, como o vermelho neutro, tem sido um dos parâmetros mais citados em literatura. Estes ensaios têm como vantagem utilizar tanto células humanas como animais, de diferentes tecidos ou órgãos, as quais podem ter a mesma origem das células ou tecidos atingidos pelos produtos quando testados *in vivo*.

A introdução, padronização e validação de ensaios alternativos são necessárias para cada país, tendo em vista que as formulações dos produtos podem sofrer alterações ou adaptações para atender a diferentes necessidades da população local.

Face à necessidade de reduzir ou até mesmo eliminar o uso de animais de laboratório, a implantação no Brasil de testes *in vitro*, voltados para a determinação de substâncias tóxicas em produtos de uso humano, resulta na garantia da saúde da população, atende às recentes regras de bioética, bem como aos anseios da pesquisa científica em âmbito nacional e internacional.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cosméticos

O uso de produtos cosméticos iniciou nas antigas civilizações, com o objetivo de atender aos conceitos culturais da época. A literatura faz referências à maquiagem destinada para colorir a face, os lábios e a área dos olhos, uma das primeiras a ser utilizada, pois olhos grandes e vistosos eram sinal de beleza, (BALSAM e SANGARIN, 1972). Infelizmente, este conceito de beleza conduziu a muitos casos graves de toxicidade cutânea e sistêmica, pois durante muito tempo os cosméticos foram incorporados de compostos de chumbo, mercúrio, antimônio, bismuto, arsênio e zinco em quantidades não recomendadas (WITKOWSKI e PARISH, 2001).

Com o avanço da ciência e tecnologia, estes conceitos foram gradualmente evoluindo e atualmente os produtos de higiene, cosméticos e perfumes são definidos, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) como: “preparados constituídos por substâncias naturais e sintéticas ou suas misturas, **de uso externo** nas diversas partes do corpo humano, pele, sistema capilar, lábios, órgãos genitais externos, unhas, dentes e membranas mucosas da cavidade oral, com o objetivo exclusivo ou principal de limpar, perfumar, alterar a aparência, corrigir odores corporais, protegendo e/ou mantendo em bom estado” (BRASIL, 1977; 1999 e 2000).

A pele é o órgão do ser humano mais exposto aos produtos cosméticos e a interação entre os dois pode ser benéfica ou nociva, dependendo do tipo de manifestações e do período de utilização. Sendo assim, os produtos cosméticos podem apresentar três tipos de riscos, reação local do tipo irritativa, reação imunológica do tipo alérgica e efeito sistêmico consecutivo a uma penetração transcutânea ou transmucosa. Para avaliar estes riscos, testes de segurança são realizados para verificar a ausência de irritação dérmica, ocular e de mucosa, além da sensibilização, fototoxicidade e fotoalergia (BENY, 2000; NUNES, 2000).

Na União Européia e nos Estados Unidos, os cosméticos pertencem a uma única categoria de produtos que não são submetidos ao registro prévio à sua comercialização. Porém, o fabricante tem por obrigação montar um dossiê técnico com todas as informações, desde fórmulas, especificações físico-químicas, avaliações microbiológicas e segurança, entre outras. Os componentes das formulações dos produtos devem estar de acordo com as listas de ingredientes proibidos ou restritos (MASSON, 1999; MILLIKAN, 2001).

No Brasil, de acordo com a Lei n.6360 de setembro de 1976 e do Decreto n.79.094 de 5 de janeiro de 1977, que a regulamenta, o Ministério da Saúde, tem a responsabilidade de legislar e fiscalizar a produção de cosméticos, de modo a garantir que apenas produtos com qualidade, segurança e eficácia sejam disponibilizados ao consumo. Desta maneira, obriga o registro de produtos cosméticos antes de sua comercialização (BRASIL, 1977).

Na Portaria 71 de 29 de maio de 1996, os produtos cosméticos foram divididos em grupos distintos conforme o “Grau de Risco” que cada tipo de produto pode ou não oferecer à saúde humana. Os produtos com Grau de Risco 1 compreendem os xampus, sabonetes, produtos para os lábios, olhos, maquiagem facial, entre outros. Os de Grau de Risco 2 são aqueles com indicações específicas, cujas características exigem comprovação de segurança e/ou eficácia, bem como informações e cuidados quanto ao modo

ou restrições de uso, entre eles, encontram-se todos os produtos infantis, protetores solares, tinturas, produtos para rugas, e outros (BRASIL, 1996).

Conforme a Resolução 335 de 22/07/1999 a ANVISA, órgão do Ministério da Saúde, estabelece a reorganização do sistema de controle sanitário dos produtos cosméticos, definindo-os e classificando-os. Assim aqueles caracterizados como Grau de Risco 1 não mais necessitam de registro, entretanto a notificação deve ser feita até 30 dias antes da comercialização, já os de Grau de Risco 2 continuam necessitando de registro, conforme a Portaria 71/96. O fabricante ou importador deve ainda, possuir dados que atestem a qualidade, segurança e eficácia de todos os seus produtos, bem como a idoneidade dos respectivos dizeres de rotulagem. Documentos com tais comprovações deverão ser apresentados aos órgãos de vigilância sanitária, sempre que solicitados ou por ocasião das inspeções (BRASIL, 1999).

Na Resolução 79 de 28/08/2000, a ANVISA estabelece e esclarece a definição e classificação de produtos, atualiza as listas de substâncias permitidas, listas restritivas e listas de uso proibitivo (Brasil, 2000). A Resolução 38 de 21/03/2001 estabelece critérios e procedimentos para as novas categorias de produtos cosméticos destinados ao uso infantil que passam a ser considerados como Grau de Risco 2 e devem comprovar sua segurança por ocasião do pedido de registro (BRASIL, 2001).

Apesar de toda a preocupação por parte dos órgãos fiscalizadores, alguns autores apresentam relatos de formulações de produtos cosméticos que resultam com frequência em processos irritativos e dermatites de contato, principalmente na área dos olhos. Discutem ainda, que atributos apresentados na rotulagem de alguns produtos, designados por expressões como hipoalergênico, dermatologicamente testado, não irritante, muitas vezes não podem ser comprovados (DRAELOS, 2001; WOLF, 2001; WOLF et al., 2001).

Assim sendo, justifica-se a preocupação de estudar modelos experimentais *in vivo* ou *in vitro* que possam avaliar quantitativa e qualitativamente os efeitos dos produtos sobre a pele ou na região dos olhos,

no sentido de obterem-se formulações seguras. Além de fornecer subsídios que facilitam o controle de produtos disponíveis no mercado, tais iniciativas estarão colaborando para com as ações de Saúde Pública.

2.2 Testes *In Vivo*

Desde a antiguidade, várias espécies animais foram utilizadas como modelos vivos, em avaliações de situações de risco, principalmente do gás mostarda, utilizado durante a guerra, e no desenvolvimento da indústria farmacêutica no século XX. O efeito prejudicial para os olhos ocasionado por algumas substâncias, resultou no desenvolvimento da toxicologia ocular que utilizava principalmente o coelho, como modelo de estudo, para as avaliações de irritação (WILHELMUS, 2001).

No início da década de 40, Jonas S. Friendenwald propôs a graduação de níveis de severidade dos diferentes componentes da irritação ocular em escalas numéricas. Este método foi modificado e adotado para avaliar quantitativamente substâncias perigosas, bem como garantir a segurança dos produtos de aplicação tópica. Os protocolos para testes cutâneos e oculares incluíram avaliações agudas, intermediárias ou sub-agudas e crônicas. Os produtos eram aplicados sobre pele e mucosas ocular e peniana de coelhos albinos da raça Nova Zelândia. Os coelhos em relação aos outros animais possuem pele permeável, olhos grandes com anatomia e fisiologia bem descrita, são fáceis de manusear, apresentam vantagens no aspecto econômico, além de fácil aquisição (DRAIZE, WOODARD e CALVERY, 1944; WILHELMUS, 2001).

O teste de irritação cutânea, seja do tipo primária ou cumulativa, estabelece graduações para reações como edema e eritema que ocorrem na pele tricotomizada, intacta ou previamente submetida à abrasão. O teste de irritação ocular estabelece graduações para as reações observadas na córnea, íris e conjuntiva. Os protocolos também definem volume, forma de

administração, intervalos de observação e número de animais a serem utilizados. Estes ensaios, denominados testes de Draize, foram adotados por muitos laboratórios e tornaram-se a base para os métodos oficiais de avaliação de irritação dérmica e ocular. Aplicam-se a produtos químicos, de higiene, cosméticos, perfumes e correlatos, que podem ser, conforme resultados obtidos, classificados em irritantes e não irritantes (DRAIZE, WOODARD e CALVERY, 1944; AZEVEDO, 1998; PINTO, KANEKO e OHARA, 2000).

KAY e CALANDRA (1962) propuseram modificações quanto ao critério de avaliação, estabelecendo oito classificações para o potencial irritante, com graduações intermediárias entre não irritante e maximamente irritante, ao contrário de Draize que estabeleceu somente dois tipos de classificação, não irritante e irritante.

O conceito dos três Rs, *reduction, refinement e replacement*, para o uso de animais utilizados em ensaios ou no desenvolvimento de pesquisas foi definido após a publicação do livro “The Principle of Humane Experimental Technique” de Russel e Burch em 1959. Este conceito tem como objetivo a redução do número de animais, o refinamento dos métodos utilizados e a reposição ou troca destes métodos por ensaios substitutos ou alternativos *in vitro*. Com a publicação do livro de Singer em 1975, sobre a ética no tratamento dos animais, o teste ocular de Draize tornou-se alvo para as críticas das sociedades protetoras dos animais (WILHELMUS, 2001).

Diferentes modificações vêm sendo propostas por pesquisadores de todo mundo. Estas envolvem desde o número de animais, quantidade do produto aplicado, tempo de irrigação após aplicação do produto, período de observação, graduação e interpretação dos resultados. As mais aceitas são as que não alteram a precisão dos resultados obtidos nos ensaios de irritação ocular e cutânea (WILHELMUS, 2001).

A modificação mais citada refere-se ao número de animais, originalmente nove e atualmente nos protocolos oficiais variando de três a seis coelhos, a exemplo dos protocolos da Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD), da Food and Drug Administration (FDA) e do

Ministério da Saúde do Japão (PINTO, KANEKO e OHARA, 2000; WILHELMUS, 2001). Produtos com pH extremos, abaixo de 2 ou acima de 11,5 não devem ser aplicados nos olhos, razão pelo qual são preliminarmente avaliados pelo teste de irritação dérmica e dependendo do resultado reavaliados pelo teste de irritação ocular (WILHELMUS, 2001).

SPRINGER et al. (1993) analisaram a redução do número de animais praticada no teste de irritação ocular, por diferentes entidades internacionais e sugeriram que o uso de seis animais evita, na maioria dos casos, resultados falsos positivos ou negativos, além de muitas vezes eliminar a necessidade de uma segunda bateria de testes. Estas recomendações foram adotadas pelos órgãos americanos, enquanto que os europeus recomendam o emprego de até três animais, dependendo do tipo de produto a ser avaliado.

Diversos estudos sugerem diminuir a quantidade do produto a ser aplicado no olho do animal, passando de 0,1 mL, como no método de Draize para 0,01 mL, sem alterar a sensibilidade do método. Sete compostos com diferentes graus de irritação foram avaliados no caso de irritantes severos e observou-se que a redução do volume altera a duração do efeito, sem alterar a classificação das reações observadas, mas em alguns casos os irritantes leves não foram detectados (WILLIAMS, GRAEPEL e KENNEDY, 1982). A redução do volume sugerida por outros pesquisadores visa ainda, tornar o ensaio mais próximo do emprego do produto, passando a refletir o modo de uso real em humanos (GETTINGS et al., 1996b; GETTINGS et al., 1998).

ROGGEBAND et al. (2000), após avaliarem detergentes líquidos nas mesmas condições, em voluntários humanos e coelhos, confirmaram que o teste de irritação ocular com baixo volume em coelhos permite predizer o perigo de irritação ocular no ser humano, pois a sensibilidade geralmente é maior que a observada no homem. Estudos com macaco rhesus (*Macaca mulatta*), coelhos e voluntários humanos relatam que as reações observadas são mais semelhantes quanto mais próxima for a espécie (BECKLEY, RUSSEL e RUBIN, 1969).

Das propostas sugeridas para diminuir o incômodo causado pelos produtos, nos animais experimentais encontra-se ainda, a recomendação do uso de anestésicos, embora eles possam contribuir para alterar a permeabilidade da córnea (SEABAUGH et al., 1993; GETTINGS et al., 1994; GETTINGS et al., 1996a).

O teste de irritação dérmica vem sendo modificado por diferentes agências reguladoras, porém sua essência continua sendo a aplicação do produto sob oclusão na pele dorsal do coelho por período de 24 horas. Após a retirada do produto, os animais são observados por intervalos de 24 e 72 horas. A modificação mais citada e adotada, como oficial pela OECD, é o tempo de exposição da amostra que passou a ser de quatro horas, além do número reduzido de animais que passou de seis para pelo menos três coelhos. As diferentes variações no procedimento formam a base da classificação de corrosão ou irritação, dependendo da severidade da reação da pele, sua persistência e reversibilidade (ROBINSON, OSBORNE e PERKINS, 1999).

Classes químicas com diferentes graus de irritação ocular e cutânea, como acetatos, ácidos, álcool, álcalis, aromáticos, inorgânicos e agentes tensoativos, foram avaliadas pelo protocolo da OECD. Os resultados foram utilizados para formar um banco de dados, com o objetivo de fornecer informações utilizadas no processo de validação dos métodos alternativos aos testes de irritação *in vivo*. Os autores afirmam que estes dados são importantes e essenciais na regulamentação e aceitação dos métodos *in vitro*, sem que haja necessidade de se repetir os ensaios em animais (BAGLEY et al., 1992b; BAGLEY et al., 1996).

Mesmo com algumas modificações já estabelecidas, o teste de Draize continua sendo muito combatido por organizações não governamentais de proteção animal. Os cientistas não tem medido esforços para que haja uma harmonização dos ensaios e a implementação dos 3Rs, nas instituições de pesquisa e educacionais dos países da Europa (VAN ZUTPHEN e VAN DER VALK, 2001).

A FDA, (2001) já aceita sem a necessidade de correlação com teste *in vivo*, o teste *in vitro* Limulus amebócito lisado (LAL) para detecção de endotoxinas bacterianas nos produtos injetáveis de uso humano e animal, como substituto do teste de pirogênio em coelhos. Os testes de irritação ocular e cutânea de Draize, para a FDA, continuam sendo considerados os mais confiáveis para avaliar a segurança das substâncias introduzidas no olho ou aplicadas ao seu redor, assim como aquelas aplicadas na pele. Já a União Européia, em suas emendas diretivas, estabelece prazos para o término do uso de animais nos ensaios de produtos acabados, ingredientes ou combinação de ingredientes. Entretanto, estes prazos poderão ser adiados se os métodos alternativos não forem validados pelo European Center for Validation of Alternatives Methods (ECVAM) (FDA, 2001).

No Brasil, os Laboratórios Oficiais ligados à rede Nacional de Vigilância Sanitária seguem os protocolos do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), órgão fiscalizador ligado ao Ministério da Saúde. Os protocolos para os testes de irritação ocular e cutânea foram elaborados pelo INCQS segundo Draize, com algumas modificações descritas por Kay e Calandra, FDA e OECD (INCQS, 2001a e 2001b). A utilização dos mesmos protocolos em todos os laboratórios oficiais tem por objetivo uniformizar os resultados, ao menos no país, apesar da proclamada globalização.

2.3 Testes *In Vitro*

2.3.1 Culturas Celulares

No final do século XIX foram realizadas as primeiras tentativas de se fazer culturas de tecidos. Mas o marco inicial ocorreu em 1907, quando Ross Harrison implantou pequenos fragmentos de tubo neural de rã em coágulos de linfa da mesma espécie e observou ao microscópio a migração de fibras nervosas.

Em 1912, Aléxis Carrel, Prêmio Nobel em Cirurgia Experimental, observou que o plasma coagulado era um excelente suporte para fragmentos de tecidos, mas não continha as substâncias necessárias para o crescimento e que a adição de extratos de embriões ou de tecidos tornava possível a proliferação das células. Como profundo conhecedor das técnicas de assepsia, Carrel conseguiu manter por 34 anos uma linhagem de fibroblasto de galinha. Infelizmente, estas técnicas assépticas, desencorajavam muitos pesquisadores que acreditavam que culturas de células eram muito difíceis e sofisticadas (RIZZO, TUCHIYA e MARTINEZ, 1983; FRESHNEY, 1987).

O desenvolvimento dos meios líquidos e a descoberta dos antibióticos, por volta dos anos 40, propiciaram os experimentos com as culturas de tecidos, fornecendo a base de diversas pesquisas. A primeira linhagem celular infinita isolada a partir de tecido subcutâneo de camundongo, recebeu o nome de linhagem L. Desta linhagem, em 1948, por técnica de clonagem ocorreu o isolamento de uma nova linhagem denominada NCTC clone 929, até hoje utilizada nos estudos de toxicidade.

No início da década de 50 foi isolada a primeira linhagem celular humana, denominada HeLa, originária de carcinoma de cérvix uterino (CASTRO, 1978; PAUL, 1975; RIZZO, TUCHIYA e MARTINEZ, 1983). As linhagens, até então, iniciavam pela técnica de cultura de tecidos, os quais eram removidos dos organismos vivos, em condições estéreis e incubados em ambiente apropriados para sua manutenção e/ou crescimento. Ao contrário da cultura de órgãos, não havia a preocupação de manter sua arquitetura (PAUL, 1975; FRESHNEY, 1987).

Por volta de 1952, Dulbeco e Moscona introduziram o uso da tripsina para dissociar as células dos tecidos e com isso obter réplicas de culturas idênticas, impulsionando os estudos sobre formulações de meios quimicamente definidos e o crescimento das células sobre o vidro (CASTRO, 1978). O termo cultura de células surge com esta inovação na metodologia e significa cultivo de células dispersas de um tecido ou órgão por ação física ou química. Estas células, após serem semeadas em recipientes apropriados, formam uma

monocamada celular utilizada como substrato nos mais variados estudos (PAUL, 1975; FRESHNEY, 1987).

Atualmente, a designação de cultura de tecido é utilizada para cultivo de fragmentos de tecidos, denominados explantes, nos quais as células periféricas se multiplicam por divisão mitótica e formam uma monocamada celular. O termo genérico, cultura de tecidos, engloba as definições de cultura de tecidos, cultura de células e cultura de órgãos (PAUL, 1975; FRESHNEY, 1987).

O isolamento de várias linhagens celulares, de origem humana e animal, dos mais variados tecidos e órgãos, bem como, a descoberta de que a adição de glicerina nas culturas possibilitava o seu congelamento, preservando suas características e viabilidade, permitiu que alguns bancos de células fossem montados, facilitando o desenvolvimento de muitos estudos (CASTRO, 1978).

As linhagens mantidas nestes bancos são avaliadas quanto a sua origem, características e possíveis contaminações com outras linhagens ou com agentes, tais como vírus, fungos, bactérias, protozoários e micoplasmas. O American Type Culture Collection (ATCC), fundado na década de 60 foi um dos bancos pioneiros. Atualmente, fornece linhagens certificadas e elabora manuais de controle de qualidade, onde todos os cuidados para caracterização e manutenção de uma linhagem celular são descritos. Estes procedimentos podem ser adotados por todos os laboratórios que utilizam as células na pesquisa e no diagnóstico (ATCC, 1992, 1994).

Desde então, as técnicas de culturas celulares são amplamente empregadas, pois são econômicas, relativamente fáceis de serem mantidas e requerem pouco espaço físico. Podem ser utilizadas para preparar antígenos, anticorpos monoclonais, produzir vacinas, no isolamento de microrganismos, particularmente muitos vírus e ainda na avaliação da toxicidade dos mais variados produtos.

Os laboratórios que adotam protocolos de boas praticas de culturas celulares garantem ensaios com resultados de qualidade, reprodutíveis e

confiáveis. Estes indicadores são muito discutidos pelos pesquisadores que procuram desenvolver metodologias alternativas para redução ou substituição dos ensaios *in vivo* (GSTRAUNTHALER, 1999; GSTRAUNTHALER e HARTUNG, 1999; COMMON..., 2000).

2.3.2 Testes *In Vitro*

O questionamento quanto ao uso de animais de laboratório, na avaliação de risco dos produtos de uso humano, resultou em vários estudos a partir da década de 60, direcionados a metodologias que utilizam tecidos e células vivas de mamíferos, organismos inferiores e substratos inertes (CHAMBERLAIN e PARISH, 1990). Bancos de dados informatizados e programas que avaliam a toxicidade pela determinação de relação estrutura-atividade, também foram desenvolvidos, por exemplo o Quantitation Structure Activity Relationship (QSAR), cujo protocolo relaciona a estrutura físico-química de um componente com sua toxicidade (BARRAT, 1991; BAGLEY et al., 1992b; CRONIN, BASKETTER, YORK, 1994; BAGLEY et al., 1996). Estes estudos têm por finalidade principal obter metodologias rápidas, baratas, de fácil execução e reprodutibilidade que possam ser padronizadas e validadas, situação imprescindível para que os métodos *in vitro* alcancem a aceitação científica internacional.

As metodologias que utilizam tecidos e células vivas são as mais empregadas, pois a intrínseca complexidade celular é mantida. As células utilizadas podem ser de vários tecidos, tanto de origem humana quanto de animal, sendo que a sobrevivência e/ou proliferação celular podem ser avaliadas por contagem do número de células ou pelo uso de corantes vitais. A incorporação de radioisótopos, formação de colônias, aderência celular, produtos de metabolismo entre outros são parâmetros que também podem ser utilizados (RIDDELL, CLOTHIER e BALLS, 1986; DE ANGELIS et al., 1986; SAOTOME, MORITA e UMEDA, 1989; NOSER, 1991; SASAKI, et al. 1992; HUSOY, SYVERSEN e JENSSEN, 1993).

A verificação da viabilidade celular pelo uso de corantes vitais é um dos parâmetros empregados e dentre os mais citados na literatura encontramos o brometo de 3 (4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5 difeniltetrazólio (MTT) e o vermelho neutro (3-amino-7-dimethylamino-2-methylphenazine hydrochloride). O MTT é um sal amarelo solúvel, metabolizado pela succinato desidrogenase presente na mitocôndria, transformando-se em um produto azul insolúvel. O vermelho neutro em pH fisiológico passa facilmente através da membrana plasmática e se concentra no interior dos lisossomos. A perda deste gradiente de pH por mortalidade/morbidade da célula ou a perda da permeação da membrana inibe a incorporação destes corantes (HARBELL et al., 1997).

Uma das primeiras metodologias descritas para avaliação *in vitro* foi sugerida por ROSENBLUTH et al. (1965), que propuseram o teste da biocompatibilidade para avaliar plásticos empregados em artigos médico-hospitalares. Neste ensaio os materiais eram colocados diretamente sobre uma monocamada de células de mamífero e após 24 horas estas células eram observadas para verificar se havia ou não a presença de algum efeito tóxico. No mesmo ano, GUESS et al. (1965) descreveram o método de difusão em ágar, onde a monocamada celular era sobreposta por uma camada de ágar e os materiais a serem testados eram colocados sobre esta camada evitando assim, os problemas apresentados quando colocados diretamente em contato com a monocamada celular.

COMBIER e CASTELLI. (1992) compararam o teste de irritação ocular de Draize e o método de difusão em ágar utilizado como alternativo. Algumas modificações no protocolo original do método *in vitro* foram introduzidas, a lise em relação à toxicidade foi definida por um método planimétrico, onde o tamanho da área das células mortas é desenhado em papel, que após ser pesado pode fornecer quatro classificações diferentes. Neste estudo, os resultados foram agrupados em duas classes, designadas como não irritante e irritante e a correlação observada entre os dois métodos foi de 86% de concordância. O método de difusão em ágar, segundo os autores pode ser incluído na bateria de testes para avaliar o potencial de irritação dos produtos cosméticos.

No início da década de 80, MOSMANN (1983), BORENFREUD e PUERNER (1984) descreveram outra técnica para quantidades elevadas de amostras. Nesta técnica, as células são semeadas em microplacas e a viabilidade celular é avaliada por métodos colorimétricos, utilizando a redução do MTT ou a incorporação do vermelho neutro, os quais são quantificados por espectrofotometria. Esta técnica é rápida e quantitativa, pois permite avaliar várias concentrações do produto e calcular a concentração que causa 50% de morte celular. Desde então, vários estudos comparando o uso do vermelho neutro com o MTT ou estudos utilizando um destes corantes têm sido realizados para a determinação do índice médio de citotoxicidade de muitas substâncias (BORENFREUD e PUERNER 1985; HOCKLEY e BAXTER, 1986; BORENFREUD, BABICH e MARTIN-ALGUACIL, 1988; BABICH e BORENFREUD, 1992; TSUTSUI et al., 1994; OLIVIER et al., 1995; BABICH e BABICH, 1997).

CHIBA, KAWAKAMI e TOHYAMA (1998) desenvolveram um estudo, onde analisaram na mesma célula a viabilidade e o crescimento celular usando simultaneamente vermelho neutro, MTT e cristal violeta. O método pode ser útil na avaliação da citotoxicidade de substâncias mediadas por diferentes mecanismos, levando a diferentes respostas e ainda, o uso de vários tipos de avaliação evitaria resultados duvidosos. Estudos comparando simultaneamente a viabilidade e o crescimento celular utilizando os corantes vermelho neutro e o *amino black* respectivamente, mostraram boa correlação com a combinação dos dois métodos no mesmo ensaio, resultando em informações tanto sobre a viabilidade como sobre o número de células (CIAPETTI et al., 1996).

Com o propósito de se encontrar um protocolo que substituísse os ensaios *in vivo* vários outros modelos foram desenvolvidos, dentre eles os chamados organotípicos, os quais empregam órgãos isolados do animal, mantidos por curto período de tempo *in vitro* preservando suas funções fisiológicas e bioquímicas. Os mais conhecidos são ensaios com olho isolado de coelho (IRE), olho isolado de galinha (CEET), opacidade e permeabilidade de córnea bovina (BCOP) e cristalino bovino. Todos estes métodos foram elaborados com o propósito de selecionar e avaliar o potencial irritante de

varias substâncias, antes de serem aplicadas no método tradicional de irritação ocular de Draize (CHAMBERLAIN et al., 1997).

No estudo realizado por CHAMBERLAIN et al. (1997), concluiu-se que os métodos de olhos isolados e o BCOP podem ser usados para seleção prévia de substâncias severamente irritantes, antes da sua avaliação *in vivo*. O BCOP é o mais recente dentre os ensaios organotípicos e, apesar de apresentar uma boa correlação com os ensaios *in vivo*, seu uso como metodologia seletiva deve ser prudente, devido aos resultados falso-negativos apresentados. Este aspecto foi discutido por outro autor que sugere ajustes no protocolo (GAUTHERON et al., 1994). COOPER et al. (2001) demonstraram que o BCOP é menos sensível que o IRE, talvez devido ao maior número de camadas epiteliais no olho do boi em relação ao encontrado na córnea do coelho.

BRUNER et al. (1998) modificaram o protocolo original do BCOP, no qual as amostras de produtos cosméticos passaram a ficar em contato com a córnea por 24 horas e depois eram novamente aplicadas por quatro vezes durante mais 24 horas. Concluíram que este protocolo pode fornecer informações úteis no processo de desenvolvimento do produto com o objetivo de avaliar o efeito tóxico aditivo e/ou sinérgico.

JESTER et al. (2001), em seus estudos sobre os mecanismos de lesão da córnea, avaliaram o processo de irritação ocular utilizando córnea de coelho cultivada *in vitro*. O modelo apresentou boa correlação com os testes *in vivo* e facilitou o conhecimento dos mecanismos de danos na córnea causados por substâncias promotoras de diferentes graus de irritação. Este conhecimento pode ainda, ser aplicado no desenvolvimento de modelos alternativos para avaliação de irritação ocular.

Sistemas organotípicos, utilizando membrana córion-alantóica de ovos embrionados de galinha, resultaram em dois tipos de protocolos, o CAMVA desenvolvido por pesquisadores americanos que usavam ovos embrionados de 10 a 14 dias e o HET-CAM desenvolvido por pesquisadores alemães com ovos embrionados de nove dias. Estes protocolos foram baseados na observação da

vascularização da membrana córion-alantóica que é praticamente similar àquela dos tecidos da mucosa ocular. No CAMVA os parâmetros de avaliação são os efeitos vasculares como hemorragia, no HET-CAM além destes efeitos vasculares observa-se a desnaturação de proteínas (SPIELMANN et al., 1997).

Os estudos realizados por SPIELMANN et al. (1997) mostram que o protocolo do HET-CAM prediz melhor o método *in vivo*, para avaliar agentes tensoativos ou formulações baseadas nestes compostos, enquanto o CAMVA tem melhor desempenho com formulações alcoólicas. Estes modelos muitas vezes geram polêmica, já que em alguns países os ovos embrionários de 14 dias são incluídos na categoria de experimentos *in vivo* (BAGLEY et al, 1992a)

Métodos baseados nas funções celulares são também utilizados, tais como o teste da passagem de fluoresceína e o teste da medida do metabolismo celular. O teste da passagem de fluoresceína reflete os aspectos funcionais das células epiteliais como barreira, nas regiões das ligações intercelulares e na integridade da membrana plasmática. Neste teste, as linhagens celulares mais utilizadas são a MDCK (cultura de células de rim de cachorro) e a NHEK (cultura de células de queratinócitos humanos) porque mantêm estas funções *in vitro*. O teste do metabolismo celular é realizado por meio de um aparelho que detecta alterações metabólicas celulares semelhantes à resposta local, das células oculares, frente aos produtos irritantes. Muitas linhagens celulares têm sido usadas para esta medida de atividade metabólica. Os estudos realizados por BOTHAM et al. (1997) indicam que estes testes podem ser utilizados como substitutos do teste de irritação ocular de Draize para irritantes severos e que respondem melhor a determinados tipos de formulações. Os autores sugerem a necessidade de mais estudos intra e interlaboratoriais para avaliar a reprodutibilidade destes métodos.

CLOTHIER et al. (1999) desenvolveram um protocolo utilizando o teste de passagem de fluoresceína combinado com o método de viabilidade celular utilizando o corante azul de alamar. O objetivo foi avaliar a resposta irritante e o perfil de recuperação do dano ocasionado nas células, simulando os mesmos

acontecimentos e os mesmos valores observados no protocolo de Draize. A combinação dos efeitos iniciais e a taxa de recuperação permitiram discriminar o potencial de irritação das substâncias e a sua concentração.

Como alternativo ao teste de irritação ocular de Draize, a In Vitro International, Inc (USA) desenvolveu o Sistema Eytex que consiste de múltiplos protocolos, cada qual específico para um tipo de amostra. Este sistema é baseado nas respostas físicas e bioquímicas de um conjunto de macromoléculas, a qual consiste em uma matrix protéica, que produz turbidez similar à opacidade da córnea em resposta a irritantes químicos. Estudos revelam que a maior vantagem deste sistema é a habilidade de testar vários tipos físicos de materiais, sendo também rápido e barato, apresenta ainda, boa correlação com o método de Draize, segundo os resultados obtidos em vários laboratórios americanos (CADE, 1990; GORDON, 1992; CURREN et al., 1997). Devido às vantagens apresentadas, em 1989, foi proposta a sua inclusão na Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association (CTFA) e na Farmacopéia Americana (USP) (GORDON, KELLY e REALICA, 1991).

Sistemas alternativos como o Microtox estão disponíveis comercialmente. Bactérias luminescentes são usadas como alvo e a medida da redução de luminosidade como indicador de toxicidade. Este método é proposto como pré-triagem para alguns produtos e para outros mostra-se inadequado (CURREN et al., 1997)

Nos testes de pele-equivalente que são modelos de culturas tridimensionais de fibroblastos e queratinócitos humanos, vários parâmetros podem ser observados, tais como: viabilidade com MTT ou vermelho neutro, PGE2 (prostaglandina) como medida de resposta inflamatória e dosagem de LDH (lactato desidrogenase). Este tecido construído *in vitro* é estratificado, mas não corneificado e por isso se assemelha ao epitélio humano da córnea ou conjuntiva. Foi demonstrada ainda, uma boa correlação com os ensaios de irritação *in vivo* (CURREN et al., 1997; LAWRENCE, 1997; ROGUET et al., 1998).

Diferentes metodologias têm sido propostas como substitutas aos testes de Draize, desta forma muitos estudos comparando-as vêm sendo realizados. Alguns autores procuram relacionar todos os eventos clínicos que ocorrem na córnea e na conjuntiva durante o processo de irritação ocular (ROUGIER et al., 1994). Entretanto, em decorrência da complexidade dos efeitos biológicos, foi proposto que sejam utilizadas varias metodologias, baseadas nas alterações bioquímicas que cada substância pode causar aos tecidos e vasos sanguíneos (KOJIMA et al., 1995).

Vários autores comparam diferentes metodologias com os resultados dos testes de irritação ocular. Dentre as metodologias foram consideradas diferentes linhagens celulares e os resultados comparados com distintos métodos *in vitro*, tais como HET-CAM, BCOP, hemólise de células vermelhas do sangue, Microtox, Eytex, entre outros. Após a avaliação dos resultados foi sugerida a utilização de uma bateria de testes para predizer melhor o potencial irritante, pois cada método reflete determinada etapa do efeito ou aplica-se mais adequadamente a determinado grupo de substâncias (ITAGAKI et al., 1991; BAGLEY et al., 1992a; LEWIS, MCCALL e BOTHAM, 1993; O'BRIEN et al., 1994; ROUGIER et al., 1994; EARL et al., 1995; KOJIMA et al., 1995; VIAN et al., 1995). Na maioria destes estudos, o produto avaliado caracteriza-se por ser um agente tensoativo, utilizado como ingrediente de diferentes formulações de xampus, sabonetes líquidos e outros. Tais produtos são, na maioria das vezes, os responsáveis pela irritação no olho do coelho.

ROGUET e SCHAEFER (1997) fizeram uma revisão sobre vários tipos de células cultivadas *in vitro* e culturas de pele reconstituídas. Segundo os autores, a evolução das técnicas de culturas celulares poderá contribuir muito para a aplicação nos estudos fármaco-toxicológicos *in vitro*, proporcionando o refinamento de métodos alternativos aos animais de laboratório.

MAJMUDAR e SMITH (1998) compararam vários tipos de células da pele utilizadas nos testes *in vitro*. Fizeram referências aos modelos tridimensionais da epiderme e derme humana como sistemas *in vitro* eficazes

para a detecção bioquímica e histológica de irritação, corrosão e fototoxicidade da pele, apesar de serem dispendiosos e de difícil manutenção.

GOLDBERG (1991) propõe o “Processo de Delineamento”, o qual facilitará a incorporação dos testes de toxicidade *in vitro* na avaliação de risco. Neste processo, a primeira etapa consiste da busca na literatura sobre as propriedades físico-químicas das substâncias avaliadas, a segunda na utilização dos testes *in vitro* para selecionar a substância que apresenta toxicidade mínima e a terceira traduz-se em complementar a avaliação com os testes *in vivo*. Tal estratégia pode ser utilizada na formulação de novos produtos, resultando em economia de tempo e custo durante a pesquisa e o desenvolvimento.

Os sistemas *in vitro* são ferramentas importantes na avaliação de risco quando usadas para complementar outros testes (HUGGETT et al., 1996). Algumas indústrias de cosméticos utilizam os métodos alternativos juntamente com os bancos de dados e o sistema QSAR durante o processo de avaliação de risco, com o objetivo de reduzir o número de animais (LOPRIENO et al., 1995). Nestes trabalhos fica claro que dois pontos são importantes, a combinação de métodos alternativos para categorias específicas de cosméticos e a necessidade de desenvolver pesquisas básicas para avaliar a segurança *in vitro* de novas substâncias.

Em 1993, o Interagency Regulatory Alternative Group (IRAG) conduziu um Workshop com a intenção de examinar a importância dos métodos alternativos quando comparados com os teste de irritação ocular de Draize. Neste estudo foram identificadas cinco categorias de métodos agrupados com base em princípios gerais, biológicos ou bioquímicos. Os grupos de trabalho formados foram de modelos organotípicos, testes baseados na membrana córion-alantóica, testes baseados na função celular, testes de citotoxicidade e outros sistemas. Cerca de 26 diferentes tipos de métodos foram revistos, concluindo-se que os dados eram insuficientes para decidir pela total substituição do teste *in vivo*. Os métodos alternativos podem, porém ser usados nas indústrias como triagem no processo de avaliação de risco dos

produtos em desenvolvimento e os resultados de alguns modelos podem levar a redução do número de animais, quando conduzidos sob condições bem definidas. Recomendações adicionais foram sugeridas, tais como: aumentar o número de pesquisas básicas voltadas para identificação de mecanismos alvo de resposta da injúria ocular humana; estabelecer banco de dados com substâncias padrão; selecionar baterias de testes para identificar substâncias novas; identificar métodos promissores para facilitar os estudos de validação; dar prioridade à padronização internacional (BRADLAW e WILCOX, 1997).

Com o intuito de fornecer para as indústrias de cosméticos informações suficientes sobre o desempenho dos métodos alternativos, a CTFA desenvolveu um programa para avaliação destes métodos. Este programa foi dividido em três fases e os materiais testes foram formulações experimentais que representavam uma variedade de tipos de produtos cosméticos e produtos de cuidados pessoais. Na fase I foram avaliados produtos com formulações hidroalcoólicas, na fase II produtos com formulações óleo/água e na fase III formulações contendo agentes tensoativos. O programa teve por objetivo a avaliação das limitações e da aplicabilidade de cada método alternativo, mas não sua validação. Ainda assim, todos os cuidados, desde a seleção, a distribuição das amostras até a utilização dos procedimentos operacionais padrão foram observados, para garantir a uniformidade dos ensaios.

A correlação *in vivo/in vitro* foi avaliada empregando-se a análise da sensibilidade, especificidade e análise estatística. A maioria dos métodos utilizados apresentaram boa sensibilidade e especificidade, com exceção dos métodos de liberação de vermelho neutro e da dosagem de lactato desidrogenase. Quanto à análise estatística, foi aplicada somente para os métodos que apresentavam relação dose-efeito, sendo observado que o valor de irritação ocular pode ser determinado com maior precisão nas formulações do tipo óleo/água que nas formulações hidroalcoólicas. Também na fase III, quando foram utilizadas formulações com agentes tensoativos, tornou-se evidente que a relação entre os valores de irritação ocular e os valores *in vitro* era bem definida (GETTINGS et al., 1994; GETTINGS et al., 1996a).

Com base nos resultados obtidos no estudo desenvolvido pelo CTFA, LORDO et al. (1999) discutiram que embora a preocupação fundamental seja quanto ao desempenho dos métodos alternativos, a variabilidade dos resultados do teste de Draize deve ser considerada. Esta variação dificulta a validação dos métodos alternativos, uma vez que o objetivo é predizer o grau de irritação do olho do coelho.

No início da década de 90, um grupo de pesquisadores, financiados pelo Ministério da Saúde do Japão, propôs um projeto intitulado “Study on Test Methods to Evaluate the Safety of Cosmetics Containing New Ingredients”. O objetivo do projeto foi investigar a possibilidade de substituir os testes *in vivo* de Draize por métodos *in vitro*. Após rever os métodos alternativos para ingredientes de cosméticos, decidiu-se conduzir um estudo de validação interlaboratorial. Os métodos foram selecionados com base nos princípios científicos, considerações éticas e na possibilidade do método ser usado no Japão. O estudo foi dividido em três etapas e 12 métodos foram aplicados para o mesmo grupo de 38 substâncias (CHIBA et al., 1999; OKUMURA et al., 1999; TANI et al., 1999; UCHIYAMA et al., 1999). Todos os resultados gerados pelo projeto foram avaliados e comparados por OHNO et al. (1999), que discutiram as vantagens e as desvantagens de cada metodologia, juntamente com os seus coeficientes de variação interlaboratorial e suas correlações com o método *in vivo*. Estes autores concluíram que não é indicado um único método para avaliar todos os tipos de substâncias, enquanto vários métodos podem predizer melhor o potencial de irritação ocular, desde que usados com claro entendimento de suas características. Por exemplo, os testes de citotoxicidade proporcionam informações a respeito dos efeitos tóxicos dos mecanismos bioquímicos básicos da célula, enquanto os testes de membranas cório-alantóica avaliam reações nos vasos sanguíneos, e assim distintos métodos se complementam.

Com o mesmo propósito de validar os métodos alternativos ao teste de Draize, uma comissão formada pelo governo britânico e membros da comunidade europeia, “European Commission/British Home Office” (EC/HO) desenvolveram um estudo interlaboratorial com o objetivo de sugerir às

autoridades reguladoras um ou mais métodos a serem adotados como substitutos dos ensaios *in vivo*. Sessenta substâncias foram avaliadas por nove métodos e quatro etapas foram determinadas. Os métodos deveriam identificar todas as substâncias severamente irritantes, substâncias irritantes pertencentes a uma classe específica, todos os níveis de irritação das substâncias, sem observar a classe química e todos os níveis de irritação das substâncias pertencentes a classes químicas específicas. Após avaliarem todos os resultados, concluiu-se que alguns métodos poderiam prever o potencial de irritação ocular, mas com precisão muito baixa e utilidade prática questionável. A baixa precisão poderia estar relacionada com a escolha das substâncias testes, com os protocolos usados no estudo e com a variabilidade dos dados *in vivo*. A comissão sugere que para solução deste problema mais pesquisas básicas sejam desenvolvidas (BALLS et al., 1995).

A “European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association” (COLIPA) órgão que representa a indústria de cosméticos, desenvolveu um estudo de validação dos métodos alternativos com o objetivo de avaliar sua habilidade em prever o potencial de irritação ocular. Neste estudo 10 diferentes métodos alternativos foram avaliados para analisar 55 amostras, sendo 23 ingredientes e 32 formulações. Os resultados preliminares indicam que os métodos alternativos utilizados não poderiam ser considerados como válidos para substituir o teste de Draize, pois nenhum apresentou confiabilidade em demonstrar as variações da escala de irritação ocular (BRANTOM et al., 1997).

Os detalhes sobre determinados métodos, do estudo realizado pela COLIPA, foram comentados em publicações posteriores. SOUTHEE et al. (1999) descreveram os resultados do ensaio de tecido equivalente (TEA) e verificaram que apesar deste método apresentar boa correlação com os resultados *in vivo* e não ser limitado aos materiais líquidos e solúveis, não apresentou boa reprodutibilidade. As técnicas de aplicação das amostras, o manuseio e os tempos utilizados pelos dois laboratórios onde este método foi realizado podem estar relacionados com as diferenças observadas.

COURTELLEMONT et al. (1999) utilizaram o Predisafe, um protocolo disponível comercialmente para avaliar a citotoxicidade, utilizando a linhagem celular SIRC e a medida de liberação do vermelho neutro (NRR). As análises estatísticas mostraram que o método pode prever o potencial irritante de uma grande categoria de produtos acabados. Ainda, associado à sua facilidade de uso oferece vantagens relevantes para ser utilizado na rotina das indústrias de cosméticos, como método de triagem na avaliação da irritação ocular.

LOVELL (1999), com o objetivo de diminuir a variabilidade dos resultados *in vivo* durante o estudo de validação dos métodos *in vitro* da COLIPA, buscou a correlação entre os valores de irritação ocular e os valores individuais dos danos observados nos tecidos oculares dos coelhos, obtidos na avaliação das 55 amostras utilizadas. O autor realizou uma análise estatística utilizando o método de multivariáveis e concluiu que há poucas evidências de que os valores individuais dos danos no tecido possam melhorar a habilidade de prever o potencial de irritação ocular pelos métodos alternativos.

Métodos que adotam discos de pele de coelho, mantidos *in vitro* por até sete dias, para avaliar substâncias irritantes ou corrosivas foram desenvolvidos com o objetivo de substituir os testes de irritação cutânea de Draize. O modelo é aplicável na avaliação da toxicidade dérmica, podendo utilizar vários parâmetros de avaliação (VAN DE SANDT, RUTTEN e KOETER, 1993; RUTTEN e VAN DE SANDT, 1994; VAN DE SANDT e RUTTEN, 1995).

Segundo DICKSON et al. (1993), as culturas de queratinócitos podem ser importantes na avaliação do potencial de irritação dérmica. A atividade da fosfatase alcalina, tomada como parâmetro pode ser considerada como indicador sensível, principalmente quando a substância testada altera as funções das membranas dos lisossomos.

Até o momento não existem métodos validados para substituir os ensaios de irritação cutânea. No entanto, o ECVAM concluiu, para produtos corrosivos, a validação de dois métodos *in vitro*. Neste estudo, em que foram analisados quatro métodos, o objetivo foi verificar a capacidade de discriminar entre substâncias corrosivas e não corrosivas, além de identificar corretamente

certas classes de substâncias. O primeiro foi o teste de resistência elétrica transcutânea (TER), que utiliza discos de epiderme de rato para avaliar a integridade do estrato córneo, afetada após exposição às substâncias corrosivas. O segundo teste foi o Corrositex que emprega uma matriz de colágeno reconstituída, elaborada para apresentar propriedades físico-químicas semelhantes à da pele de rato, que em contato com substâncias corrosivas é alterada. O terceiro e o quarto testes foram o EPISKIN e o SKIN², modelos de peles tridimensionais reconstituídas, onde a ação corrosiva é avaliada pela diminuição da viabilidade celular, constatada pela redução do MTT.

Cada método foi avaliado em três laboratórios e frente a 60 substâncias de diferentes categorias de corrosividade, já classificadas *in vivo* e com informações de relação estrutura-atividade. Todos os testes apresentaram reprodutibilidade intra e interlaboratorial, mas somente os testes de TER e o EPISKIN atenderam aos principais objetivos do estudo, discriminando as substâncias corrosivas das não corrosivas. O Corrositex só identificou alguns tipos de substâncias e o SKIN² não evidenciou resultados que permitissem sua validação (BARRAT et al., 1998; FENTEM et al., 1998; BARRELA, ROQUE e SILVA, 2002).

O ECVAM, devido ao sucesso da validação dos métodos alternativos para avaliação de substâncias corrosivas, apontou a necessidade urgente de validar testes *in vitro* para avaliar irritação cutânea. Com este objetivo, FENTEM et al. (2001) elaboraram um estudo de pré-validação, no qual foram avaliados cinco métodos. Observaram que dentre os métodos utilizados, os de pele equivalente, EpiDERM e EPISKIN apresentaram a melhor reprodutibilidade intralaboratorial, mas só o EPISKIN foi aceitável quanto a reprodutibilidade interlaboratorial. Concluíram que nenhum dos métodos utilizados poderia ser indicado no estudo formal de validação, mais estudos deveriam ser feitos para melhorar os protocolos e os modelos de predição dos testes EPISKIN e EpiDERM.

ROBINSON et al. (2002) fizeram uma revisão de todos os resultados obtidos nos estudos de alguns métodos alternativos utilizados para avaliação do potencial de corrosão e irritação da pele. Neste trabalho verificaram que há várias ferramentas básicas disponíveis para que avaliações seguras de corrosão/irritação cutânea possam ser conduzidas sem a realização de novos testes em animais.

O grande desafio, atualmente, é a validação dos métodos alternativos, que tem gerado muita preocupação e discussão, tanto por parte da comunidade científica quanto dos órgãos reguladores. A utilização de métodos validados busca garantir o mesmo nível de proteção oferecido pelos métodos oficiais.

Sendo assim, alguns autores baseiam seus estudos na definição de que validação “é um processo no qual os parâmetros como confiança e relevância de um método alternativo são estabelecidas para um propósito particular”. A confiança refere-se às condições de reprodutibilidade e capacidade com que um método pode prever o resultado *in vivo*. O método, para ser incluído no estudo de validação requer estabelecimento de certos elementos, como a relevância, procedimentos operacionais padrão e as medidas de confiança que serão confirmadas durante o processo de validação (BRUNER et al., 1996)

A importância da validação, pré-validação, do conceito três Rs e outras questões foram abordadas por BALLS e FENTEM (1999), na regulamentação dos testes toxicológicos “*in vitro*”. A validação deve ser vista como uma etapa essencial no desenvolvimento do teste e sua aceitação não deve ser encarada como barreira, mas como uma oportunidade para acelerar o uso dos testes *in vitro* na avaliação de risco dos produtos de uso humano ou que possam causar danos no meio ambiente (BALLS, 1995).

SPIELMANN e LIEBSCH (2001) fazem referências à evolução dos estudos de validação, comentam que eles têm custo elevado e consomem um tempo médio de 10 anos. Segundo os autores, o progresso e a aceitação internacional, dos testes de toxicidade *in vitro*, só será alcançado se a Europa,

Japão e os Estados Unidos encontrarem maneiras de coordenar os estudos. Comentam ainda, que os protocolos elaborados pelo ECVAM e OECD são os mais apropriados para a validação destes testes. Estes protocolos observam alguns critérios básicos com relação ao método avaliado, tais como a relação entre a resposta *in vivo* e *in vitro*, demonstração de variabilidade, repetibilidade e reprodutibilidade, desempenho do teste frente a substâncias de referência e, ainda, que seja de domínio público (LOUEKARI, 1996).

3 - OBJETIVOS

O presente trabalho teve como metas:

- Estudar a correlação entre os testes *in vitro* e *in vivo*.
- Comparar a sensibilidade das diferentes linhagens celulares utilizadas, NCTC clone 929, SIRC e FPC-IAL.
- Verificar a relação entre a origem das linhagens celulares e o tecido alvo utilizado no teste *in vivo*.
- Avaliar a qualidade e o grau de segurança dos produtos cosméticos nacionais.

4 - MATERIAL E MÉTODO

4.1 Amostras

Neste estudo foram utilizadas amostras constituídas de diferentes produtos cosméticos de fabricação nacional, disponíveis no mercado, tais como: batons sem e com fator de proteção solar, sombras, lápis ou delineadores para os olhos, máscaras para os cílios, bases faciais, *blushes*, pós compactos e sabonetes líquidos.

Para cada grupo de produtos foram utilizadas no mínimo 15 amostras que diferiam entre si quanto à cor, alguns ingredientes e/ou marca do fabricante. No grupo de sabonetes líquidos foram consideradas, além de produtor e composições distintas, formulações de uso infantil e adulto.

As quantidades das amostras analisadas por grupos de produtos foram:

- 60 Batons
- 18 Batons com protetor solar
- 16 *Blushes*
- 15 Pós compactos
- 15 Bases faciais
- 33 Sombras para os olhos
- 15 Máscaras para os cílios
- 15 Lápis ou Delineadores para os olhos
- 17 Sabonetes líquidos (4 infantis)

4.2 Avaliação de Segurança Biológica

Visando investigar a toxicidade do produto, as amostras foram avaliadas por metodologias *in vivo* e *in vitro*.

4.2.1 Avaliação *In Vivo*

Os métodos utilizados, nos testes *in vivo*, variaram de acordo com a região de uso dos produtos cosméticos. Nos produtos usados na região dos olhos empregou-se o método de irritação ocular, já para os labiais utilizou-se o método de irritação cutânea primária e irritação de mucosa oral e para os faciais empregou-se apenas o método de irritação cutânea primária.

Os experimentos foram realizados em coelhos albinos, de ambos os sexos, da raça Nova Zelândia com peso corpóreo de 2 a 2,5 Kg, adquiridos da CRIEX Cunicultura Ltda. e mantidos no biotério do Instituto Adolfo Lutz. Antes de iniciar os testes, os animais foram examinados pelo veterinário responsável e selecionados os que não apresentaram qualquer problema nos olhos, pele, pêlo e mucosa. Os animais sadios foram escolhidos aleatoriamente, mantidos em gaiolas individuais identificadas, com fornecimento de ração e água, em sala a temperatura de $22 \pm 3^\circ \text{C}$, iluminação artificial e umidade relativa entre 30% a 70%. Durante todo o período de execução do ensaio, desde a aplicação da amostra até a leitura, o animal foi tratado e manuseado adequadamente.

Os procedimentos, a seguir descritos, foram baseados no trabalho desenvolvido por Draize (DRAIZE, WOODARD e CALVERY, 1944).

4.2.1.1 Teste de Irritação Cutânea primária

Este método foi utilizado para avaliar as amostras de batons com e sem protetor solar, *blushes*, pós compactos, bases faciais e sabonetes líquidos. Para realizar cada ensaio, seis coelhos albinos foram tricotomizados em quatro áreas dorsais (duas superiores e duas inferiores) de $(2,5 \times 2,5) \text{ cm}^2$ cada, 24 horas antes do início do teste. Na área superior e inferior lado direito foram feitas duas ranhuras paralelas e longitudinais com agulhas de injeção

esterilizadas, com cuidado para evitar o sangramento do animal. As áreas do lado esquerdo do animal permaneceram intactas.

As amostras líquidas ou pastosas foram utilizadas em sua forma íntegra, enquanto que as sólidas foram trituradas na proporção de 0,5 g/0,5 mL de água destilada. Foram aplicados nas áreas superiores, em relação a cabeça, volumes de 0,5 mL do produto, com auxílio de uma seringa e massageando o local levemente. As áreas inferiores serviram de controle. Cada área de (2,5 x 2,5) cm² foi coberta com pedaços de gaze estéril. A seguir toda a região dorsal foi envolvida com nova camada de gaze estéril, que foi fixada ao pêlo do animal com fita adesiva hipoalergênica. Depois de 24 horas, o *patch* oclusivo foi retirado e a leitura de edema e eritema feita após 24 e 72 horas da aplicação única da amostra.

Procedeu-se a leitura em duas etapas, primeiro visualmente para constatação da presença do eritema. Este foi classificado, segundo a tabela de Draize, em grau 0 quando a pele se apresentava normal e de cor branca, grau 1 quando o eritema foi leve com pele avermelhada em toda área de aplicação do produto, grau 2 quando o eritema foi bem definido com pele vermelha, grau 3 quando eritema foi moderado com pele apresentando vermelhidão intensa e difusa e grau 4 quando o eritema foi severo com pele vermelha escura e leve formação de escaras. A segunda etapa foi a verificação da presença de edema, obtida pela medida de espessura da pele dobrada, com auxílio de um paquímetro. O valor do edema foi calculado pelas leituras das áreas nas quais as amostras foram aplicadas menos a das áreas controles dividido por dois. O cálculo foi feito na primeira leitura, decorridas 24 horas da aplicação da amostra e na segunda leitura, após 72 horas. Os valores encontrados foram classificados, em grau zero quando da ausência de edema, grau 1 quando o edema foi muito leve e estava entre 0,25 e 0,49 mm, grau 2 com edema leve entre 0,5 e 0,74 mm, grau 3 quando o edema foi moderado e estava entre 0,75 e 1 mm e grau 4 com edema severo e valor maior que 1 mm, podendo às vezes, ultrapassar a área de aplicação do produto.

Após obtenção dos dados acima, foi calculada a média aritmética das graduações dos edemas mais eritemas dos seis coelhos, nas leituras de 24 e 72 horas e dividida por quatro, referente ao número de áreas utilizadas. O valor encontrado representa o índice de irritação primária (IIP), tendo sido o produto classificado como não irritante quando o valor era de 0 a 0,9 e como irritante para valores de 1,0 a 8,0.

4.2.1.2 Teste de Irritação Ocular

Este método foi utilizado para avaliar as amostras de sombras para os olhos, máscaras para os cílios, lápis ou delineadores para os olhos e sabonetes líquidos. Para cada ensaio cinco coelhos albinos foram utilizados. As amostras no estado sólido foram trituradas na proporção de 0,1 g/0,1 mL de água destilada estéril, enquanto as líquidas e pastosas foram utilizadas na sua forma íntegra.

Para a aplicação da amostra a pálpebra inferior do olho direito foi cuidadosamente tracionada, formando o saco conjuntival, onde com auxílio de uma seringa foi aplicado 0,1 mL do produto. Em seguida as pálpebras foram mantidas unidas por 30 segundos, massageando-se o olho do animal para permitir o contato uniforme com o produto. O olho esquerdo serviu de controle.

Os efeitos causados à conjuntiva, córnea e íris foram observados depois de decorridas 24, 48, 72 horas e no final do 7º dia, após a aplicação do produto. As avaliações das reações oculares foram baseadas na escala de Draize, onde estão descritas as graduações atribuídas as reações oculares, como: hiperemia, quemose, secreção, irite e opacidade (Tabela 1) (DRAIZE, WOODARD e CALVERY, 1944).

Tabela 01 - Graduações das reações observadas nos diferentes tecidos de acordo com a escala de Draize

CÓRNEA:	
A. Opacidade - Grau de Densidade	
Sem opacidade	0
Área difusa ou disseminada da íris visíveis (perda do brilho)	1
Áreas translúcidas facilmente discerníveis, detalhes da íris ligeiramente obscuros	2
Área opalescente, nenhum detalhe da íris visível e tamanho da pupila pouco discernível	3
Opaca, íris invisível	4
B. Área da Córnea Envolvida	
Um quarto ou menos, mas não zero	1
Maior de um quarto e menor do que a metade	2
Maior que a metade e menor do que três quartos	3
Maior do que três quartos até a área total	4
Graduação TOTAL = (A X B) X 5	80
C. ÍRIS	
Normal	0
Raias com congestão, edema, injeção circuncorneal (qualquer uma ou todas essas alterações ou a combinação de algumas delas) íris ainda reage a luz (reação lenta é positiva)	1
Nenhuma reação à luz, hemorragia, destruição (qualquer uma ou todas essas)	2
GRADUAÇÃO TOTAL = C X 5	10
CONJUNTIVA:	
D. Hiperemia (Palpebral e Bulbar)	
Vasos normais	0
Vasos definidamente injetados acima do normal	1
Vermelho intenso mais difuso e vasos não facilmente discerníveis	2
Vermelho escuro difuso	3
E. Quemose	
Ausência de edema	0
Algum edema acima do normal (incluindo a membrana nictitante)	1
Edema óbvio com eversão parcial das pálpebras	2
Edema com as pálpebras cobrindo a metade ao fechamento total do olho	3
Edema com pálpebras cobrindo de metade ao fechamento total do olho	4
F. Secreção	
Ausência de secreção	0
Qualquer quantidade diferente do normal	1
Secreção com umedecimento das pálpebras e pêlos adjacentes a estas	2
Secreção com umedecimento das pálpebras, pêlos e área considerável ao redor do olho	3
GRADUAÇÃO TOTAL = (D + E + F) X 2	20
TOTAL MÁXIMO	110

Após as leituras, o valor total de cada animal foi obtido e a média dos cinco coelhos, por período de leitura, foi calculada, resultando no índice de irritação ocular.

O produto foi considerado irritante quando três a cinco animais apresentaram reações positivas, quando só um animal apresentou reação positiva o produto foi considerado não irritante, mas quando somente dois animais apresentaram reações positivas, o produto foi retestado com o mesmo procedimento.

4.2.1.3 Teste de Irritação de Mucosa Oral

Os procedimentos, conforme a seguir descritos, obedeceram aos protocolos da Seção de Cosméticos do Instituto Adolfo Lutz.

Este método foi utilizado para avaliar todas as amostras de batons com e sem protetor solar, sendo que para cada ensaio foram utilizados seis coelhos albinos. As amostras foram processadas da mesma maneira que no teste de irritação cutânea primária e aplicadas diariamente, durante 10 dias consecutivos, na mucosa oral dos coelhos. A leitura foi feita em 24 horas a partir do 11º dia, após o início do teste, quando foi observado se houve ou não a presença de alguma irritação na mucosa e alteração do peso corpóreo dos animais.

O produto foi considerado irritante quando quatro a seis animais apresentaram reações positivas e não irritante quando em nenhum dos animais foi observado efeito, tanto na mucosa oral quanto no peso corpóreo. Quando um a três animais apresentaram reação positiva, o produto foi avaliado novamente.

4.2.2 Avaliação *In Vitro*

As avaliações *in vitro* foram feitas pela análise da citotoxicidade ou reatividade biológica em culturas celulares, tomando como parâmetro a viabilidade celular. Os métodos utilizados foram difusão em ágar (ASTM, 1983;

USP 22, 1990; ASTM, 1995) e captura do vermelho neutro (DOYLE, GRIFFITHS e NEWELL, 1994).

No método de difusão em ágar, a maioria das amostras foram avaliadas nas concentrações de 100% (sem diluição), 75%, 50%, 25% e 12,5%. Apenas os sabonetes líquidos foram testados nas concentrações de 100%, 10%, 1%, 0,1% e 0,01%. As amostras hidrossolúveis foram diluídas em solução salina tamponada (pH 7,2) e as demais foram diluídas em óleo de semente de algodão da Sigma (ISO, 1992).

O método de captura do vermelho neutro foi utilizado apenas para avaliar as amostras de sabonetes líquidos. As amostras foram testadas a partir de uma solução mãe 1% em solução salina tamponada (pH 7,2). A maioria dos sabonetes líquidos foram diluídos em Meio de Eagle com 5% de soro fetal bovino, de maneira a obter as concentrações finais de 0,1%, 0,075%, 0,05%, 0,0375% e 0,025%. O sabonete líquido identificado como amostra 11, foi analisado nas concentrações finais de 0,25%, 0,125%, 0,1%, 0,075%, e 0,05%.

Os ensaios foram realizados na Seção de Culturas Celulares do Instituto Adolfo Lutz (IAL), em capela de fluxo laminar vertical, por sua vez alojado em sala limpa, com sistema de filtro absoluto e pressão positiva. Todo o trabalho foi desenvolvido empregando material esterilizado e técnicas assépticas.

4.2.2.1 Culturas Celulares

Foram utilizadas as seguintes linhagens celulares: NCTC clone 929 (ATCC-CCL 1), células de tecido conjuntivo de camundongo; SIRC (ATCC-CCL 60), células de córnea de coelho, provenientes do ATCC e FPC-IAL, células fibroblásticas de pele de coelho, isolada por técnica de explante primário, na Seção de Culturas Celulares do Instituto Adolfo Lutz.

A linhagem celular NCTC clone 929 foi cultivada em meio mínimo de Eagle, suplementado com 0,1 mM de aminoácidos não essenciais, 1,0 mM de piruvato de sódio e 10% de soro fetal bovino, sem antibiótico (MEM c/ 10% SFB). As linhagens celulares SIRC e FPC-IAL foram cultivadas em partes

iguais de meio mínimo de Eagle e meio Leibovitz nº 15 com 15% de soro fetal bovino, sem antibiótico (MEM+L15 c/ 15% SFB).

A manutenção destas linhagens foi feita a 36 °C, em garrafas de 75 cm² ou 250 mL e repiques com intervalos médios de 72 horas. A dispersão da monocamada celular foi efetuada utilizando uma associação de tripsina 0,20% e versene 0,02% (ATV). Após a dispersão, as células foram novamente suspensas nos seus respectivos meios de cultura e distribuídas, tanto nas garrafas destinadas a manutenção como em placas de Petri e microplacas de 96 orifícios, que foram utilizadas durante a realização dos ensaios (PAUL, 1975; FRESHNEY, 1987; DOYLE, GRIFFITHS e NEWELL, 1994).

Todas as amostras foram analisadas empregando a linhagem celular NCTC clone 929. Ainda, as amostras usadas na região dos olhos foram testadas na linhagem celular SIRC e as usadas na região da pele e mucosa oral na linhagem FPC-IAL. Somente os sabonetes líquidos foram testados nas três linhagens celulares.

4.2.2.2 Método de Difusão em Ágar

As células foram semeadas em volumes de 5 mL em placas de Petri (60x15 mm), na concentração de $3,0 \times 10^5$ céls/ mL para as linhagens NCTC clone 929 e SIRC, e $3,5 \times 10^5$ céls/ mL para a linhagem FPC-IAL. A incubação foi realizada por 48 horas a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após este período, com a monocamada de células já formadas, o meio de cultura foi desprezado e adicionado volume de 5 mL de meio *overlay*, em cada placa de Petri. Este meio é composto de partes iguais de MEM duas vezes concentrado e ágar (BBL-Becton Dickinson) a 1,8% contendo 0,01% de vermelho neutro (Merck), como corante vital. No momento do uso o ágar foi fundido e misturado com o MEM, ambos à temperatura de 44 ± 1 °C. Discos de 0,5 cm de diâmetro, de papel de filtro de natureza comprovadamente atóxica, foram embebidos nas amostras ou nas diferentes concentrações das mesmas e posicionado sobre a camada de ágar, antes de sua solidificação completa. As placas de Petri foram incubadas novamente em estufa com 5% de CO₂ a 37 °C por 24 horas (GUESS et al., 1965; USP 22, 1990; ISO, 1992).

Como controles positivos foram utilizados fragmentos de látex e como controles negativos discos de papel de filtro, respeitando a dimensão de 0,5 cm de diâmetro para ambos. As amostras foram avaliadas em triplicata para cada linhagem celular.

As placas foram analisadas macroscopicamente e microscopicamente e a citotoxicidade foi constatada pela presença de um halo claro sob ou ao redor da amostra testada. Os diâmetros destes halos, quando presentes foram cuidadosamente medidos empregando paquímetro calibrado. A média das leituras dos diâmetros dos halos das três placas foi calculada e utilizada para avaliação da correlação com os ensaios *in vivo*.

Quando o objetivo era obter as graduações de reatividade biológica *in vitro* de acordo com o índice de zona (IZ), segundo a USP 25 (2002), utilizou-se a média dos diâmetros e desse valor subtraiu-se 0,5 cm, referente ao tamanho do disco de papel utilizado para embeber as amostras. O resultado foi dividido por dois para obter a medida da toxicidade ao redor da amostra. Este cálculo não foi realizado para as amostras que apresentaram halo de toxicidade somente sob o disco de papel.

A partir da medida da toxicidade, os índices de zona foram graduados de 0 a 4, onde o IZ=0 corresponde a ausência de efeito sob a amostra, IZ=1 alteração ou degeneração celular sob a amostra, IZ=2 halo claro somente sob a amostra, IZ=3 halo entre 0,5 e 1,0 cm ao redor da amostra, IZ=4 para halo claro maior que 1,0 cm (USP 23, 1995; USP 24, 1999; USP 25, 2002). As fotomicrografias foram realizadas em microscópio óptico marca ZEISS modelo Axioskop, com máquina fotográfica acoplada e filme Kodacolor 100 ASA.

4.2.2.3 Método de Captura de Vermelho Neutro

Suspensões das linhagens celulares NCTC clone 929, SIRC e FPC-IAL, nas concentrações de $2,5 \times 10^5$ células/ mL foram semeadas em volumes de 0,2 mL nas microplacas de 96 poços de fundo chato. Estas foram então incubadas por 24 horas, a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ para a formação da monocamada celular. Depois deste período, o meio de cultura foi desprezado e adicionado a cada poço 0,2 mL de meio contendo diluições das

amostras a serem testadas e dos respectivos controles. Todas as diluições das amostras e dos controles foram testadas em triplicata. As placas foram novamente incubadas em estufa com 5% CO₂ a 37 ° C por 24 horas.

Após o período de incubação o meio contendo as amostras foi desprezado e 0,2 mL de meio de Eagle sem soro, contendo 50 µg de vermelho neutro/ mL foi adicionado a cada poço. Seguiu-se a incubação das microplacas por três horas a 37 ° C para permitir a captação do vermelho neutro pelas células vivas. Este meio foi preparado 24 horas antes e mantido em estufa a 37 ° C durante a noite, sendo imediatamente antes do uso centrifugado a 1500 r.p.m. durante 15 minutos para eliminar os cristais formados. Decorrido o tempo de captura, o meio foi removido e as células lavadas duas vezes com 0,2 mL de PBS pré aquecido a 37 ° C e uma vez com 0,2 mL de solução aquosa a 40% de formaldeído e 1% de CaCl₂, para remover o corante não incorporado. Esta solução foi a seguir descartada e 0,2 mL de solução aquosa de 1% de ácido acético e 50% de etanol foi adicionada para extrair o corante. Após 10 minutos de agitação, as placas foram levadas para leitura da densidade óptica num leitor de microplacas da marca Organon Teknika Reader 530 com filtro de 540 nm (BORENFREUD e PUERNER, 1984; DOYLE, GRIFFITHS e NEWELL, 1994).

Como controle positivo foi utilizado extrato de fragmentos de látex e como controle negativo extrato de papel de filtro atóxico. Os extratos foram preparados em meio de Eagle com 5% SFB na proporção de 0,1 g de latex/ mL e 4 cm² de papel de filtro/ mL incubados a 37 ° C por 24 horas (USP 22, 1990; ISO, 1992). Após este período, o extrato do controle positivo foi diluído na proporção de 2:1 e considerado como solução mãe, o extrato do controle negativo foi utilizado diretamente. Os controles foram avaliados nas concentrações de 100%, 50%, 25%, 12,5% e 6,25%. O controle das células foi realizado adicionando-se apenas meio de Eagle com 5% de SFB.

A porcentagem de viabilidade celular foi obtida com a divisão da média da densidade óptica de cada diluição pela média da densidade óptica do controle de células multiplicado por 100. O índice de citotoxicidade IC₅₀ foi

calculado pela construção de uma curva dose-resposta obtida pela projeção da porcentagem de viabilidade celular em função da concentração da amostra utilizando o programa de computador Microsoft Excel.

4.3 Avaliação Estatística

A análise dos resultados foi efetuada para investigar a significância entre as variáveis estudadas. O grau de associação, entre estas variações foi medido utilizando-se o índice de correlação de Pearson (KLEINBAUM, KUPPER e MORGENTERN, 1982). A sensibilidade e a especificidade dos métodos *in vitro* foram calculadas de acordo com COOPER, SARACI e COLE (1979)

5 - RESULTADOS

5.1 Testes *In Vivo*

5.1.1 Irritação Cutânea Primária

Todas as amostras de batom, batom com protetor solar, *blush*, pó compacto e base facial mostraram-se não irritantes para a pele dos coelhos utilizados na avaliação.

Os sabonetes líquidos de uso adulto, identificados como amostras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 12, 13, 14, 15 e 16, quando avaliados na concentração de 100% (sem diluição) apresentaram resultado positivo, com índice de irritação primária (IIP) variando de 1,0 a 3,5. Os sabonetes líquidos de uso infantil, identificados como amostras 8, 9, 10 e 11 e o sabonete líquido de uso adulto, identificado como 17 apresentaram resultado negativo, pois os IIP obtidos foram inferiores a 0,90 (Figura 1).

Figura 01 - Índices de irritação cutânea das amostras de sabonetes líquidos quando avaliadas na concentração de 100%

Os valores médios de edema e eritema obtidos durante as leituras de 24 e 72 horas, após a aplicação das amostras de sabonetes líquidos podem ser observados na Tabela 2. Estes valores foram utilizados para o cálculo do IIP.

As amostras de sabonete líquido que apresentaram resultados positivos, na concentração de 100%, também foram avaliados na concentração de 10%, apresentando então resultados negativos.

Tabela 02 - Valores edema e eritema utilizados para o cálculo dos índices de irritação cutânea das amostras de sabonetes líquidos avaliadas na concentração de 100%

Amostra	Leitura 24 horas				Leitura 72 horas				IIP*
	Pele Inteira		Pele Esfolada		Pele Inteira		Pele Esfolada		
	Edema	Eritema	Edema	Eritema	Edema	Eritema	Edema	Eritema	
1	1,00	2,00	1,00	2,00	0,00	1,00	0,00	1,00	2,00
2	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	1,00
3	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	1,50
4	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	1,50
5	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	1,00
6	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	1,00
7	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	1,00
8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
9	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,33	0,00	0,33	0,66
10	0,00	0,66	0,00	0,33	0,00	0,16	0,00	0,16	0,33
11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
12	1,00	2,00	2,00	2,00	1,00	2,00	1,00	2,00	3,25
13	2,00	2,00	2,00	2,00	1,00	2,00	1,00	2,00	3,50
14	0,00	2,00	0,00	2,00	0,00	1,00	0,00	1,00	1,50
15	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	2,00
16	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	1,00
17	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50

*IIP - Índice de irritação primária

cada valor obtido representa leitura média de seis coelhos

Interpretação: valores de 0,00 a 0,90 = não irritante

valores acima de 1,00 = irritante

A Figura 2 mostra etapas dos procedimentos para execução do teste de irritação cutânea, desde a aplicação das amostras até a leitura das reações positivas como edema e eritema, após 24 e 72 horas.

Figura 02 - Teste de irritação cutânea durante avaliação da amostra 12 de sabonete líquido: a) coelho albino com pele e pêlo normal, b) quatro áreas tricotomizadas no dorso do animal, c) áreas superiores, em relação a cabeça, com amostra aplicada e áreas inferiores como controle, d) oclusão das quatro áreas, e) e f) leitura após 24 horas e 72 horas com observação de edema e eritema

5.1.2 Irritação Ocular

Todas as amostras de sombra para os olhos, máscara para os cílios, lápis ou delineador para os olhos apresentaram resultados negativos, quando aplicadas nos olhos dos coelhos utilizados na avaliação.

Os sabonetes líquidos de uso adulto identificados como amostras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 12, 13, 14, 15, 16 e 17 e os sabonetes líquidos de uso infantil identificados como amostra 9 e 10 apresentaram resultado positivo quando avaliados na concentração de 100% (sem diluição), com índice de irritação ocular variando de 6,40 a 16,00. Os sabonetes líquidos de uso infantil, identificados como amostras 8 e 11 apresentaram resultado negativo.

Os valores médios individuais obtidos nos diferentes tecidos oculares, córnea, conjuntiva e íris após 24 horas de instilação das amostras de sabonetes líquidos encontram-se na Tabela 3. Estes valores foram calculados de acordo com a escala de Draize e a soma forneceu o índice de irritação ocular. Todas as amostras que apresentaram irritação para o olho do coelho na concentração de 100% foram avaliadas na concentração de 10%, e apresentaram resultado negativo.

Tabela 03 - Valores de irritação nos diferentes tecidos e valores de irritação ocular obtidos de acordo com a escala de Draize, após 24 horas de instilação das amostras de sabonetes líquidos avaliadas na concentração de 100%

Amostra	Córnea	Íris	Conjuntiva	Índice de Irritação ocular*
1	5,00	2,00	6,00	13,00
2	5,00	0,00	6,00	11,00
3	5,00	0,00	6,00	11,00
4	5,00	0,00	6,00	11,00
5	5,00	0,00	6,00	11,00
6	5,00	0,00	6,00	11,00
7	5,00	0,00	6,00	11,00
8	0,00	0,00	0,00	0,00
9	5,00	2,00	6,40	13,40
10	2,00	0,00	4,40	6,40
11	0,00	0,00	0,00	0,00
12	5,00	5,00	6,00	16,00
13	5,00	4,00	5,60	14,60
14	5,00	4,00	6,00	15,00
15	5,00	0,00	6,00	11,00
16	5,00	5,00	6,00	16,00
17	5,00	5,00	6,00	16,00

* cada valor de irritação representa uma média de 5 coelhos

Interpretação: valores de 0,00 a 5,00 = não irritante e valores acima de 5,00 = irritante

A Figura 3 permite fazer a comparação entre os valores individuais e índices de irritação ocular obtidos para todas as amostras de sabonetes líquidos.

Figura 03 - Índices de irritação ocular e índices de irritação obtidos em particular para a íris, conjuntiva e córnea, das amostras de sabonetes líquidos avaliadas na concentração de 100%

A Figura 4 mostra situação comparativa entre o olho de coelho normal e o olho no qual a amostra foi instilada, após decorridas 24, 48 e 72 horas e sete dias, apresentando reações de opacidade, irite, hiperemia, quemose e secreção.

Figura 04 - Teste de irritação ocular durante avaliação da amostra 14 de sabonete líquido: a) olho normal do coelho como controle, b), c), d), e) 24 horas, 48 horas, 72 horas e sete dias após aplicação da amostra, apresentando opacidade de córnea, irite, hiperemia, quemose e secreção

5.1.3 Irritação de Mucosa Oral

Todas as amostras de batom com e sem protetor solar apresentaram resultado negativo na avaliação em mucosa oral de coelho.

A Figura 5 mostra a mucosa oral do coelho, respectivamente antes e após a aplicação de uma amostra de batom.

Figura 05 - Teste de irritação de mucosa oral: a) mucosa oral do coelho antes da aplicação da amostra de batom, b) mucosa oral, onze dias após a aplicação da amostra mostrando ausência de irritação

As porcentagens de amostras que apresentaram irritação, quando avaliadas pelos diferentes testes *in vivo* foram de: 19,0% com irritação ocular, 8,5% com irritação cutânea e 0,0% com irritação de mucosa oral (Figura 6).

Figura 06 - Amostras irritantes quando avaliadas nos diferentes testes *in vivo*

Para as avaliações empregando metodologias *in vivo* foram realizados 80 testes de irritação ocular com 400 animais, 141 de irritação cutânea com 846 animais e 78 de irritação de mucosa oral com 468 animais. Ainda, as amostras de sabonetes líquidos que foram irritantes na concentração de 100%, também foram avaliadas na concentração de 10%, somando mais 12 testes de irritação cutânea com 72 animais e 15 de irritação ocular com 75 animais. Nestes experimentos foram utilizados 1.861 coelhos com um total de 4.204 leituras.

5.2 Testes *In Vitro*

5.2.1 Citotoxicidade das amostras pelo método de difusão em ágar

As amostras de batom com e sem protetor solar, *blush*, pó compacto, base facial foram avaliadas nas linhagens celulares NCTC clone 929 e FPC-IAL. As amostras de sombra para os olhos, máscara para os cílios, lápis ou delineador para os olhos foram testadas nas linhagens celulares NCTC clone 929 e SIRC. As amostras de sabonete líquido foram avaliadas nas três linhagens celulares citadas acima.

A avaliação *in vitro* das 60 amostras de batom na concentração de 100% (sem diluição) resultou em 85% das amostras com ausência de efeito citotóxico na linhagem celular NCTC clone 929 e 73% na linhagem FPC-IAL. Estes valores foram aumentando nas concentrações menores, até atingir 100% na concentração de 12,5% (Figura 7).

Figura 07 - Citotoxicidade de diferentes concentrações das 60 amostras de batom, quando avaliadas *in vitro* nas linhagens celulares NCTC clone 929 e FPC-IAL

Os diâmetros dos halos de toxicidade das amostras que apresentaram efeito estão na Tabela 4. As amostras identificadas como 3, 4, 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 23 apresentaram, nas duas linhagens celulares, diâmetros dos halos de toxicidade variando de 0,50 a 2,22 cm, quando avaliadas na concentração de

100%. Sete amostras, identificadas como 3, 9, 10, 11, 12, 13 e 14 apresentaram na concentração de 75% diâmetros dos halos de toxicidade variando de 0,50 a 1,30 cm. Cinco amostras, identificadas como 9, 10, 11, 13 e 14 apresentaram na concentração de 50% diâmetros dos halos de toxicidade variando de 0,50 a 1,10 cm. Duas amostras, identificadas como 10 e 11 apresentaram na concentração de 25% diâmetros dos halos de toxicidade variando de 0,50 a 0,70 cm. As amostras de batom 7, 22, 24, 25, 46, 47 e 60, só apresentaram efeito tóxico para a linhagem celular FPC-IAL, quando na concentração de 100% (sem diluição), com diâmetros dos halos de toxicidade entre 0,50 e 1,10 cm. Somente a amostra 60 continuou apresentando efeito para esta linhagem celular até a concentração de 50%, com diâmetros dos halos de toxicidade variando de 0,90 a 0,70 cm.

Tabela 04 - Diâmetros dos halos de toxicidade (cm) obtidos nas diferentes concentrações das amostras de batom para as linhagens celulares NCTC clone 929 e FPC-IAL

Amostra	Diâmetros (cm) dos halos de toxicidade									
	NCTC clone 929					FPC-IAL				
	100%	75%	50%	25%	12,5%	100%	75%	50%	25%	12,5%
3	1.92	0.70	–			2.00	0.70	–		
4	0.50	–				0.70	0.70	0.50	–	
7	–					0.50	–			
9	2.10	1.30	0.70	–		2.22	1.30	0.70	0.50	–
10	2.20	1.10	0.70	0.50	–	2.10	1.30	0.90	0.70	–
11	2.20	1.30	0.90	0.50	–	2.16	1.30	1.10	0.70	–
12	0.70	0.50	–			0.84	0.70	0.70	–	
13	1.90	0.70	0.50	–		1.90	0.70	0.50	–	
14	1.50	0.90	0.50	–		1.50	0.90	0.50	–	
22	–					0.50	–			
23	0.50	–				0.50	0.50	–		
24	–					0.50	–			
25	–					0.70	–			
46	–					0.50	–			
47	–					0.50	–			
60	–					1.10	0.90	0.70	–	

– sem efeito tóxico

Na avaliação *in vitro* das 18 amostras de batom com protetor solar, 6% apresentaram efeito tóxico para a linhagem celular NCTC clone 929 e 11% para a linhagem FPC-IAL, quando as amostras foram avaliadas sem diluição e na concentração de 75%. Para a linhagem FPC-IAL, 6% das amostras continuaram apresentando efeito até a concentração de 25%, como pode ser observado na Figura 8.

Figura 08 - Citotoxicidade de diferentes concentrações das 18 amostras de batom com protetor solar, quando avaliadas *in vitro* nas linhagens celulares NCTC clone 929 e FPC-IAL

A Tabela 5 mostra os diâmetros de toxicidade das 18 amostras de batom com protetor solar que apresentaram efeito. Observa-se que a amostra identificada como 7 apresentou até a concentração de 75%, diâmetros dos halos de toxicidade variando de 1,90 a 0,50 cm, para as duas linhagens celulares. A amostra 8, só apresentou toxicidade para a linhagem celular FPC-IAL, com diâmetros dos halos de toxicidade variando de 0,70 a 0,50 cm até a concentração de 25%.

Tabela 05 - Diâmetros dos halos de toxicidade (cm) obtidos nas diferentes concentrações das amostras de batom com protetor solar para as linhagens celulares NCTC clone 929 e FPC-IAL

Amostra	Diâmetros (cm) dos halos de toxicidade									
	NCTC clone 929					FPC-IAL				
	100%	75%	50%	25%	12,5%	100%	75%	50%	25%	12,5%
7	0,50	0,50	–			1,90	1,10	–		
8	–					0.70	0.70	0.50	0,50	–

– sem efeito tóxico

Das 16 amostras de *blush* avaliadas *in vitro*, 13% apresentaram efeito somente para a linhagem celular FPC-IAL na concentração de 100% e 6% na concentração de 75%. Na linhagem NCTC clone 929, 100% das amostras foram negativas, como pode ser observado na Figura 9.

Figura 09 - Citotoxicidade de diferentes concentrações das 16 amostras de *blush*, quando avaliadas *in vitro* nas linhagens celulares NCTC clone 929 e FPC-IAL

As amostras de *blush* identificadas como 1 e 14 apresentaram diâmetros dos halos de toxicidade variando de 0,50 a 0,70 cm, na concentração de 100% para a linhagem celular FPC-IAL. Somente a amostra 14 manteve efeito até a concentração de 75%, porém com halo apenas sob a amostra. Estes resultados podem ser observados na Tabela 6.

Tabela 06 - Diâmetros dos halos de toxicidade (cm) obtidos nas diferentes concentrações das amostras de *blush* para as linhagens celulares NCTC clone 929 e FPC-IAL

Amostra	Diâmetros (cm) dos halos de toxicidade									
	NCTC clone 929					FPC-IAL				
	100%	75%	50%	25%	12,5%	100%	75%	50%	25%	12,5%
1	–					0,70	–			
14	–					0.50	0.50	–		

– sem efeito tóxico

Conforme mostra a Figura 10, das 15 amostras de pó compacto avaliados *in vitro*, 93% não apresentaram efeito para a linhagem celular NCTC

clone 929 e 87% para a linhagem FPC-IAL, tanto na concentração de 100% como na de 75%.

Figura 10 - Citotoxicidade de diferentes concentrações das 15 amostras de pó compacto, quando avaliadas *in vitro* nas linhagens celulares NCTC clone 929 e FPC-IAL

Na Tabela 7 observa-se que as amostras de pó compacto, identificadas como 7 e 15 apresentaram toxicidade até a concentração de 75%, com diâmetros dos halos de toxicidade variando de 0,70 a 0,50 cm. A amostra 15 apresentou efeito somente para a linhagem celular FPC-IAL.

Tabela 07 - Diâmetros dos halos de toxicidade (cm) obtidos nas diferentes concentrações das amostras de pó compacto para as linhagens celulares NTC clone 929 e FPC-IAL

Amostra	Diâmetros (cm) dos halos de toxicidade									
	NCTC clone 929					FPC-IAL				
	100%	75%	50%	25%	12,5%	100%	75%	50%	25%	12,5%
7	0,70	0,70	–			0,50	0,50	–		
15	–					0.70	0.50	–		

– sem efeito tóxico

A Figura 11 mostra o resultado da avaliação *in vitro* das 15 amostras de base facial, onde se observa que 40% não apresentaram efeito na concentração de 100% para as duas linhagens celulares utilizadas. Na linhagem celular FPC-IAL, 13% das amostras continuaram apresentando efeito tóxico até a concentração de 12,5%, enquanto que na linhagem NCTC clone 929, 20% das amostras apresentaram efeito, somente até a concentração de 50%.

Figura 11 - Citotoxicidade de diferentes concentrações das 15 amostras de base facial, quando avaliadas *in vitro* nas linhagens celulares NCTC clone 929 e FPC-IAL

Os diâmetros dos halos de toxicidade das amostras de base facial que apresentaram efeito estão presentes na Tabela 8. Observa-se que para as duas linhagens utilizadas, os diâmetros dos halos de toxicidade variaram de 0,50 a 1,80 cm nas diferentes concentrações. As amostras 8 e 14 apresentaram efeito até a concentração 12,5% para a linhagem FPC-IAL, com diâmetros dos halos de toxicidade de 1,30 e 0,50 cm respectivamente.

Tabela 08 - Diâmetros dos halos de toxicidade (cm) obtidos nas diferentes concentrações das amostras de base facial para as linhagens celulares NCTC clone 929 e FPC-IAL

Amostra	Diâmetros (cm) dos halos de toxicidade									
	NCTC clone 929					FPC-IAL				
	100%	75%	50%	25%	12,5%	100%	75%	50%	25%	12,5%
7	0.70	0.50	0.50	–		1.26	1.02	0.86	–	
8	1.00	0.80	0.50	–		1.80	1.70	1.52	1.42	1.30
9	0.50	–				1.16	1.16	1.00	–	
10	0.70	–				1.10	0.90	0.70	–	
11	0.50	–				1.56	1.30	1.10	0.90	–
12	0.70	–				0.50	–			
13	0.50	–				0.90	–			
14	0.70	0.50	0.50	–		1.40	1.02	1.02	0.72	0.50
15	0.70	0.50	–			0.70	0.50	0.50	–	

– sem efeito tóxico

Das 33 amostras de sombra para os olhos avaliadas *in vitro*, na concentração de 100%, 30 amostras, ou seja 91% não apresentaram efeito tóxico para as duas linhagens celulares utilizadas. Somente 3% das amostras continuaram apresentando efeito até a concentração de 25%, como pode ser observado na Figura 12.

Figura 12 - Citotoxicidade de diferentes concentrações das 33 amostras de sombra para os olhos, quando avaliadas *in vitro* nas linhagens celulares NCTC clone 929 e SIRC

Os diâmetros dos halos de toxicidade das três amostras identificadas como 11, 18 e 30 foram de 0,50 cm em várias concentrações para a linhagem NCTC clone 929 e variaram de 0,70 a 0,50 cm para a linhagem SIRC (Tabela 9).

Tabela 09 - Diâmetros dos halos de toxicidade (cm) obtidos nas diferentes concentrações das amostras de sombra para os olhos para as linhagens celulares NCTC clone 929 e SIRC

Amostra	Diâmetros (cm) dos halos de toxicidade									
	NCTC clone 929					SIRC				
	100%	75%	50%	25%	12,5%	100%	75%	50%	25%	12,5%
11	0.50	0,50	–			0,70	0,50	–		
18	0.50	0,50	0,50	0,50	–	0,70	0,70	0,70	0,50	–
30	0.50	–				0.50	0,50	–		

– sem efeito tóxico

Os resultados das avaliações *in vitro* das máscaras para cílios podem ser observados na Figura 13. Das 15 amostras analisadas, 73% não apresentaram efeito para a linhagem celular NCTC clone 929 e 87% para a

linhagem SIRC, quando avaliadas na concentração de 100%. Ainda, 7% das amostras continuaram apresentando toxicidade até a concentração de 50%, somente para a linhagem NCTC clone 929.

Figura 13 - Ciotoxicidade de diferentes concentrações das 15 amostras de máscara para os cílios, quando avaliadas *in vitro* nas linhagens celulares NCTC clone 929 e SIRC

Os diâmetros dos halos de toxicidade das amostras de máscara para os cílios, identificadas como 1, 7, 10 e 13 estão na Tabela 10. As amostras 1 e 7 apresentaram efeito para as duas linhagens utilizadas, mas apenas a amostra 7 continuou apresentando efeito para a linhagem NCTC clone 929 até a concentração de 50%, com diâmetros dos halos de toxicidade variando de 0,70 a 0,50 cm. As amostras identificadas como 10 e 13 apresentaram efeito apenas para a linhagem NCTC clone 929, quando não diluídas.

Tabela 10 - Diâmetros dos halos de toxicidade (cm) obtidos nas diferentes concentrações das amostras de máscara para os cílios para as linhagens celulares NCTC clone 929 e SIRC

Amostra	Diâmetros (cm) dos halos de toxicidade									
	NCTC clone 929					SIRC				
	100%	75%	50%	25%	12,5%	100%	75%	50%	25%	12,5%
1	0.84	–				0.84	–			
7	0.70	0,50	0,50	–		0,50	–			
10	0.50	–				–				
13	0,50	–				–				

– sem efeito tóxico

A Figura 14 mostra os resultados em porcentagem das 15 amostras de lápis ou delineador para os olhos. Observa-se que 73% das amostras não apresentaram efeito até a concentração de 50% para as duas linhagens celulares utilizadas. Ainda, 7% das amostras continuaram apresentando efeito até a concentração de 25% para linhagem celular NCTC clone 929 e para a linhagem SIRC até a concentração de 12,5%.

Figura 14 - Citotoxicidade de diferentes concentrações das 15 amostras de lápis ou delineador para os olhos, quando avaliadas *in vitro* nas linhagens celulares NCTC clone 929 e SIRC

A Tabela 11 mostra os diâmetros dos halos de toxicidade das amostras de lápis ou delineador para os olhos que apresentaram efeito. Observa-se que as medidas dos halos nas diferentes concentrações variaram de 1,50 a 0,50 cm e somente a amostra 3 apresentou efeito até a concentração de 12,5% para a linhagem celular SIRC, porém com halo de toxicidade sob a amostra.

Tabela 11 - Diâmetros dos halos de toxicidade (cm) obtidos nas diferentes concentrações das amostras de lápis ou delineador para os olhos para as linhagens celulares NCTC clone 929 e SIRC

Amostra	Diâmetros (cm) dos halos de toxicidade									
	NCTC clone 929					SIRC				
	100%	75%	50%	25%	12,5%	100%	75%	50%	25%	12,5%
3	1,10	0,70	0,50	–	–	1,50	1,10	1,06	0,50	0,50
4	1,50	0,70	0,70	–	–	1,10	0,82	0,50	–	–
8	0,90	0,90	0,50	–	–	0,70	0,70	0,50	–	–
12	0,70	0,50	0,50	0,50	–	0,50	0,50	0,50	0,50	–

– sem efeito tóxico

Os resultados em porcentagem obtidos na avaliação das 17 amostras de sabonetes líquidos estão na Figura 15. Observa-se que 100% das amostras apresentaram efeito para as linhagens celulares NCTC clone 929 e FPC-IAL, até concentração de 10%. Na linhagem SIRC, 100% das amostras apresentaram efeito quando avaliadas sem diluição e 94% na concentração de 10%.

Ainda, observa-se que quando as amostras foram avaliadas na concentração de 1%, continuaram apresentando altas porcentagens de efeito para as linhagens celulares, com exceção da linhagem SIRC, na qual somente 26% apresentaram efeito. Na concentração de 0,1%, somente 53% das amostras apresentaram efeito para a linhagem FPC-IAL, ao contrario do observado nas outras linhagens, nas quais 100% das amostras não apresentaram efeito.

Figura 15 -Citotoxicidade de diferentes concentrações das 17 amostras de sabonete líquido, quando avaliadas *in vitro* nas linhagens celulares NCTC clone 929, FPC-IAL e SIRC

Os diâmetros dos halos de toxicidade das 17 amostras de sabonetes líquidos estão expressos na Tabela 12. Todas as 17 amostras apresentaram, diâmetros dos halos de toxicidade variando de 1,12 até 6,00 cm, abrangendo toda área da placa até a concentração de 10% para as três linhagens celulares utilizadas. A única exceção foi a amostra 11, que não apresentou efeito na concentração de 10% para a linhagem celular SIRC.

Tabela 12 - Diâmetros dos halos de toxicidade (cm) obtidos nas diferentes concentrações das sabonete líquido para as linhagens celulares NCTC clone 929 FPC-IAL e SIRC

Amostra	Diâmetros (cm) dos halos de toxicidade												
	NCTC clone 929				FPC-IAL					SIRC			
	100%	10%	1%	0,1%	100%	10%	1%	0,1%	0,01%	100%	10%	1%	0,1%
1	6,00	3,40	1,26	–	6,00	6,00	2,26	1,10	–	6,00	1,20	0,50	–
2	4,00	2,60	1,36	–	6,00	3,30	1,00	–		3,54	2,30	0,50	–
3	4,30	3,06	1,10	–	4,34	4,10	1,32	–		3,74	3,40	0,72	–
4	5,44	3,00	1,10	–	6,00	4,30	1,64	0,70	–	3,40	1,40	–	
5	6,00	3,36	0,85	–	6,00	4,60	1,85	0,70	–	3,64	1,50	–	
6	5,44	2,60	0,70	–	6,00	3,80	0,70	0,50	–	3,60	2,16	–	
7	5,44	3,20	0,96	–	6,00	3,90	1,40	–		5,00	1,74	–	
8	6,00	3,20	–		6,00	3,90	–			4,74	2,00	–	
9	6,00	2,94	0,70	–	6,00	3,90	1,10	–		6,00	2,34	–	
10	4,36	2,16	–		6,00	3,40	1,40	–		3,40	1,40	–	
11	4,50	1,12	–		6,00	1,20	0,70	–		3,84	–		
12	4,04	3,00	0,50	–	6,00	4,04	0,70	–		3,90	2,50	–	
13	4,50	2,54	0,70	–	6,00	3,10	1,04	0,84	–	4,20	1,90	0,50	–
14	4,24	3,06	0,50	–	6,00	5,60	3,30	1,00	–	4,20	2,04	–	
15	6,00	3,24	0,70	–	6,00	4,24	3,36	1,06	–	3,74	1,94	–	
16	5,04	3,70	0,70	–	6,00	6,00	2,82	1,00	–	3,42	2,90	–	
17	6,00	2,16	0,70	–	6,00	4,04	1,92	0,86	–	4,00	1,40	–	

– sem efeito tóxico

As amostras de sabonete líquido, identificadas como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 12, 13, 14, 15, 16 e 17, apresentaram efeito para a linhagem celular NCTC clone 929 até a concentração de 1% com diâmetros dos halos de toxicidade entre 0,50 e 1,36 cm. As amostras 8, 10 e 11 só apresentaram efeito tóxico até a concentração de 10%, com diâmetro dos halos de toxicidade entre 1,12 e 3,20 cm.

Considerando a linhagem celular FPC-IAL, as amostras identificadas como 1, 4, 5, 6, 13, 14, 15, 16 e 17 apresentaram efeito tóxico até a concentração de 0,1%, com diâmetros de halos variando de 0,50 a 1,10 cm. As amostras 2, 3, 7, 9, 10, 11, e 12 apresentaram efeito tóxico até a concentração de 1%, com diâmetros de halos de toxicidade variando de 0,70 a 3,36 cm.

Somente a amostra 8 apresentou efeito até a concentração de 10%, com diâmetro do halo de toxicidade de 3,90 cm.

Na linhagem celular SIRC, as amostras identificadas como 1, 2, 3, e 13 apresentaram efeito até a concentração de 1%, com diâmetros de halos de 0,50 e 0,72 cm. As amostras 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 15, 16 e 17 apresentaram efeito até a concentração de 10% com diâmetros de halos de toxicidade variando de 1,40 a 2,90 cm. A amostra 11 apresentou efeito somente quando avaliada sem diluição, com diâmetro do halo de toxicidade de 3,84 cm.

Durante todo o desenvolvimento do trabalho, enquanto empregando este método, os controles negativos não apresentaram efeito tóxico e os controles positivos apresentaram halos de toxicidade com diâmetros médios de 2,20 cm para as linhagens celulares NCTC clone 929 e SIRC e de 3,00 cm para a linhagem celular FPC-IAL.

Os cálculos das graduações dos índices de zona (IZ), segundo a USP 25 (2002), foram efetuados utilizando-se as medidas dos diâmetros dos halos de toxicidade obtidos nas amostras. O critério de aceitação indicado neste compêndio para polímeros foi adotado, isto é, amostras que apresentaram até $IZ=2$ foram consideradas como não reativas. Por recomendação da USP 25, todas as medidas de diâmetros, transformados em halos de toxicidade, cujos valores encontraram-se entre 0,10 e 0,49 cm, também foram considerados como $IZ=2$.

Das 60 amostras de batons avaliadas sem diluição, 44 não apresentaram efeito tóxico para as duas linhagens celulares utilizadas, sendo graduadas como $IZ=0$. A Tabela 13 apresenta os índices de zona das amostras que apresentaram efeito tóxico, na qual pode ser visto que 10 amostras apresentaram $IZ=2$ e seis $IZ=3$ pelo menos em uma das linhagens celulares utilizadas. De acordo com o critério de aceitação adotado, das 60 amostras, apenas seis foram consideradas positivas.

Tabela 13 - Citotoxicidade das amostras de batom graduada em índice de zona, segundo a USP 25

Amostra	Índices de Zona (IZ)* obtidos nas linhagens celulares									
	NCTC clone 929					FPC-IAL				
	100%	75%	50%	25%	12,5%	100%	75%	50%	25%	12,5%
3	3	2	0			3	2	0		
4	2	0				2	2	2	0	
7	0					2	0			
9	3	2	2	0		3	2	2	2	0
10	3	2	2	2	0	3	2	2	2	0
11	3	2	2	2	0	3	2	2	2	0
12	2	2	0			2	2	2	0	
13	3	2	2	0		3	2	2	0	
14	3	2	2	0		3	2	2	0	
22	0					2	0			
23	2	0				2	2	0		
24	0					2	0			
25	0					2	0			
46	0					2	0			
47	0					2	0			
60	0					2	2	2	0	

*IZ=0 nenhuma zona ao redor ou sob a amostra

IZ=1 alteração ou degeneração celular sob a amostra

IZ=2 halo claro limitado sob a amostra

IZ=3 halo claro de 0,5 a 1,0 cm a partir da amostra

IZ=4 halo claro maior que 1,0 cm a partir da amostra

Na avaliação das 18 amostras de batom com protetor solar, 16 foram graduadas como IZ=0, por não apresentarem efeito tóxico. A Tabela 14 mostra os índices de zona de duas amostras, porém somente uma apresentou IZ=3 na concentração de 100% para a linhagem celular FPC-IAL, estando as demais amostras dentro do critério de aceitação adotado.

Tabela 14 - Citotoxicidade das amostras de batom com protetor solar graduada em índice de zona, segundo a USP 25

Amostra	Índices de Zona (IZ)* obtidos nas linhagens celulares									
	NCTC clone 929					FPC-IAL				
	100%	75%	50%	25%	12,5%	100%	75%	50%	25%	12,5%
7	2	2	0			3	2	0		
8	0					2	2	2	2	0

*IZ=0 nenhuma zona ao redor ou sob a amostra
 IZ=1 alteração ou degeneração celular sob a amostra
 IZ=2 halo claro limitado sob a amostra
 IZ=3 halo claro de 0,5 a 1,0 cm a partir da amostra
 IZ=4 halo claro maior que 1,0 cm a partir da amostra

Das 16 amostras de *blush*, somente duas apresentaram IZ=2 para a linhagem celular FPC-IAL, quando avaliadas na concentração de 100% (Tabela 15). Enquanto que na avaliação das 15 amostras de pó compacto, uma apresentou IZ=2 para as duas linhagens celulares e outra somente para a linhagem celular FPC-IAL até a concentração de 75% (Tabela 16).

Tabela 15 - Citotoxicidade das amostras de *blush* graduada em índice de zona, segundo a USP 25

Amostra	Índices de Zona (IZ)* obtidos nas linhagens celulares									
	NCTC clone 929					FPC-IAL				
	100%	75%	50%	25%	12,5%	100%	75%	50%	25%	12,5%
1	0					2	0			
14	0					2	2	0		

*IZ=0 nenhuma zona ao redor ou sob a amostra
 IZ=1 alteração ou degeneração celular sob a amostra
 IZ=2 halo claro limitado sob a amostra
 IZ=3 halo claro de 0,5 a 1,0 cm a partir da amostra
 IZ=4 halo claro maior que 1,0 cm a partir da amostra

Tabela 16 - Citotoxicidade das amostras de pó compacto graduada em índice de zona, segundo a USP 25

Amostra	Índices de Zona (IZ)* obtidos nas linhagens celulares									
	NCTC clone 929					FPC-IAL				
	100%	75%	50%	25%	12,5%	100%	75%	50%	25%	12,5%
7	2	2	0			2	2	0		
15	0					2	2	0		

*IZ=0 nenhuma zona ao redor ou sob a amostra
 IZ=1 alteração ou degeneração celular sob a amostra
 IZ=2 halo claro limitado sob a amostra
 IZ=3 halo claro de 0,5 a 1,0 cm a partir da amostra
 IZ=4 halo claro maior que 1,0 cm a partir da amostra

A Tabela 17 mostra os índices de zona das amostras de base facial que apresentaram toxicidade, sendo que sete amostras foram graduadas como IZ=2 para as duas linhagens celulares. Duas amostras apresentaram IZ=3, somente para a linhagem celular FPC-IAL. Assim das 15 amostras avaliadas, 13 estão dentro do critério de aceitação adotado.

Tabela 17 - Citotoxicidade das amostras de base facial graduada em índice de zona, segundo a USP 25

Amostra	Índices de Zona (IZ)* obtidos nas linhagens celulares									
	NCTC clone 929					FPC-IAL				
	100%	75%	50%	25%	12,5%	100%	75%	50%	25%	12,5%
7	2	2	2	0		2	2	2	0	
8	2	2	2	0		3	3	3	2	2
9	2	0				2	2	2	0	
10	2	0				2	2	2	0	
11	2	0				3	2	2	2	0
12	2	0				2	0			
13	2	0				2	0			
14	2	2	2	0		2	2	2	2	2
15	2	2	0			2	2	2	0	

*IZ=0 nenhuma zona ao redor ou sob a amostra

IZ=1 alteração ou degeneração celular sob a amostra

IZ=2 halo claro limitado sob a amostra

IZ=3 halo claro de 0,5 a 1,0 cm a partir da amostra

IZ=4 halo claro maior que 1,0 cm a partir da amostra

As 33 amostras de sombra para os olhos avaliadas estão dentro do critério de aceitação, sendo que somente três apresentaram IZ=2 para as duas linhagens celulares utilizadas (Tabela 18). Os mesmos resultados foram obtidos para as 15 amostras de máscaras para os cílios, uma vez que 11 não apresentaram efeito tóxico e foram graduadas como IZ=0 (Tabela 19).

Tabela 18 - Citotoxicidade das amostras de sombra para os olhos graduada em índice de zona, segundo a USP 25

Amostra	Índices de Zona (IZ)* obtidos nas linhagens celulares									
	NCTC clone 929					SIRC				
	100%	75%	50%	25%	12,5%	100%	75%	50%	25%	12,5%
11	2	2	0			2	2	0		
18	2	2	2	2	0	2	2	2	2	0
30	2	0				2	2	0		

*IZ=0 nenhuma zona ao redor ou sob a amostra
 IZ=1 alteração ou degeneração celular sob a amostra
 IZ=2 halo claro limitado sob a amostra
 IZ=3 halo claro de 0,5 a 1,0 cm a partir da amostra
 IZ=4 halo claro maior que 1,0 cm a partir da amostra

Tabela 19 - Citotoxicidade das amostras de máscara para os cílios graduada em índice de zona, segundo a USP 25

Amostra	Índices de Zona (IZ)* obtidos nas linhagens celulares									
	NCTC clone 929					SIRC				
	100%	75%	50%	25%	12,5%	100%	75%	50%	25%	12,5%
1	2	0				2	0			
7	2	2	2	0		2	0			
10	2	0				0				
13	2					0				

*IZ=0 nenhuma zona ao redor ou sob a amostra
 IZ=1 alteração ou degeneração celular sob a amostra
 IZ=2 halo claro limitado sob a amostra
 IZ=3 halo claro de 0,5 a 1,0 cm a partir da amostra
 IZ=4 halo claro maior que 1,0 cm a partir da amostra

Das 15 amostras de lápis ou delineador para os olhos, somente duas não estão dentro do critério de aceitação por apresentaram IZ=3 para uma das linhagens celulares utilizadas (Tabela 20).

Tabela 20 - Citotoxicidade das amostras de lápis ou delineador para os olhos graduada em índice de zona, segundo a USP 25

Amostra	Índices de Zona (IZ)* obtidos nas linhagens celulares									
	NCTC clone 929					SIRC				
	100%	75%	50%	25%	12,5%	100%	75%	50%	25%	12,5%
3	2	2	2	0		3	2	2	2	2
4	3	2	2	0		2	2	2	0	
8	2	2	2	0		2	2	2	0	
12	2	2	2	2	0	2	2	2	2	0

*IZ=0 nenhuma zona ao redor ou sob a amostra

IZ=1 alteração ou degeneração celular sob a amostra

IZ=2 halo claro limitado sob a amostra

IZ=3 halo claro de 0,5 a 1,0 cm a partir da amostra

IZ=4 halo claro maior que 1,0 cm a partir da amostra

Conforme se observa na Tabela 21, as 17 amostras de sabonetes líquidos apresentaram IZ=4 quando avaliadas sem diluição e empregando as três linhagens celulares. Na concentração de 10% as amostras continuaram apresentando IZ=4, com exceção das amostras 10 e 17 que apresentaram IZ=3 para a linhagem NCTC clone 929 e a amostra 11 que apresentou IZ=2 para as linhagens celulares NCTC clone 929 e FPC-IAL. Na linhagem SIRC a maioria das amostras apresentaram IZ=3, com exceção das amostras 3 e 16 que apresentaram IZ=4, das amostras 1, 4, 10 e 17 que apresentaram IZ=2 e da amostra 11 com IZ=0.

Considerando a diluição de 1% na linhagem NCTC clone 929, três amostras apresentaram IZ=0, as demais IZ=2. Para a linhagem FPC-IAL, três amostras continuaram apresentando IZ=4, cinco IZ=3, seis IZ=2 e somente uma IZ=0. Na linhagem celular SIRC, 12 amostras apresentaram IZ=0 e quatro IZ=2. Na concentração de 0,1% somente a linhagem celular FPC-IAL continuou apresentando IZ=2 para as amostras 1, 4, 5, 6, 13, 14, 15, 16 e 17 enquanto nas amostras 2, 3, 7, 9, 10, 11 e 12 o IZ foi zero. As amostras que ainda apresentaram índice de zona nesta concentração foram negativas em 0,01%. Todas as amostras avaliadas na concentração de 100% e 10%, nas linhagens celulares NCTC clone 929 e FPC-IAL, estão fora do critério de aceitação adotado, com exceção da amostra 11 na concentração de 10%. Na linhagem SIRC, cinco amostras estão dentro do critério de aceitação adotado,

quando avaliadas na concentração de 10%. Na concentração de 1% todas as amostras estão dentro do critério de aceitação adotado, quando foram utilizadas as três linhagens celulares utilizadas, com exceção das amostras 1, 3, 4, 5, 14, 15, 16 e 17 quando avaliadas na linhagem FPC-IAL (Tabela 21).

Tabela 21 - Citotoxicidade das amostras de sabonetes líquidos graduada em índice de zona, segundo a USP 25

Amostras de sabonete líquido	Índices de Zona (IZ)* obtidos nas linhagens celulares													
	NCTC clone 929				FPC-IAL					SIRC				
	100%	10%	1%	0,1%	100%	10%	1%	0,1%	0,01%	100%	10%	1%	0,1%	
1	4	4	2	0	4	4	3	2	0	4	2	2	0	
2	4	4	2	0	4	4	2	0		4	3	2	0	
3	4	4	2	0	4	4	3	0		4	4	2	0	
4	4	4	2	0	4	4	3	2	0	4	2	0		
5	4	4	2	0	4	4	3	2	0	4	3	0		
6	4	4	2	0	4	4	2	2	0	4	3	0		
7	4	4	2	0	4	4	2	0		4	3	0		
8	4	4	0		4	4	0			4	3	0		
9	4	4	2	0	4	4	2	0		4	3	0		
10	4	3	0		4	4	2	0		4	2	0		
11	4	2	0		4	2	2	0		4	0			
12	4	4	2	0	4	4	2	0		4	3	0		
13	4	4	2	0	4	4	2	2	0	4	3	2	0	
14	4	4	2	0	4	4	4	2	0	4	3	0		
15	4	4	2	0	4	4	4	2	0	4	3	0		
16	4	4	2	0	4	4	4	2	0	4	4	0		
17	4	3	2	0	4	4	3	2	0	4	2	0		

*IZ=0 nenhuma zona ao redor ou sob a amostra

IZ=1 alteração ou degeneração celular sob a amostra

IZ=2 halo claro limitado sob a amostra

IZ=3 halo claro de 0,5 a 1,0 cm a partir da amostra

IZ=4 halo claro maior que 1,0 cm a partir da amostra

A tabela 22 apresenta os números totais das graduações dos índices de zona (IZ) obtidos em todos os grupos de amostras avaliadas neste estudo. Observa-se que das 204 amostras testadas, 28 estão fora do critério de aceitação, segundo a USP 25 (2000).

Tabela 22 - Citotoxicidade do total de amostras graduada em índice de zona, segundo a USP 25

Amostras	Índices de zona (IZ)				Total de amostras
	0 ou 1	2	3	4	
Batom	44	10	6	-	60
Batom c/ protetor solar	16	1	1	-	18
Blushes	14	2	-	-	16
Pó compacto	13	2	-	-	15
Base facial	6	7	2	-	15
Sombra p/ os olhos	30	3	-	-	33
Máscara p/ os cílios	11	4	-	-	15
Lápis p/ os olhos	11	2	2	-	15
Sabonetes líquidos	-	-	-	17	17
Total	145	31	11	17	204

A Figura 16 mostra as placas de culturas celulares das três linhagens, com os controles negativos e controles positivos, nas quais pode ser visto o halo de difusão de substâncias de caráter tóxico. A Figura 17 mostra as fotomicrografias das monocamadas das três linhagens celulares coradas com vermelho neutro e zonas claras devido a difusão do efeito tóxico caracterizado pela presença de células mortas, que não absorveram o corante vital.

A porcentagem das amostras que apresentaram efeito nas diferentes linhagens celulares em relação aos diferentes testes *in vivo* e a porcentagem destas mesmas amostras, quando foram consideradas positivas após os halos de toxicidade serem graduados em índice de zona, podem ser comparadas na Figura 18. Nela observa-se que a maior porcentagem de amostras com efeito tóxico *in vitro* não passou de 35%, diminuindo para 22,5% quando só foram consideradas tóxicas as amostras que apresentaram $IZ > 2$.

a, b, c

Figura 16 - Placas das linhagens celulares utilizadas no método de difusão em ágar, mostrando o halo claro ao redor do controle positivo e ausência de halo ao redor ou sob o controle negativo: a) linhagem celular NCTC clone 929, b) linhagem celular FPC-IAL e c) linhagem celular SIRC

a, b, c

Figura 17 - Fotomicrografias das monocamadas das linhagens celulares utilizadas no método de difusão em ágar apresentando as células coradas e as células claras e lisadas caracterizadas pela presença do efeito tóxico a) linhagem celular NCTC clone 929, b) linhagem celular FPC-IAL e c) linhagem celular SIRC – 100X

Figura 18 - Amostras que apresentaram efeito tóxico nas linhagens celulares e que apresentaram IZ>2, de acordo com a região de aplicação da amostra a) cutânea, b) ocular e c) mucosa oral

No método de difusão em ágar utilizando placas de diferentes linhagens celulares, foram realizados 726 ensaios com um total de 2.178 leituras, considerando que os ensaios foram feitos em triplicatas e que muitas amostras foram avaliadas em várias concentrações.

O resumo dos resultados positivos e negativos obtidos nos testes *in vivo* e *in vitro* de todas as amostras utilizadas neste estudo pode ser visualizado na figura 19. As amostras foram agrupadas de acordo com o local de aplicação e nos resultados *in vitro* foram consideradas as duas classificações, tanto a presença de efeito tóxico como o critério adotado pela USP 25 (2000). Observa-se que as porcentagens dos resultados negativos nos testes *in vivo* variaram de 81% a 100% e nos testes *in vitro* variaram de 65% a 77%, quando foi considerada somente a presença do efeito tóxico. Quando estes mesmos resultados foram classificados em índices de zona, as porcentagens variaram de 76,3% a 91%.

Figura 19 - Resultados obtidos nos testes *in vivo* e *in vitro* de acordo com a região de aplicação das amostras: a) cutânea, b) ocular e c) mucosa oral

5.2.2 Método de Captura do Vermelho Neutro

Este método foi utilizado exclusivamente para avaliar as amostras de sabonete líquido, identificadas de 1 a 17.

As curvas dose resposta de cada uma das 17 amostras de sabonete líquido, controle positivo e negativo, nas três linhagens celulares, NCTC clone 929, FPC-IAL e SIRC foram determinadas, após 24 horas de exposição e podem ser observadas na Figura 20. Estas curvas foram construídas para permitir a obtenção dos valores de IC_{50} , índice de citotoxicidade que causa 50% de morte celular. Na linhagem NCTC clone 929, os valores obtidos variaram de 0,03% a 0,100%, na linhagem FPC-IAL de 0,027% a 0,089% e na linhagem SIRC de 0,032% a 0,110%. Os índices de citotoxicidade nas amostras 8, 9, 10 e 11, de uso infantil, foram maiores que os das demais, bem como da amostra 17 de uso adulto (Tabela 23).

Figura 20 - Curvas dose-resposta obtidas de cada amostra de sabonete líquido e dos controles positivos e negativos para obtenção dos IC_{50} nas linhagens celulares NCTC clone 929, FPC-IAL e SIRC

Tabela 23 - Valores de IC₅₀ obtidos nas amostras de sabonetes líquidos quando avaliadas nas linhagens celulares NCTC clone 929, FPC-IAL e SIRC

Amostra	Valores de IC ₅₀ (%)		
	NCTC clone 929	FPC-IAL	SIRC
Controle +	14	10	15
1	0,041	0,044	0,058
2	0,044	0,041	0,049
3	0,043	0,043	0,043
4	0,045	0,047	0,045
5	0,035	0,032	0,042
6	0,030	0,027	0,039
7	0,044	0,032	0,041
8	0,064	0,063	0,077
9	0,063	0,058	0,061
10	0,058	0,051	0,064
11	0,100	0,089	0,110
12	0,046	0,045	0,044
13	0,042	0,044	0,043
14	0,041	0,033	0,032
15	0,040	0,046	0,051
16	0,042	0,043	0,045
17	0,058	0,068	0,079

As diferenças de coloração resultantes da incorporação do corante vermelho neutro pelas células viáveis, nas três linhagens celulares expostas a diferentes concentrações das amostras podem ser observadas na Figura 21.

Figura 21 - Microplacas utilizadas no método de captura do vermelho neutro, mostrando os gradientes de coloração obtidos nas diferentes concentrações utilizadas na avaliação das amostras de sabonete líquido: a) linhagem celular NCTC clone 929, b) linhagem celular FPC-IAL e c) linhagem SIRC

5.3 Análise Estatística

5.3.1 Método de Difusão em Ágar

As análises estatísticas foram realizadas com o objetivo de investigar a correlação entre resultados obtidos nos métodos *in vitro*, adotando diferentes linhagens celulares, e os métodos *in vivo*.

Os índices de coeficiente de correlação de Pearson entre as linhagens celulares foram calculados somente para os grupos das amostras que apresentaram maior número de resultados positivos (Tabela 24).

Tabela 24 - Coeficiente de correlação de Pearson (r) e nível de significância (p) entre os diâmetros de toxicidade das linhagens celulares na avaliação das diferentes amostras, quando analisadas nas concentrações de 100%, 10% e 1%

Amostras	Linhagens celulares	(r)	(p)
Batom	NCTC clone 929 e FPC-IAL (amostra a 100%)	0,940	0,0001 **
Base facial	NCTC clone 929 e FPC-IAL (amostra a 100%)	0,881	0,0001 **
Lápis para os olhos	NCTC clone 929 e SIRC (amostra a 100%)	0,944	0,0001 **
Sabonete líquido	NCTC clone 929 e SIRC (amostra a 100%)	0,446	0,072 NS
	NCTC clone 929 e FPC-IAL (amostra a 100%)	0,270	0,295 NS
	FPC-IAL e SIRC (amostra a 100%)	0,124	0,636 NS
	NCTC clone 929 e SIRC (amostra a 10%)	0,605	0,010 *
	NCTC clone 929 e FPC-IAL (amostra a 10%)	0,836	0,0001 **
	FPC-IAL e SIRC (amostra a 100%)	0,429	0,086 NS
	NCTC clone 929 e SIRC (amostra a 1%)	0,557	0,020 *
	NCTC clone 929 FPC-IAL (amostra a 1%)	0,257	0,319 NS
	FPC-IAL e SIRC (amostra a 1%)	-0,097	0,710 NS

NS: não significante, *: significante (5%), **: significante (1%)

A avaliação da correlação dos métodos *in vitro* e *in vivo* foi realizada somente nas amostras de sabonetes líquidos por serem estas as únicas a apresentarem resultados positivos nos animais (Tabelas 25, 26 e 27).

Tabela 25 - Coeficiente de correlação de Pearson (r) e nível de significância (p) entre os índices de irritação primária (IIP) e os diâmetros de toxicidade obtidos nas linhagens celulares durante avaliação das amostras de sabonetes líquidos em diferentes concentrações

IIP X linhagens celulares	(r)	(p)
IIP- NCTC clone 929 (amostra a 100%)	-0,276	0,283 NS
IIP- NCTC clone 929 (amostra a 10%)	0,308	0,229 NS
IIP- NCTC clone 929 (amostra a 1%)	0,354	0,163 NS
IIP- FPC-IAL (amostra a 100%)	-0,058	0,826 NS
IIP- FPC-IAL (amostra a 10%)	0,224	0,388 NS
IIP- FPC-IAL (amostra a 1%)	0,173	0,507 NS
IIP- SIRC (amostra a 100%)	0,013	0,961 NS
IIP- SIRC (amostra a 10%)	0,298	0,245 NS
IIP- SIRC (amostra a 1%)	0,382	0,130 NS

NS: não significante, *: significante (5%), **: significante (1%)

Tabela 26 - Coeficiente de correlação de Pearson (r) e nível de significância (p) entre os índices de irritação ocular (IIO) e os diâmetros de toxicidade obtidos nas linhagens celulares durante avaliação das amostras de sabonetes líquidos em diferentes concentrações

IIO X linhagens celulares	(r)	(p)
IIO – NCTC clone 929 (amostra a 100%)	0,042	0,870 NS
IIO – NCTC clone 929 (amostra a 10%)	0,441	0,076 NS
IIO – NCTC clone 929 (amostra a 1%)	0,561	0,019 *
IIO – FPC-IAL (amostra a 100%)	0,001	0,996 NS
IIO – FPC-IAL (amostra a 10%)	0,591	0,013 *
IIO – FPC-IAL (amostra a 1%)	0,501	0,041 *
IIO – SIRC (amostra a 100%)	0,050	0,848 NS
IIO – SIRC (amostra a 10%)	0,475	0,054 NS
IIO – SIRC (amostra a 1%)	0,143	0,584 NS

NS: não significante, *: significante (5%), **: significante (1%)

Tabela 27 - Coeficiente de correlação de Pearson (r) e nível de significância (p), entre os índices de irritação dos tecidos e os diâmetros de toxicidade obtidos nas linhagens celulares durante avaliação das amostras de sabonetes líquidos em diferentes concentrações

Índice de irritação dos tecidos x linhagens celulares	r (p)		
	100 %	10 %	1 %
Córnea x NCTC clone 929	0,053 (0.841 NS)	0,518 (0.033 *)	0,785 (0.0002 **)
Íris x NCTC clone 929	-0,158 (0.543 NS)	0,125 (0.632 NS)	-0,041 (0.877 NS)
Conjuntiva x NCTC clone 929	0,018 (0.945 NS)	0,483 (0.049 *)	0,719 (0.001 **)
Córnea x FPC-IAL	-0,112 (0.667 NS)	0,548 (0.023 *)	0,478 (0.052 NS)
Íris x FPC-IAL	0,193 (0.458 NS)	0,383 (0.263 NS)	0,288 (0.263 NS)
Conjuntiva x FPC-IAL	-0,103 (0.694 NS)	0,547 (0.023 *)	0,492 (0.045 *)
Córnea x SIRC	0,030 (0.908 NS)	0,490 (0.046 *)	0,245 (0.343 NS)
Íris x SIRC	0,087 (0.740 NS)	0,227 (0.380 NS)	-0,063 (0.811 NS)
Conjuntiva x SIRC	0,003 (0.990 NS)	0,482 (0.050 *)	0,199 (0.444 NS)

NS: não significante, *: significante (5%), **: significante (1%)

A sensibilidade e especificidade do método de difusão em ágar foram calculadas de acordo com COOPER, SARACI e COLE (1979). Para estes cálculos foi considerado o critério da USP 25 (2002), onde todas as amostras graduadas até IZ=2 foram consideradas não irritantes e acima deste nível irritantes.

Os valores de sensibilidade e especificidade, do método de difusão em ágar em relação aos testes de irritação cutânea e ocular podem ser observados na Tabela 28.

Tabela 28 - Valores de sensibilidade e especificidade obtidos no método de difusão em ágar com relação aos resultados de todas as amostras avaliadas nos testes *in vivo*

Método de difusão em ágar	Sensibilidade (%)		Especificidade (%)	
	Irritação Cutânea	Irritação Ocular	Irritação Cutânea	Irritação Ocular
NCTC clone 929 (amostra a 100%)	100	100	91	95
FPC-IAL (amostra a 100%)	100	-	89	-
SIRC (amostra a 100%)	-	100	-	95

5.3.2 Método de Captura do Vermelho Neutro

As avaliações estatísticas para este método foram realizadas com o objetivo de verificar as correlações entre as linhagens celulares utilizadas e os testes *in vivo* de irritação cutânea e ocular para as amostras de sabonetes líquidos. Os resultados encontrados podem ser observados nas Tabelas 29, 30 e 31.

Tabela 29 - Coeficientes de correlação de Pearson e nível de significância (p), entre os valores de IC₅₀ obtidos nas três linhagens celulares utilizadas

Linhagens celulares	(r)	(p)
SIRC e FPC-IAL	0,948	0,0001 **
SIRC e NCTC clone 929	0,926	0,0001 **
FPC-IAL e NCTC clone 929	0,919	0,0001 **

**: significante (1%)

Tabela 30 - Coeficientes de correlação de Pearson e nível de significância (p), entre os valores de IC₅₀ obtidos nas linhagens celulares e os índices de Irritação Primária (IIP)

Linhagens celulares X IIP	(r)	(p)
NCTC clone 929 e IIP	-0,4976	0,0421*
FPC-IAL e IIP	-0,4168	0,0960 NS
SIRC e IIP	-0,5649	0,0181*

*: significante (5%), NS: não significante

Tabela 31 - Coeficientes de correlação de Pearson e nível de significância (p), entre os valores de IC₅₀ obtidos nas linhagens celulares e os índices de irritação ocular (IIO) e individual dos tecidos

Linhagens celulares X índices de irritação	(r)	(p)
NCTC clone 929 e IIO	-0,6616	0,0038**
NCTC clone 929 e córnea	-0,784	0,0002**
NCTC clone 929 e íris	-0,128	0,6248 NS
NCTC clone 929 e conjuntiva	-0,783	0,0002 **
FPC-IAL e IIO	-0,5037	0,0392*
FPC-IAL e córnea	-0,670	0,0039 **
FPC-IAL e íris	0,022	0,9338NS
FPC-IAL e conjuntiva	-0,667	0,0035 **
SIRC e IIO	-0,6540	0,0044**
SIRC e córnea	-0,785	0,0002 **
SIRC e íris	-0,112	0,6678 NS
SIRC e conjuntiva	-0,780	0,0002 **

*: significante (5%), **: significante (1%), NS: não significante

A Tabela 32 apresenta os valores de sensibilidade e especificidade, encontrados no método de captura do vermelho neutro em relação aos testes *in vivo*. O valor de IC₅₀ igual a 0,085% foi utilizado como valor de corte. As amostras, cuja IC₅₀ eram maiores foram consideradas não irritantes e aquelas com IC₅₀ menores, irritantes.

Tabela 32 - Valores de sensibilidade e especificidade obtidos no método de captura do vermelho neutro nas três linhagens celulares em relação aos testes *in vivo* na avaliação das amostras de sabonete líquido

Método de captura do vermelho neutro	Sensibilidade (%)		Especificidade (%)	
	Irritação Cutânea	Irritação Ocular	Irritação Cutânea	Irritação Ocular
NCTC Clone 929	100	100	20	50
FPC-IAL	100	100	20	50
SIRC	100	100	20	50

6 - DISCUSSÃO

A procura incessante de métodos que substituam os que tradicionalmente utilizam animais tem estimulado o estudo e o desenvolvimento de ensaios que possam contribuir para avaliação da segurança dos mais variados produtos.

Os cosméticos situam-se entre os produtos que têm gerado muita polémica, em decorrência do uso de ensaios com animais para a avaliação de irritação cutânea e ocular. Esta questão tem se mostrado crucial, principalmente nos países da comunidade europeia, onde a opinião pública em geral é favorável a novas iniciativas e aos cosméticos *Cruelty-Free* (BARRELA, ROQUE e SILVA, 2002).

Apesar da conhecida variabilidade, inerente aos testes de irritação ocular e cutânea, os protocolos de Draize têm sido usados como padrão ao se comparar o desempenho dos métodos *in vitro* (EARL, DICKENS e ROWSON, 1997). Esta variabilidade compromete a esperada correlação, mesmo que o método alternativo seja adequado para predizer a resposta (BALLS et al., 1995).

Os métodos toxicológicos *in vitro* são importantes para avaliar a citotoxicidade basal, a genotoxicidade, a alergenicidade, entre outros efeitos deletérios. O uso dos métodos que definem a citotoxicidade basal, ou seja, que identificam a habilidade de um componente em causar morte celular como

consequência de danos na função básica da célula, apresentam boa correlação com a toxicidade aguda em animais e no homem (EISENBRAND et al., 2002).

Diferentes autores são unânimes na afirmação de que as avaliações de citotoxicidade *in vitro*, empregando sistemas celulares, necessitam ser conduzidas observando as boas práticas de culturas celulares e que estas devem ser de origem e características bem definidas, aumentando desta maneira o potencial em prever o risco das substâncias químicas (FRESHNEY, 1987; DOYLE, GRIFFITHS e NEWELL, 1994; INTERAGENCY, 2001; EISENBRAND et al., 2002). Este cuidado foi observado no presente estudo, onde as linhagens celulares utilizadas são certificadas e livres de contaminantes. Duas delas, NCTC clone 929 e SIRC, são originárias do ATCC e a FPC-IAL foi isolada no Laboratório de Culturas Celulares do IAL, onde o estudo foi desenvolvido, portanto as linhagens têm origem e história conhecidas.

Entre as metodologias que avaliam a citotoxicidade basal, o método de difusão em ágar é um dos pioneiros e devido a sua reprodutibilidade foi adotado pelo American Society for Testing and Materials (ASTM), pelas normas da International Organization for Standardization (ISO) e pela Farmacopéia Americana (USP), como método oficial na avaliação de plásticos e produtos de uso médico (ASTM, 1983, 1995; ISO, 1992; USP 22,1990; USP 23, 1995; USP 24, 1999; USP 25, 2002). Algumas entidades indicam o uso de qualquer linhagem celular de mamífero, outras especificam a linhagem celular NCTC clone 929 por se tratar de linhagem estabelecida, com características estáveis, de fácil manuseio e que apresenta resultados reprodutíveis.

O único método citado em bibliografia oficial adota o sistema celular, escolhido para realização deste estudo, utilizando tanto a linhagem celular especificada na ASTM e Farmacopéia Americana, como outras originárias dos mesmos tecidos alvos nos testes *in vivo*. Sendo assim, as linhagens FPC-IAL, constituída de células de fibroblasto de pele de coelho e SIRC, células de córnea de coelho foram testadas com o objetivo de se obter melhor correlação com os testes de irritação cutânea primária e ocular, respectivamente. Esta

estratégia foi baseada em estudos que discutem a íntima correlação entre o teste de irritação ocular e o teste de citotoxicidade *in vitro* com células da córnea, bem como o teste de irritação cutânea usando fibroblasto de pele humana (WATANABE et al., 1989; LEE et al., 2000).

A escolha do número de animais por ensaio foi feita de acordo com os protocolos oficiais e em sintonia com o conceito dos três Rs. Nos ensaios de irritação cutânea e de mucosa oral, o número de animais utilizados permaneceu o indicado pelo FDA. No ensaio de irritação ocular, por se tratar de um teste muito agressivo adotou-se o número de cinco animais, utilizado em alguns protocolos (KAY e CALANDRA, 1962; INCQS, 2001a). Por outro lado é um número intermediário, uma vez que o recomendado pela OECD são três animais, metade do indicado pelo FDA. Esta drástica redução, porém pode causar respostas erradas, devido à variabilidade do teste (WILHELMUS, 2001).

Com relação ao teste de irritação ocular, a correlação *in vitro/in vivo* foi feita com os valores individuais obtidos na córnea, conjuntiva e íris. O objetivo foi verificar se a resposta do teste *in vitro*, geralmente feita em um único tipo celular, estava mais relacionada com os valores individuais do que com a somatória de respostas do olho, pois este é uma estrutura complexa formada de vários tecidos distintos. De acordo com outros estudos, os valores para realizar estes cálculos são os que apresentam maiores índices de irritação, os quais foram obtidos neste estudo na leitura de 24 horas, após a aplicação do produto (GETTINGS et al., 1994; GETTINGS et al., 1996a; HARBELL et al., 1997; LORDO, FEDER e GETTINGS, 1999; OHNO et al., 1999).

De um total de 204 amostras testadas neste estudo, 141 foram avaliadas pelo teste de irritação cutânea primária (Figura 2), 78 pelo teste de irritação de mucosa oral (Figura 5) e 80 pelo teste de irritação ocular (Figura 4). Dos resultados observados 12 (8,5%) amostras apresentaram irritação cutânea e 15 (19%) irritação ocular, quando avaliadas sem diluição (Tabelas 2 e 3 e Figuras 1, 3 e 6).

Comparando os resultados das amostras testadas *in vitro* e pelo teste de irritação cutânea, observa-se que 37 (26%) amostras apresentaram efeito

citotóxico para a linhagem celular NCTC clone 929 e 48 (34%) para a linhagem celular FPC-IAL (Tabelas 4, 5, 6, 7, 8 e 12 e Figura 18). Em relação aos resultados das amostras avaliadas *in vitro* e pelo método de irritação ocular, observa-se que 28 (35%) apresentaram efeito para a linhagem NCTC clone 929 e 26 (32,5%) apresentaram efeito para a linhagem celular SIRC (Tabelas 9, 10, 11 e 12 e Figura 18). Quanto aos resultados das amostras avaliadas *in vitro* e pelo teste de irritação de mucosa oral, observa-se que 10 (13%) apresentaram efeito para a linhagem NCTC clone 929 e 18 (23%) para a linhagem celular FPC-IAL (Tabelas 4 e 5 e Figura 18). Estes valores fazem referência às avaliações das amostras sem diluição, na medida em que foram testadas em concentrações menores o número e a porcentagem de amostras apresentando efeito tóxico reduziram proporcionalmente. Poucas apresentaram efeito nas concentrações finais utilizadas neste estudo (Figuras de 7 a 15).

O número de amostras que apresentaram efeito tóxico foi maior nos métodos *in vitro*, confirmando resultados obtidos por outros autores e corroborando a maior sensibilidade que as linhagens celulares apresentam em relação aos animais de laboratório (ROUGIER et al., 1994; VIAN et al., 1995; WILHELMUS, 2001).

A visualização microscópica do efeito tóxico, nas placas de culturas celulares utilizadas no método de difusão em ágar, é caracterizada pela presença de células mortas ao redor ou sob a amostra (Figura 17). Estas células mortas sem o corante vital, quando visualizadas macroscopicamente formam um halo claro, cuja medida fornece os diâmetros de efeito tóxico (Figura 16).

Quando os valores, obtidos no método *in vitro*, foram graduados em índice de zona, de acordo com o critério adotado para polímeros, segundo a USP 25 (2002), observou-se uma redução de quase 50% do número de amostras consideradas positivas, quando comparado com as que apresentaram efeito tóxico. A quantidade de amostras consideradas positivas *in vitro*, com IZ maior que 2, e avaliadas simultaneamente pelo teste de irritação cutânea diminuiu para 23 (16,3%) e 26 (18,4%) nas linhagens NCTC

clone 929 e FPC-IAL, respectivamente (Tabelas 13, 14, 15, 16, 17 e 21 e Figura 18). Quanto as amostras testadas em paralelo com o teste de irritação ocular, o número de positivas diminuiu para 18 (22,5%) amostras, tanto para a linhagem NCTC clone 929 quanto para a linhagem SIRC (Tabelas 18, 19, 20 e 21 e Figura 18). Em relação as avaliadas pelo teste de irritação de mucosa oral, seis (8%) amostras foram positivas para a linhagem celular NCTC clone 929 e sete (9%) para a linhagem FPC-IAL (Tabelas 13 e 14 e Figura 18).

Comparando os resultados *in vivo* e *in vitro* (Figura19), verifica-se que a porcentagem de amostras positivas no teste de irritação cutânea e ocular foi menor em relação ao teste *in vitro*, quando considerada somente a presença de efeito tóxico, diferença que diminui quando adotado o critério da USP 25. Em relação aos resultados negativos verifica-se que esta diferença é cerca de 10% em relação aos testes *in vivo*. Sendo assim, se este critério for adotado para os produtos cosméticos e for considerado que toda a amostra não reativa no teste *in vitro* elimina a necessidade da avaliação *in vivo*, pode-se dizer que haverá uma redução de cerca de 90%, no número de animais utilizados nestas avaliações.

De acordo com a tabela 22, dos 1861 animais utilizados, 1527 coelhos poderiam ser poupados se as observações abaixo fossem consideradas, pois as amostras que não apresentaram efeito para as linhagens celulares ou apresentaram halo de toxicidade até 1,0 cm (IZ=3), não provocaram irritação cutânea e ocular em animais. Somente as amostras graduadas como IZ=4, com halos de toxicidade bem maiores que 1,5 cm ou diâmetros de 3,4 cm promoveram irritação cutânea ou ocular nos coelhos. Estas amostras são do grupo de sabonetes líquidos e suas formulações contêm agentes tensoativos, substâncias conhecidamente irritantes (CORNELIUS, DUPONT e WEPIERRE, 1992).

As amostras 8 e 11 de sabonete líquido de uso infantil não apresentaram reação no olho do coelho, mas causaram efeito na linhagem celular NCTC clone 929 e FPC-IAL até a concentração de 10%, sendo que nesta ultima linhagem o efeito da amostra 11 permaneceu até a concentração

de 1%, com halo de 0,1 cm, graduado como IZ=2. Na linhagem celular SIRC quando detectado efeito tóxico na concentração de 10% este não se manteve na concentração de 1% (Tabelas 12 e 21).

As amostras de sabonete líquido de uso infantil 8, 9, 10 e 11 e a de uso adulto 17 não causaram efeito na pele do coelho, mas apresentaram efeito para a linhagem celular NCTC clone 929 até a concentração de 10% com halo de toxicidade de até 1,35 cm e diâmetro de até 3,2 cm. Quando mantiveram efeito na concentração de 1% o halo de toxicidade foi de 0,1 cm ou diâmetro de 0,7 cm, sendo graduado como IZ=2. Na linhagem FPC-IAL verificou-se efeito tóxico na concentração de 1% e halo de toxicidade de até 0,71 cm ou diâmetro de 1,92 cm e na linhagem SIRC na concentração de 10% o halo de toxicidade de até 0,92 cm ou diâmetro de 2,34 cm (Tabelas 12 e 21).

Quanto às linhagens celulares utilizadas, observa-se que a linhagem FPC-IAL foi a mais sensível, pois apresentou maior número de amostras com efeito tóxico, bem como halos de toxicidade maiores. O que pode ser atribuído ao fato desta linhagem ser diplóide e ter sido utilizada entre os repiques de número 20 a 30, ao contrário das outras duas linhagens que são culturas já estabelecidas e com número de passagens bem maior.

O coeficiente de correlação de Pearson (KLEINBAUM, KUPPER e MORGENSTERN, 1982) entre as linhagens celulares NCTC clone 929 e FPC-IAL, durante a avaliação das amostras de batom e de base facial na concentração de 100%, resultaram em valores altos, respectivamente de $r=0,94$ ($p=0,0001$) e $r=0,881$ ($p=0,001$). Também, foi encontrada correlação de $r=0,836$ ($p=0,001$) entre estas duas linhagens, quando foram avaliadas as amostras de sabonetes líquidos na concentração de 10% (Tabela 24). Estes cálculos só foram efetuados para as amostras que apresentaram maior número de resultados positivos.

Nas linhagens celulares NCTC clone 929 e SIRC foram encontradas correlações de $r=0,944$ ($p=0,001$) para as amostras de lápis para os olhos, quando avaliados na concentração de 100% e para as amostras de sabonetes

líquidos avaliadas na concentração de 10% e 1%, com valores respectivos de $r=0,605$ ($p=0,010$) e $r=0,557$ ($p=0,02$) (Tabela 24).

Estudos desenvolvidos por outros pesquisadores, mostraram as correlações de várias linhagens estabelecidas e linhagens recém isoladas, não se observando diferenças significativas entre as diversas linhagens utilizadas (SASAKI et al., 1991; PINTO, AZEVEDO e CRUZ, 2000). O presente estudo mostra coerência com este comportamento, ao se efetuar a comparação das linhagens FPC-IAL e SIRC com a NCTC clone 929.

Em relação às linhagens celulares FPC-IAL e SIRC, empregadas em paralelo na avaliação das amostras de sabonetes líquidos, não foi observada correlação significativa. Porém, foi constatado que a linhagem FPC-IAL apresentou novamente maior número de resultados positivos, além de maiores diâmetros de halos de toxicidades (Tabela 12). Esta observação pode estar relacionada com os estudos de CORNELIS, DUPONT e WEPIERRE (1992), que após compararem fibroblastos de pele humana com queratinócitos concluíram que os fibroblastos são mais sensíveis. Interpretaram o fato com base na similaridade entre os queratinócitos e as células da córnea quanto à origem epitelial, sendo que a função principal dos queratinócitos é de barreira protetora.

A correlação entre o método de difusão em ágar e os métodos *in vivo* foi calculada utilizando os valores dos diâmetros dos halos de toxicidade, pois estas medidas, segundo outros autores, forneceram melhores resultados na comparação com os testes de irritação ocular (O'BRIEN et al., 1994; EARL et al., 1995; HARBELL et al., 1997).

De acordo com a Tabela 25 observa-se que os resultados encontrados no método de difusão em ágar quando comparados com os índices de irritação primária, não revelaram correlações significantes, mesmo utilizando diferentes linhagens celulares e concentrações das amostras. Quanto ao método de difusão em ágar e o de irritação ocular, observou-se algumas correlações significantes, tanto utilizando os índices individuais dos tecidos oculares, quanto o índice total de irritação ocular (Tabela 26 e 27).

Os valores dos índices de correlação, obtidos nas linhagens e no teste *in vivo*, não indicaram relação mais próxima entre a origem da linhagem celular e o local alvo do teste *in vivo*, contrariando conclusões de outros estudos (WATANABE et al., 1989; LEE et al., 2000).

O método de difusão em ágar, foi utilizado por outros autores na avaliação de cosméticos ou suas matérias primas, como método substituto dos ensaios de irritação ocular e cutânea. WALLIN, HUME e JACKSON (1987), após avaliarem produtos cosméticos concluíram que o método apresenta uma correlação positiva com o teste de irritação ocular, mas não com o teste de irritação dérmica. O'BRIEN, JONES e ROCKLEY (1990) avaliaram formulações de cosméticos baseadas em agentes tensoativos e concluíram que, em relação aos testes de irritação ocular, os resultados eram encorajadores. Estas observações foram corroboradas pelo presente estudo, em que se utilizou maior número de amostras e diferentes linhagens celulares.

HARBELL et al. (1997) avaliaram produtos à base de agentes tensoativos e encontraram correlações semelhantes para os índices de irritação da córnea e conjuntiva, mas para a íris observaram índices de correlação maiores, ao contrario dos obtidos neste estudo, onde os índices de irritação para íris foram baixos e sem significância para as três linhagens celulares utilizadas.

No presente estudo, os melhores valores de correlação com significância, entre o método de difusão em ágar e o teste de irritação ocular, foram obtidos quando as amostras de sabonetes líquidos foram avaliadas nas concentrações de 10% e 1%. Dados semelhantes foram observados por outros autores quando avaliaram produtos contendo agentes tensoativos, na concentração de 10%, empregando a linhagem celular NCTC clone 929 (O'BRIEN et al., 1994; EARL et al., 1995). Entretanto, ROUGIER et al. (1994), quando utilizaram este método com células de fibroblasto de pulmão para avaliar a irritação ocular de produtos cosméticos, não obtiveram correlações significantes.

Na tabela 28 pode ser observado que, para o conjunto de todas as amostras, as porcentagens de sensibilidade e especificidade foram altas para as diferentes linhagens celulares utilizadas, tanto em relação ao teste de irritação ocular quanto ao de irritação cutânea. Segundo GETTINGS et al. (1996a), resultados como estes, podem garantir que o método de difusão em agar, atende ao propósito de avaliar a segurança de produtos, pois oferece a capacidade de detectar falsos negativos e positivos.

O método de captura do vermelho neutro foi utilizado, com o objetivo de verificar seu desempenho e investigar se apresentaria melhor correlação com os testes de irritação cutânea e ocular, em relação ao método de difusão em ágar (Figura 21). Este método vem sendo utilizado por vários autores nos estudos de citotoxicidade *in vitro*, para estimar as doses iniciais na avaliação da toxicidade aguda, na avaliação da segurança de componentes, formulações e produtos terminados, entre outras aplicações. A maior restrição deste método é quanto ao tipo de material avaliado, o qual deve ser hidrossolúvel ou pelo menos miscível em água (BALLS et al., 1995; HARBELL et al., 1997; INTERAGENCY, 2001; EVANS et al., 2001). Já no método de difusão em ágar, vários tipos de materiais podem ser utilizados, abrangendo sólidos, pós e líquidos, além de formulações hidrossolúveis, lipossolúveis e com amplos espectros de propriedades físico-químicas (HARBELL et al., 1997).

De acordo com a Tabela 23 e a Figura 20, pode ser observado que as amostras de sabonete líquido, no teste de captura do vermelho neutro, apresentaram efeito até concentrações bem menores que as utilizadas no método de difusão em ágar, para as três linhagens celulares empregadas. Este comportamento talvez ocorra, porque a amostra entra em contato direto com a monocamada celular, aumentando a intensidade de resposta das culturas celulares. Os resultados obtidos neste método quando comparados com os dos testes *in vivo*, mostram que na linhagem celular NCTC clone 929, as amostras que apresentaram valores de IC_{50} menores que 0,058% apresentaram irritação cutânea e aquelas cujos valores foram menores que 0,064% apresentaram irritação ocular. Na linhagem celular FPC-IAL, as amostras com valores menores que 0,051% e 0,063% apresentaram irritação cutânea e ocular

respectivamente, com exceção da amostra 17 que não apresentou irritação cutânea e cujo IC_{50} foi 0,068%. Já na linhagem celular SIRC, para os valores inferiores a 0,061% as amostras apresentaram irritação cutânea e quando igual ou abaixo de 0,079% apresentaram irritação ocular, com exceção da amostra oito, cujo IC_{50} foi de 0,077% e não apresentou irritação ocular. Estes dados estão de acordo com aqueles obtidos nos estudos de BAGLEY et al., (1992a), onde foi observado que quanto mais as amostras produziam irritação *in vivo* mais efeito causavam nas culturas celulares, assim como para alguns dos outros sistemas utilizados. Os autores também observaram que o método de captura do vermelho neutro é sensível, rápido e barato e pode ser considerado promissor na seleção de substâncias que causem irritação ocular.

Comparando os resultados obtidos com as distintas linhagens celulares, pode se observar novamente que a linhagem FPC-IAL demonstrou ser mais sensível, pois apresentou em geral IC_{50} em concentrações menores que as outras linhagens, isto é, pequena quantidade da amostra foi suficiente para matar 50% da população celular. Entretanto, os valores dos índices de correlação de Pearson obtidos entre as três linhagens demonstram que elas apresentam correlações altamente significantes (Tabela 29). Baseando-se nestas observações e comparando os resultados obtidos nas três linhagens celulares e nos testes *in vivo* pode-se inferir que as amostras de sabonetes líquidos testadas, tanto de uso adulto quanto infantil que apresentaram IC_{50} maior que 0,085%, não induziram irritação cutânea ou ocular nos coelhos.

Esta concentração foi utilizada como valor de corte entre características irritante e não irritante e verificou-se que o método apresentou altas porcentagens de sensibilidade e baixa especificidade, tanto para avaliação de irritação ocular como cutânea (Tabela 32). Os dados obtidos, principalmente em relação a irritação ocular, confirmam os resultados de outros pesquisadores e indicam que esta metodologia pode ser utilizada como alternativa na triagem de produtos irritantes (GETTINGS et al., 1994; EARL et al., 1995; GETTINGS et al., 1996a).

De acordo com a Tabela 30 observa-se que este método apresentou correlações inversas significantes com o teste de irritação cutânea quando utilizadas as linhagens NCTC clone 929 e SIRC, mas para a linhagem celular FPC-IAL apresentou correlação não significante. Os dados obtidos neste estudo demonstram que não existe maior afinidade entre o teste de irritação cutânea e a célula alvo, ao contrário do que foi reportado por LEE et al., (2000). Em seus estudos, estes autores observaram boa correlação entre o método de captura de vermelho neutro usando fibroblasto de pele humana e o teste de irritação cutânea em seres humanos.

Em relação ao teste de irritação ocular (Tabela 31), o método de captura do vermelho neutro apresentou correlações inversas significantes para as três linhagens celulares utilizadas, demonstrando que não há diferença entre a célula alvo e as de outras origens. Também, foram observadas correlações inversas altamente significantes para as três linhagens celulares empregadas em relação aos índices de irritação individual da córnea e da conjuntiva. Quanto ao índice de irritação da íris, semelhante ao método de difusão em ágar, foram observados índices de correlação baixos, sem significância (Tabela 31).

Estes resultados, com exceção da íris foram semelhantes aos encontrados nos estudos realizados por TANI et al. (1999), quando utilizaram este método e a linhagem celular SIRC para avaliar diferentes ingredientes de cosméticos. HARBELL et al. (1997) investigaram o desempenho de vários testes de citotoxicidade, o método de captura do vermelho neutro foi avaliado utilizando outra linhagem celular e apresentou resultados semelhantes. Estes dados levaram os autores à conclusão de que o método de captura do vermelho neutro pode ser utilizado como parte de uma bateria de testes para selecionar produtos irritantes oculares. Entretanto, BALLS et al. (1995) em seus estudos de validação de métodos alternativos ao teste de irritação ocular, concluiu que este método não apresentou alta reprodutibilidade entre laboratórios.

Nos resultados reportados por UCHIYAMA et al. (1999) quando utilizaram células epiteliais de córnea, os valores dos índices de correlação foram mais baixos. Estes autores defendem que tal diferença pode estar relacionada com o uso do meio de cultura sem soro, ao contrario de outros estudos, nos quais o meio de cultura era suplementado com soro (CHIBA et al., 1999; OKUMURA et al., 1999).

Baseado nos comentários de diferentes autores (WALLIN, HUME e JACKSON, 1987; O'BRIEN et al., 1994; ONHO et al., 1999) e avaliando os resultados dos dois métodos *in vitro* em relação aos testes *in vivo*, pode se afirmar que apesar dos dois métodos muitas vezes não apresentarem altas correlações, eles têm capacidade de predizer a irritação cutânea e ocular e podem ser utilizados com segurança, na triagem de produtos cosméticos. Desta maneira, podem constituir em contribuição importante na avaliação da toxicidade aguda destes produtos, diminuindo ou mesmo eliminando os testes *in vivo*. Entretanto, permanece ainda, a problemática quanto à toxicidade crônica e à avaliação da reversibilidade dos efeitos das doses repetidas (COMBES 1999).

COURTELLERMONT et al. (1999), enfatizam que a toxicidade dos produtos terminados raramente traduzem a soma de cada ingrediente e modelos seguros devem ser desenvolvidos para testar de forma prioritária, as formulações e não os ingredientes, como acontece em muitos estudos. Desta forma, avaliar a qualidade e o grau de segurança dos produtos cosméticos nacionais, além de contribuir com a Saúde Pública, visa verificar se os métodos *in vitro* atendem ao propósito de garantir a segurança destes produtos.

Segundo a Portaria 71 de 29 de maio de 1996 (BRASIL, 1996), todos os produtos avaliados neste estudo estão classificados como Grau de Risco 1, com exceção de quatro sabonetes líquidos que, por serem de uso infantil são classificados como Grau de Risco 2. Em obediência ao aspecto legal, todos os produtos traziam na embalagem a composição qualitativa dos ingredientes e o número do registro ou da autorização de funcionamento do Ministério da Saúde.

Quanto aos atributos apresentados na rotulagem, seis amostras traziam os termos dermatologicamente e/ou clinicamente testado e oito faziam referências ao pH neutro, fisiológico ou pH da pele. No presente estudo, estes dados não apresentaram relação com os resultados dos testes de irritação cutânea e ocular.

Com exceção das amostras de sabonetes líquidos, todas as outras avaliadas não apresentaram qualquer problema quanto à segurança, no que se refere à avaliação de irritação *in vivo*. Já as amostras de sabonetes líquidos, de uso adulto, todas apresentaram irritação ocular e a maioria apresentou irritação cutânea. Das quatro amostras de uso infantil e, portanto classificadas como Grau de Risco 2, duas não apresentaram irritação ocular e cutânea, as outras duas apresentaram irritação ocular. Estes fatos podem evidenciar a não conformidade com a legislação nacional e no âmbito da Saúde Pública, pois estes produtos disponíveis no mercado, mesmo sendo classificados como Grau de Risco 1 devem garantir o bem estar do consumidor.

Pode-se observar que o controle dos produtos disponíveis no mercado é de extrema importância, pois os órgãos competentes devem constatar se todos os produtos continuam mantendo a qualidade proposta no momento da notificação ou do registro na ANVISA. Isto decorre do fato de que se tem grande número de relatos, na literatura, de produtos que causam irritação, principalmente na pele e na área dos olhos (DRAELOS, 2001; WOLF, 2001; WOLF et al., 2001).

Ainda, visualizando os resultados da comparação *in vivo/in vitro*, pode-se dizer que as ações de vigilância serão mais rápidas e eficazes se os produtos forem avaliados pelos métodos *in vitro*, os quais fornecem respostas em tempo e com custos menores quando comparados com ensaios em animais, que até o momento são oficialmente obrigatórios. Além destas vantagens, os laboratórios nacionais poderão contribuir com a redução e a substituição dos animais, questão debatida mundialmente pela comunidade científica e organizações não governamentais.

7 - CONCLUSÃO

1. As amostras que não apresentam citotoxicidade/reatividade biológica *in vitro* nas linhagens celulares não ocasionam irritação cutânea ou ocular nos coelhos. As linhagens celulares apresentaram maior sensibilidade, uma vez que após sucessivas diluições da amostra, ainda se observa efeito tóxico.
2. Os produtos cosméticos que apresentam citotoxicidade/reatividade biológica *in vitro* até índice de zona 3, de acordo com a Farmacopéia Americana, não apresentam irritação cutânea, ocular e de mucosa para o coelho.
3. Os métodos *in vitro*, empregando as três linhagens celulares, apresentam correlação significativa com o teste de irritação ocular, tanto para os índices totais quanto para os valores de irritação individual da córnea e conjuntiva.
4. O método de captura do vermelho neutro apresenta correlação significativa com o teste de irritação cutânea, quando utilizadas as linhagens celulares NCTC clone 929 e SIRC.
5. Os resultados obtidos entre as linhagens celulares FPC-IAL- NCTC clone 929 e SIRC-NCTC clone 929 apresentam alta correlação.
6. Os resultados obtidos nos dois métodos *in vitro*, difusão em ágar e captura do vermelho neutro, demonstram que não há relação entre a origem da linhagem celular e o tecido alvo utilizado no teste *in vivo*.
7. Das amostras comercialmente avaliadas somente os sabonetes líquidos foram insatisfatórios, quanto a segurança do consumidor.

8. O método de difusão em ágar quando comparado com o de captura do vermelho neutro demonstra maior praticidade e menor custo. Este método, usando a graduação da Farmacopéia Americana, pode ser adotado como ensaio de triagem pelos órgãos oficiais, para ações de vigilância, de orientação e na avaliação da toxicidade de produtos cosméticos. Pois apresentam sensibilidade e capacidade para predizer a irritação, contribuindo significativamente para a redução dos ensaios que utilizam os animais.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Committee F-4 on Medical and Surgical Materials and Devices. **Cell culture test methods**. Philadelphia: ASTM, 1983. 161p. (ASTM-STP, 810).
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Standard test method for agar diffusion cell culture screening for cytotoxicity: designation: F 895-84. Philadelphia: ASTM, 1995, p.276-279.
- AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. **Quality control methods for cell lines**. 2.ed. Rockville: ATCC, 1992. 132p.
- AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. **Catalogue of cell lines & hybridomas**. 8.ed. Rockville: ATCC, 1994. 637p.
- AZEVEDO, J.C. Avaliação de metodologia alternativa *in vitro* ao teste de irritação ocular de Draize. São Paulo, 1998. 145p. (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).
- BABICH, H., BABICH, J.P. Sodium lauryl sulfate and triclosan: *in vitro* cytotoxicity studies with gingival cells. **Toxicol. Lett.**, Shannon, v.91, p.189-196, 1997.
- BABICH, H., BORENFREUND, E. Cytotoxic and morphological effects of phenylpropanolamine, caffeine, nicotine, and some of their metabolites studied *in vitro*. **Toxicol. In Vitro**, Oxford, v.6, n.6, p.493-502, 1992.
- BAGLEY, D.M., BOTHAM, P.A., GARDNER, J.R., HOLLAND, G., KREILING, R., LEWIS, R.W., STRINGER, D.A., WALKER, A.P. Eye irritation: reference chemicals data bank. **Toxicol. In Vitro**, Oxford, v.6, p.487-491, 1992b.
- BAGLEY, D.M., BRUNER, L.H., SILVA, O., COTTIN, M., O'BRIEN, K.A.F., UTTLEY, M., WALKER, A.P. An evaluation of five potential alternatives *in vitro* to the rabbit eye irritation test *in vivo*. **Toxicol. In Vitro**, Oxford, v.6, n.4, p.275-284, 1992a.

De acordo com a NBR6023/2000, preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI), 2001.

- BAGLEY, D.M., GARDNER, J.R., HOLLAND, G., LEWIS, R.W., REGNIER, J.F., STRINGER, D.A., WALKER, A.P. Skin irritation: reference chemicals data bank. **Toxicol. In Vitro**, Oxford, v.10, p.1-6, 1996.
- BALLS, M. Scientific validation: a crucial and unavoidable prerequisite to the acceptability of new tests and testing strategies. **ATLA, Altern. Lab. Anim.**, Nottingham, v.23, p.474-479, 1995.
- BALLS, M., BOTHAM, P.A., BRUNER, L.H., SPIELMANN, H. The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. **Toxicol. In Vitro**, Oxford, v.9, n.6, p.871-929, 1995.
- BALLS, M., FENTEM, J.H. The validation and acceptance of alternatives to animal testing. **Toxicol. In Vitro**, Oxford, v.13, p.837-846, 1999.
- BALSAM, M.S., SANGARIN, E., eds. **Cosmetics science and technology**. 2.ed. New York: London, 1972. v.1, p.393-421.
- BARRATT, M.D. QSARS for the eye irritation potential of neutral organic chemicals. **Toxicol. In Vitro**, Oxford, v.11, p.1-8, 1991.
- BARRATT, M.D., BRANTOM, P.G., FENTEM, J.H., GERNER, I., WALKER, A.P., WORTH, A.P. The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals. **Toxicol. In Vitro**, Oxford, v.12, p.471-482, 1998.
- BARRELA, C., ROQUE, J., SILVA, T. Métodos alternativos à experimentação animal na indústria de cosméticos. Disponível em: <http://www.fmv.utl.pt/democ/sft/sem0001/G23.html>. Acesso em: 16 jan. 2002.
- BECKLEY, J.H., RUSSEL, T.J., RUBIN, L.F. Use of rhesus monkey for predicting human response to eye irritants. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, Orlando, v.15, p.1-9, 1969.
- BENY, M.G. Fisiologia da pele. **Cosmet. Toiletries, Ed. Port.**, São Paulo, v.12, p.44-50, 2000.
- BORENFREUND, E., BABICH, H., MARTIN-ALGUACIL, N. Comparisons of two *in vitro* cytotoxicity assays- the neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. **Toxicol. In Vitro**, Oxford, v.2, n.1, p.1-6, 1988.
- BORENFREUND, E., PUERNER, J.A. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). **J. Tissue Cult. Methods**, Gaithersburg, v.9, n.1, p.7-9, 1984.
- BORENFREUND, E., PUERNER, J.A. Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. **Toxicol. Lett.**, Shannon, v.24, p.119-124, 1985.
- BOTHAM, P., OSBORNE, R., ATKINSON, K., CARR, G., COTTIN, M., VAN BUSKIRK, R.G. Cell function-based assays. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.35, p.67-77, 1997.

- BRADLAW, J.A., WILCOX, N.L. Workshop on eye irritation testing: Practical applications of non-whole animal alternatives. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.35, p.1-11, 1997.
- BRANTOM, P.G., BRUNER, L.H., CHAMBERLAIN, M., SILVA, O., DUPUIS, J., EARL, L.K., LOVELL, D.P., PAPE, W.J.W., UTTLEY, M., BAGLEY, D.M., BAKER, F.W., BRACHER, M., COURTELLEMONT, P., DECLERCQ, L., FREEMAN, S., ATEILING, W., WALKER, A.P., CARR, G.J., DAMI, N., THOMAS, G., HARBELL, J., JONES, P.A., PFANNENBECKER, U., SOUTHEE, J.A., TCHENG, M., ARGEMBEAUX, H., CASTELLI, D., CLOTHIER, R., ESDAILE, D.J., ITIGAKI, H., JUNG, K., KASAI, Y., KOJIMA, H., KRISTEN, U., LARNICOL, M., LEWIS, R.W., MARENUS, K., MORENO, O., PETERSON, A., RASMUSSEN, E.S., ROBLES, C., STERN, M. A summary report of the COLIPA international validation study on alternatives to the Draize rabbit eye irritation test. **Toxicol. In Vitro**, Oxford, v.11, p.141-179, 1997.
- BRASIL. Decreto n.79094, de 5 de janeiro de 1977. O Ministério da Saúde submete ao sistema de vigilância sanitária os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, produtos de higiene, saneantes e outros. **Diário Oficial da União**, Brasília, 5 jan. 1977. Seção 1, p.133-147.
- BRASIL. Portaria n.71, de 29 de maio de 1996. O Ministério da Saúde atualiza as normas e procedimentos referentes à autorização de funcionamento de empresas e registro de produtos de higiene pessoal, cosméticos, perfumes e outros. **Diário Oficial da União**, Brasília, n.107, 4 jun. 1996. Seção 1, p.9821-9838.
- BRASIL. Resolução n.335, de 22 de julho de 1999. O Ministério da Saúde estabelece a reorganização do sistema de controle sanitário de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. **Diário Oficial da União**, Brasília, n.140, 23 jul. 1999. Seção 1, p.67-68.
- BRASIL. Resolução n.79, de 28 de agosto de 2000. O Ministério da Saúde estabelece a definição e classificação de produtos de higiene pessoal, cosméticos, perfumes e outros. **Diário Oficial da União**, Brasília, n.169, 31 ago. 2000. Seção 1, p.34-50.
- BRASIL. Resolução RDC n.38, de 21 de março de 2001. O Ministério da Saúde aprova o regulamento técnico para produtos cosméticos de uso infantil, constante do anexo desta resolução. **Diário Oficial da União**, Brasília, n.57, 22 mar. 2001. Seção 1, p.16-17.
- BRUNER, L.H., CARR, G.J., CHAMBERLAIN, M., CURREN, R.D. Validation of alternative methods for toxicity testing. **Toxicol. In Vitro**, Oxford, v.10, p.479-501, 1996.
- BRUNER, L.H., EVANS, M.G., McPHERSON, J.P., SOUTHEE, J.A., WILLIAMSON, P.S. Investigation of ingredient interactions in cosmetic formulations using isolated bovine corneas. **Toxicol. In Vitro**, Oxford, v.12, p.669-690, 1998.
- CADE, P. Avaliação da ação antiirritante, comparação entre métodos *in vivo* e *in vitro*. **Cosmet. Toiletries, Ed. Port.**, São Paulo, v.2, p.13-17, 1990.
- CASTRO, M.P. Cultura de células de tecido animal: um esboço histórico. **Publ. ACIESP**, São Paulo, n.10, p.i-v, 1978. [Prefácio].

- CHAMBERLAIN, M., GAD, S.C., GAUTHERON, P., PRINSEN, M.K. Organotypic models for the assessment/prediction of ocular irritation. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.35, p.23-37, 1997.
- CHAMBERLAIN, M., PARISH, W.E. Hazard and risk based on *in vitro* test data. **Toxicol. In Vitro**, Oxford, v.4, n.4/5, p.694-697, 1990.
- CHIBA, K., MAKINO, I., OHUCHI, J., KASAI, Y., KAKISHIMA, H., TSUKUMO, K., UCHIYAMA, T., MIYAI, E., AKIYAMA, J., OKAMOTO, Y., KOJIMA, H., OKUMURA, H., TSURUMI, Y., USAMI, M., KATOH, K., SUGIURA, S., KURISHITA, A., SUNOUCHI, M., MIYAJIMA, A., HAYASHI, M., OHNO, Y. Interlaboratory validation of the *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients (9): evaluation of cytotoxicity test on Hela cells. **Toxicol. In Vitro**, Oxford, v.13, p.189-198, 1999.
- CHIBA, K., KAWAKAMI, K., TOHYAMA, K. Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells. **Toxicol. In Vitro**, Oxford, v.12, p.251-258, 1998.
- CIAPETTI, G., GRANCHI, D., VERRI, E., SAVARINO, L., CAVEDAGNA, D., PIZZOFERRATO, A. Application of a combination of neutral red and amido black staining for rapid, reliable cytotoxicity testing of biomaterials. **Biomaterials**, Oxford, v.17, n.13, p.1259-1264, 1996.
- CLOTHIER, R., STARZEC, G., STIPHO, S., KWONG, Y.C. Assessment of initial damage and recovery following exposure of MDCK cells to an irritant. **Toxicol. In Vitro**, Oxford, v.13, p.713-717, 1999.
- COMBES, R.D. Summary of discussion: *in vitro* models for investigation of chronic toxicity and reversibility. **Toxicol. In Vitro**, Oxford, v.13, p.853-857, 1999.
- COMBRIER, E., CASTELLI, D. The agarose overlay method as a screening approach for ocular irritancy: application to cosmetic products. **ATLA, Altern. Lab. Anim.**, Nottingham, v.20, n.3, p.438-444, 1992.
- COMMON access to biological resources and information. Guidelines. Animal and human cell lines. Disponível em: <http://www.cabri.org>. Acesso em: 10 mar. 2000.
- COOPER, K.J., EARL, L.K., HARBELL, J., RAABE, H. Prediction of ocular irritancy of prototype shampoo formulations by the isolated rabbit eye (IRE) test, and bovine corneal opacity and permeability (BCOP) assay. **Toxicol. In Vitro**, Oxford, v.15, p.95-103, 2001.
- COOPER, J.A., SARACI, R., COLEP, P. Describing the validity of carcinogen screening test. **British Journal of Cancer**, v.39, p.87-89, 1979. APUD: EARL, L.K., JONES, P.A., DIXIT, M.B., O'BRIEN, K.A.F. Comparison of five potential methods for assessing ocular irritation *in vitro*. **Toxicol. In Vitro**, Oxford, v.9, n.3, p.245-250, 1995.
- CORNELIS, M., DUPONT, C., WEPIERRE, J. Prediction of eye irritancy potential of surfactants by cytotoxicity tests *in vitro* on cultures of human skin fibroblasts and keratinocytes. **Toxicol. In Vitro**, Oxford, v.6, n.2, p.119-128, 1992.

- COURTELLEMONT, P., HEBERT, P., BIESSE, J.P., CASTELLI, D., FRITEAU, L., SERRANO, J., ROBLES, C. Relevance and reliability of the PREDISAFE assay in the COLIPA eye irritation validation program (phase 1). **Toxicol. In Vitro**, Oxford, v.13, p.305-312, 1999.
- CRONIN, M.T.D., BASKETTER, D.A., YORK, M. A quantitative structure-activity relationship (QSAR) investigation of a Draize eye irritation database. **Toxicol. In Vitro**, Oxford, v.8, n.1, p.21-28, 1994.
- CURREN, R.D., SINA, J.F., FEDER, P., KRUSZEWSKI, F.H., OSBORNE, R., RÉGNIER, J.F. Other assays. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.35, p.127-158, 1997.
- DE ANGELIS, I., GIUBILEI, L., STAMMATI, A., ZAMPAGLIONI, F., ZUCCO, F., BARTOLINI, G., SALVATORE, G. *In vitro* toxicity of some cosmetic ingredients. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.24, n.6/7, p.477-479, 1986.
- DICKSON, F.M., LAWRENCE, J.N., BENFORD, D.J. Surfactant-induced cytotoxicity in cultures of human keratinocytes and a commercially available cell line (3T3). **Toxicol. In Vitro**, Oxford, v.7, n.4, p.381-384, 1993.
- DOYLE, A., GRIFFITHS, J.B., NEWELL, D.G. **Cell and tissue culture: laboratory procedures**. New York: Chichester: John Wiley, 1994. v.1-2, s.p.
- DRAELOS, Z.D. Special considerations in eye cosmetics. **Clin. Dermatol.**, Philadelphia, v.19, p.424-430, 2001.
- DRAIZE, J.H., WOODARD, G., CALVERY, H.O., Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, Bethesda, v.82, p.377-390, 1944.
- EARL, L.K., DICKENS, A.D., ROWSON, M.J. A critical analysis of the rabbit eye irritation test variability and its impact on the validation of alternative methods. **Toxicol. In Vitro**, Oxford, v.11, p.295-304, 1997.
- EARL, L.K., JONES, P.A., DIXIT, M.B., O'BRIEN, K.A.F. Comparison of five potential methods for assessing ocular irritation *in vitro*. **Toxicol. In Vitro**, Oxford, v.9, n.3, p.245-250, 1995.
- EISENBRAND, G., POOL-ZOBEL, B., BAKER, V., BALLS, M., BLAAUBOER, B.J., BOOBIS, A., CARERE, A., KEVEKORDES, S., LHUGUENOT, J.-C., PIETERS, R., KLEINER, J. Methods of *in vitro* toxicology. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.40, p.193-236, 2002.
- EVANS, S.M., CASARTELLI, A., HERREROS, E., MINNICK, D.T., DAY, C., GEORGE, E., WESTMORELAND, C. Development of a high throughput *in vitro* toxicity screen predictive of high acute *in vivo* toxic potential. **Toxicol. In Vitro**, Oxford, v.15, p.579-584, 2001.
- FDA.U.S. Food and Drug Administration. **Animal testing**. Disponível em: <http://vm.cfsan.fda.gov/~dms/cos-205html>. Acesso em: 8 mar. 2001.

- FENTEM, J.H., ARCHER, G.E.B., BALLS, M., BOTHAM, P.A., CURREN, R.D., EARL, L.K., ESDAILE, D.J., HOLZHUTTER, H.G., LIEBSCH, M. The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the management team. **Toxicol. In Vitro**, Oxford, v.12, p.483-524, 1998.
- FENTEM, J.H., BRIGGS, D., CHESNÉ, C., ELLIOTT, G.R., HARBELL, J.W., HEYLINGS, J.R., PORTES, P., ROGUET, R., VAN DE SANDT, J.J.M., BOTHAM, P.A. A prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: results and evaluation by the management team. **Toxicol. In Vitro**, Oxford, v.15, p.57-93, 2001.
- FRESHNEY, R.I. **Culture of animal cells**: a manual of basic technique. 2.ed. New York: Wiley-Liss, 1987. 397p.
- GAUTHERON, P., GIROUX, J., COTTIN, M., AUDEGOND, L., MORILLA, A., MAYORDOMO-BLANCO, L., TORTAJADA, A., HAYNES, G., VERICAT, J.A., PIROVANO, R., GILLIO TOS, E., HAGEMANN, C., VANPARYS, P., DEKNUDT, G., JACOBS, G., PRINSEN, M., KALWEIT, S., SPIELMANN, H. Interlaboratory assessment of the bovine corneal opacity and permeability (BCOP) assay. **Toxicol. In Vitro**, Oxford, v.8, n.3, p.381-392, 1994.
- GETTINGS, S.D., DIPASQUALE, L.C., BAGLEY, D.M., CASTERTON, P.L., CHUDKOWSKI, M., CURREN, R.D., DEMETRULIAS, J.L., FEDER, P.I., GALLI, C.L., GAY, R., GLAZA, S.M., HINTZE, K.L., JANUS, J., KURTZ, P.J., LORDO, R.A., MARENUS, K.D., MORAL, J., MUSCATIELLO, M., PAPE, W.J.W., RENSKERS, K.J., RODDY, M.T., ROZEN, M.G. The CTFA evaluation of alternatives program: an evaluation of *in vitro* alternatives to the Draize primary eye irritation test. (Phase II) oil/water emulsions. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.32, n.10, p.943-976, 1994.
- GETTINGS, S.D., LORDO, R.A., DEMETRULIAS, J., FEDER, P.I., HINTZE, K.L. Comparison of low-volume, Draize and *in vitro* eye irritation test data. I. Hydroalcoholic formulations. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.34, p.737-749, 1996b
- GETTINGS, S.D., LORDO, R.A., HINTZE, K.L., BAGLEY, D.M., CASTERTON, P.L., CHUDKOWSKI, M., CURREN, R.D., DEMETRULIAS, J.L., DIPASQUALE, L.C., EARL, L.K., FEDER, P.I., GALLI, C.L., GLAZA, S.M., GORDON, V.C., JANUS, J., KURTZ, P.J., MARENUS, K.D., MORAL, J., PAPE, W.J.W., RENSKERS, K.J., RHEINS, L.A., RODDY, M.T., ROZEN, M.G., TEDESCHI, J.P., ZYRACKI, J. The CFTA evaluation of alternatives program: an evaluation of *in vitro* alternatives to the Draize primary eye irritation test. (Phase III) Surfactant-based formulations. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.34, n.1, p.79-117, 1996a.
- GETTINGS, S.D., LORDO, R.A., FEDER, P.I., HINTZE, K.L. A comparison of low volume, Draize and *in vitro* eye irritation test data. II. Oil/water emulsions. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.36, p.47-59, 1998.
- GOLDBERG, A.M. Alternativas em toxicologia. **Cosmet. Toiletries, Ed. Port.**, São Paulo, v.3, p.25-29, 1991.
- GORDON, V.C. The scientific basis of the EYTEX system. **ATLA, Altern. Lab. Anim.**, Nottingham, v.20, p.537-548, 1992.

- GORDON, V.C., KELLY, C.P., REALICA, B. Determinação de irritação ocular e dérmica por métodos "in vitro". **Cosmet. Toiletries, Ed. Port.**, São Paulo, v.3, p.30-34, 1991.
- GSTRAUNTHALER, G. Standardisation in tissue culture: where to start? In: WORKSHOP OF STANDARDISATION AND CELL CULTURE PROCEDURES, 18, WORLD CONGRESS ON ALTERNATIVES AND ANIMAL USE IN THE LIFE SCIENCES, 3, Bologna, 1999. **Programme and abstracts**. Bologna: Editora, 1999, s.p.
- GSTRAUNTHALER, G., HARTUNG, T. Bologna declaration toward good cell culture practice. In: WORKSHOP OF STANDARDISATION AND CELL CULTURE PROCEDURES, 18, WORLD CONGRESS ON ALTERNATIVES AND ANIMAL USE IN THE LIFE SCIENCES, 3, Bologna, 1999. **Programme and abstracts**. Bologna: Editora, 1999, s.p.
- GUESS, W.L., ROSENBLUTH, S.A., SCHMIDT, B., AUTIAN, J. Agar diffusion method for toxicity screening of plastics on cultured cell monolayers. **J. Pharm. Sci.**, New York, v.54, p.1545-1547, 1965.
- HARBELL, J.W., KOONTZ, S.W., LEWIS, R.W., LOVELL, D., ACOSTA, D. Cell cytotoxicity assays. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.35, p.79-126, 1997.
- HOCKLEY, K., BAXTER, D. Use of the 3T3 cell-neutral red uptake assay for irritants as an alternative to the rabbit (Draize) test. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.24, n.6/7, p.473-475, 1986.
- HUGGETT, A.C., SCHILTER, B., ROBERFROID, M., ANTIGNAC, E., KOEMAN, J.H. Comparative methods of toxicity testing. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.34, n.2, p.183-192, 1996.
- HUSOY, T., SYVERSEN, T., JENSSEN, J. Comparisons of four *in vitro* cytotoxicity tests: the MTT assay, NR assay, uridine incorporation and protein measurements. **Toxicol. In Vitro**, Oxford, v.7, n.2, p.149-154, 1993.
- INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **Manual da qualidade**: ensaio de irritação ocular: N.65.3330.004. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2001a. 13p.
- INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **Manual da qualidade**: ensaio de irritação cutânea primária: N.65.3330.003. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2001b. 15p.
- INTERAGENCY COORDINATING COMMITTEE ON THE VALIDATION OF ALTERNATIVE METHODS, NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM, INTERAGENCY CENTER FOR THE EVALUATION OF ALTERNATIVE TOXICOLOGICAL METHODS. **Guidance document on using *in vitro* data to estimate *in vivo* starting doses for acute toxicity**. S.I.: ICCVAM/NTP/NICEATM, 2001. 1v. (NIH Publication, n.01-4500).
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARTIZATION. **ISO 10.993-5**: Biological evaluation of medical devices. Part 5. Test for cytotoxicity: *in vitro* methods. Geneva: ISO, 1992. 7p.

- ITAGAKI, H., HAGINO, S., KATO, S., KOBAYASHI, T., UMEDA, M. An *in vitro* alternative to the Draize eye-irritation test: evaluation of the crystal violet staining method. **Toxicol. In Vitro**, Oxford, v.5, n.2, p.139-143, 1991.
- JESTER, J.V., LI, L., MOLAI, A., MAURER, J.K. Extent of initial corneal injury as a basis for alternative eye irritation tests. **Toxicol. In Vitro**, Oxford, v.15, p.115-130, 2001.
- KAY, J.H., CALANDRA, J.C. Interpretation of eye irritation tests. **J. Soc. Cosmet. Chem.**, New York, v.13, p.281-289, 1962.
- KLEINBAUM, D.G., KUPPER, L.L., MORGENSTERN, H. **Epidemiologic research. Principles and quantitative methods**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1982. 529p.
- KOJIMA, H., HANAMURA, A., MIYAMOTO, S., SATO, A., KONISHI, H., YOSHIMURA, I. Evaluation of seven alternative assays on the main ingredients in cosmetics as predictors of Draize eye irritation scores. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v.9, n.3, p.333-340, 1995.
- LAWRENCE, J.N. Application of *in vitro* human skin models to dermal irritancy: a brief overview and future prospects. **Toxicol. In Vitro**, Oxford, v.11, p.305-312, 1997.
- LEE, J.K., KIM, D.B., KIM, J.I., KIM, P.Y. *In vitro* cytotoxicity tests on cultured human skin fibroblasts to predict skin irritation potential of surfactants. **Toxicol. In Vitro**, Oxford, v.14, p.345-349, 2000.
- LEWIS, R.W., McCALL, J.C., BOTHAM, P.A. A comparison of two cytotoxicity tests for predicting the ocular irritancy of surfactants. **Toxicol. In Vitro**, Oxford, v.7, n.2, p.155-158, 1993.
- LOPRIENO, N., BRUNER, L.H., CARR, G.J., CHAMBERLAIN, M., COTTIN, M., SILVA, O., KATO, S. Alternatives in cosmetics testing. **Toxicol. In Vitro**, Oxford, v.9, n.6, p.827-838, 1995.
- LORDO, R.A., FEDER, P.I., GETTINGS, S.D. Comparing and evaluating alternative (*in vitro*) tests on their ability to predict the Draize maximum average score. **Toxicol. In Vitro**, Oxford, v.13, p.45-72, 1999.
- LOUEKARI, K. *In vitro* toxicology and the test guidelines. **ATLA, Altern. Lab. Anim.**, Nottingham, v.24, p.435-438, 1996.
- LOVELL, D.P. Principal component analysis of tissue scores from substances used in the COLIPA eye irritation validation study. **Toxicol. In Vitro**, Oxford, v.13, p.491-503, 1999.
- MAJMUDAR, G., SMITH, M. Técnicas de screening *in vitro* em dermatologia. **Cosmet. Toiletries, Ed. Port.**, São Paulo, v.10, p.44-49, 1998.
- MASSON, P. A diretiva cosmética europeia e suas atualizações. **Cosmet. Toiletries, Ed. Port.**, São Paulo, v.11, p.60-65, 1999.

- MILLIKAN, L.E. Cosmetology, cosmetics, cosmeceuticals: definitions and regulations. **Clin. Dermatol.**, Philadelphia, v.19, p.371-374, 2001.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, Amsterdam, v.65, p.55-63, 1983.
- NOSER, F. Cultura de células a serviço da cosmetologia. **Cosmet. Toiletries, Ed. Port.**, São Paulo, v.3, p.46-47, 1991.
- NUNES, J. Avaliação de segurança em produtos cosméticos e dermatológicos. **Rev. Racine**, São Paulo, v.58, p.22-26, 2000.
- O'BRIEN, K.A.F., BASKETTER, D.A., JONES, P., DIXIT, M. An *in vitro* study of the eye irritation potential of new shampoo formulations. **Toxicol. In Vitro**, Oxford, v.8, n.2, p.257-261, 1994.
- O'BRIEN, K.A.F., JONES, P.A., ROCKLEY, J. Evaluation of an agarose overlay assay to determine the eye irritation potential of detergent-based products. **Toxicol. In Vitro**, Oxford, v.4, n.4/5, p.311-313, 1990.
- OHNO, Y., KANEKO, T., INOUE, T., MORIKAWA, Y., YOSHIDA, T., FUJII, A., MASUDA, M., OHNO, T., HAYASHI, M., MOMMA, J., UCHIYAMA, T., CHIBA, K., IKEDA, N., IMANISHI, Y., ITAKAGAKI, H., KAKISHIMA, H., KASAI, Y., KURISHITA, A., KOJIMA, H., MATSUKAWA, K., NAKAMURA, T., OHKOSHI, K., OKUMURA, H., SAIJO, K., SAKAMOTO, K., SUZUKI, T., TAKANO, K., TATSUMI, H., TANI, N., USAMI, M., WATANABE, R. Interlaboratory validation of the *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients. (1) overview of the validation study and Draize scores for the evaluation of the tests. **Toxicol. In Vitro**, Oxford, v.13, p.73-98, 1999.
- OKUMURA, H., ARASHIMA, M., OHUCHI, J., KASAI, Y., TUSUKUMO, K., KAKISHIMA, H., KOTANI, M., KOJIMA, H., KURISHITA, A., HAYASHI, M., MIYAJIMA, A., SUNOUCHI, M., OHNO, Y. Interlaboratory validation of the *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients. (10) evaluation of cytotoxicity test on CHL cells. **Toxicol. In Vitro**, Oxford, v.13, p.199-208, 1999.
- OLIVIER, P., TESTARD, P., MARZIN, D., ABBOTT, D. Effect of high polyol concentrations on the neutral red absorption assay and tetrazolium- MTT test of rat hepatocytes in primary culture. **Toxicol. In Vitro**, Oxford, v.9, n.2, p.133-138, 1995.
- PAUL, J. **Cell and tissue culture**. 5.ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1975. 484p.
- PINTO, T.J.A., AZEVEDO, J.C., CRUZ, A.S. Comparative study of epithelial and fibroblastic cell lines as an alternative cytotoxicity test to the Draize method. **J. AOAC Int.**, Gaithersburg, v.83, n.3, p.665-668, 2000.
- PINTO, T.J.A., KANEKO, T.M., OHARA, M.T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. São Paulo: Atheneu, 2000. 309p.
- RIDDELL, R.J., CLOTHIER, R.H., BALLS, M. An evaluation of three *in vitro* cytotoxicity assays. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.24, n.6/7, p.469-471, 1986.

- RIZZO, E., TUCHIYA, H.N., MARTINEZ, C.H. **Técnicas básicas de cultura celular**. 4.ed. São Paulo: Instituto Butantan, 1983. 123p.
- ROBINSON, M.K. COHEN, C. DE BRUGEROLLE DE FRAISSINETTE, A., PONEC, M., WHITTLE, E., FENTEM, J.H. Non-animal testing strategies for assessment of the skin corrosion and skin irritation potential of ingredients and finished products. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.40, p.573-592, 2002.
- ROBINSON, M.K. OSBORNE, R., PERKINS, M.A. Strategies for the assessment of acute skin irritation potential. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods**, New York, v.42, p.1-9, 1999.
- ROGGEBAND, R., YORK, M., PERICOI, M., BRAUN, W. Eye irritation responses in rabbit and man after single applications of equal volumes of undiluted model liquid detergent products. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.38, p.727-734, 2000.
- ROGUET, R., COHEN, C., ROBLES, C., COURTELLEMONT, P., TOLLE, M., GUILLOT, J.P., POURADIER DUTEIL, X. An interlaboratory study of the reproducibility and relevance of Episkin, a reconstructed human epidermis, in the assessment of cosmetics irritancy. **Toxicol. In Vitro**, Oxford, v.12, p.295-304, 1998.
- ROGUET, R., SCHAEFER, H. Overview of *in vitro* cell culture technologies and pharmaco-toxicological applications. **Toxicol. In Vitro**, Oxford, v.11, p.591-599, 1997.
- ROSENBLUTH, S.A., WEDDINGTON, G.R., GUESS, W.L., AUTIAN, J. Tissue culture method for screening toxicity of plastic materials to be used in medical practice. **J. Pharm. Sci.**, New York, v.54, p.156-159, 1965.
- ROUGIER, A., COTTIN, M., SILVA, O., CATROUX, P., ROGUET, R., DOSSOU, K.G. The use of *in vitro* methods in the ocular irritation assessment of cosmetic products. **Toxicol. In Vitro**, Oxford, v.8, n.4, p.893-905, 1994.
- RUTTEN, A.A.J.J.L., VAN DE SANDT, J.J.M. *In vitro* dermal toxicology using skin organ cultures. **Toxicol. In Vitro**, Oxford, v.8, n.4, p.703-705, 1994.
- SAOTOME, K., MORITA, H., UMEDA, M. Cytotoxicity test with simplified crystal violet staining method using microtitre plates and its application to injection drugs. **Toxicol. In Vitro**, Oxford, v.3, n.4, p.317-321, 1989.
- SASAKI, K., TANAKA, N., WATANABE, M., YAMADA, M. Comparison of cytotoxic effects of chemicals in four different cell types. **Toxicol. In Vitro**, Oxford, v.5, n.5/6, p.403-406, 1991.
- SASAKI, T., KAWAI, K., SAIJO-KURITA, K., OHNO, T. Detergent cytotoxicity simplified assay of cytolysis by measuring LDH activity. **Toxicol. In Vitro**, Oxford, v.6, n.5, p.451-457, 1992.
- SEABAUGH, V.M., CHAMBERS, W.A., GREEN, S., GUPTA, K.C., HILL, R.N., HURLEY, P.M., LAMBERT, L.A., LEE, C.C., LEE, J.K., LIU, P.T., LOWTHER, D.K., ROBERTS, C.D., SPRINGER, J.A., WILCOX, N.L. Use of ophthalmic topical anesthetics. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.31, p.95-98, 1993.

- SOUTHEE, J.A., McPHERSON, J.P., OSBORNE, R., CARR, G.J., RASMUSSEN, E. The performance of the tissue equivalent assay using the skin ZK 1200 model in the COLIPA international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. **Toxicol. In Vitro**, Oxford, v.13, p.355-373, 1999.
- SPIELMANN, H., LIEBSCH, M. Lessons learned from validation of *in vitro* toxicity test: from failure to acceptance into regulatory practice. **Toxicol. In Vitro**, Oxford, v.15, p.585-590, 2001.
- SPIELMANN, H., LIEBSCH, M., MOLDENHAUER, F., HOLZHUTTER, H.G., BAGLEY, D.M., LIPMAN, J.M., PAPE, W.J.W., MILTENBURGER, H., SILVA, O., HOFER, H., STEILING, W. CAM-based assays. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.35, p.39-66, 1997.
- SPRINGER, J.A., CHAMBERS, W.A., GREEN, S., GUPTA, K.C., HILL, R.N., HURLEY, P.M., LAMBERT, L.A., LEE, C.C., LEE, J.K., LIU, P.T., LOWTHER, D.K., ROBERTS, C.D., SEABAUGH, V.M., WILCOX, N.L. Number of animals for sequential testing. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.31, p.105-109, 1993.
- TANI, N., KINOSHITA, S., OKAMOTO, Y., KOTANI, M., ITAGAKI, H., MURAKAMI, N., SUGIURA, S., USAMI, M., KATO, K., KOJIMA, H., OHNO, T., SAIJO, K., KATO, M., HAYASHI, M., OHNO, Y. Interlaboratory validation of the *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients. (8): evaluation of cytotoxicity tests on SIRC cells. **Toxicol. In Vitro**, Oxford, v.13, p.175-187, 1999.
- TSUTSUI, T., MATSUDO, Y., TANAKA, Y., ROKUKAWA, A., SATO, H., OMORI, N., BARRETT, J.C. Quantitative comparison of cytotoxicity of dental antiseptics to normal human oral keratinocytes *in vitro*. **Toxicol. In Vitro**, Oxford, v.8, n.6, p.1253-1258, 1994.
- UCHIYAMA, T., AKIYAMA, J., MIYAI, E., SAKAMOTO, K., TAKINO, Y., OHNUMA, M., OHKOSI, K., OKAMOTO, Y., MORITO, Y., KOJIMA, H., OKUMURA, H., SAWAMURA, J., IKEDA, N., SUMIDA, Y., CHIBA, K., MAKINO, I., KAWAKAMI, K., YAMAMOTO, R., TORISHIMA, H., YANASE, H., MIYAJIMA, A., SUNOUCHI, M., HAYASHI, M., OHNO, Y. Interlaboratory validation of the *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients (7): evaluation of cytotoxicity test by CornePack. **Toxicol. In Vitro**, Oxford, v.13, p.163-173, 1999.
- UNITED States Pharmacopeia. 22.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1990. p.1495-1497.
- UNITED States Pharmacopeia. 23.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1995. p.1697-1699.
- UNITED States Pharmacopeia. 24.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1999. p.1831-1832.
- UNITED States Pharmacopeia. 25.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2002. p.1893-1895.
- VAN DE SANDT, J.J.M., RUTTEN, A.A.J.J.L. Differential effects of chemical irritants in rabbit and human skin organ cultures. **Toxicol. In Vitro**, Oxford, v.9, n.2, p.157-168, 1995.

- VAN DE SANDT, J.J.M., RUTTEN, A.A.J.J.L., KOETER, H.B.W.M. Cutaneous toxicity testing in organ culture: neutral red uptake and reduction of tetrazolium salt (MTT). **Toxicol. In Vitro**, Oxford, v.7, n.1, p.81-86, 1993.
- VAN ZUTPHEN, L.F.M., VAN DER VALK, J.B.F. Developments on the implementation of the three Rs in research and education. **Toxicol. In Vitro**, Oxford, v.15, p.591-595, 2001.
- VIAN, L., VINCENT, J., MAURIN, J., FABRE, I., GIROUX, J., CANO, J.P. Comparison of three *in vitro* cytotoxicity assays for estimating surfactant ocular irritation. **Toxicol. In Vitro**, Oxford, v.9, n.2, p.185-190, 1995.
- WALLIN, R.F., HUME, R.D., JACKSON, E.M. The agarose diffusion method for ocular irritancy screening: cosmetic products, part I. **J. Toxicol., Cutaneous Ocul. Toxicol.**, New York, v.6, n.4, p.239-250, 1987.
- WATANABE, M., WATANABE, K., SUZUKI, K., NIKAIDO, O., ISHII, I., KONISHI, H., TANAKA, N., SUGAHARA, T. Use of primary rabbit cornea cells to replace the Draize rabbit eye irritancy test. **Toxicol. In Vitro**, Oxford, v.3, n.4, p.329-334, 1989.
- WILHELMUS, K.R. The Draize eye test: therapeutic reviews. **Surv. Ophthalmol.**, Brookline, v.45, n.6, p.493-515, 2001.
- WILLIAMS, S.J., GRAEPEL, G.J., KENNEDY, G.L. Evaluation of ocular irritancy potential: intralaboratory variability and effect of dosage volume. **Toxicol. Lett.**, Shannon, v.12, p.235-241, 1982.
- WITKOWSKI, J.A., PARISH, L.C. You've come a long way baby: a history of cosmetic lead toxicity. **Clin. Dermatol.**, Philadelphia, v.19, p.367-370, 2001.
- WOLF, R. Commentary: cosmetic dermatology. **Clin. Dermatol.**, Philadelphia, v.19, p.365-366, 2001.
- WOLF, R., WOLF, D., TUZUN, B., TUZUN, Y. Contact dermatitis to cosmetics. **Clin. Dermatol.**, Philadelphia, v.19, p.502-515, 2001.

9 - RESUMO

Os procedimentos descritos por Draize são a base dos testes de irritação ocular e cutânea adotados internacionalmente para avaliar produtos e substâncias. Entretanto, eles têm sido criticados por motivos éticos, devido á crueldade com os animais e, por isso, metodologias alternativas têm sido estudas para avaliar a toxicidade de produtos que entram em contato com o ser humano. Sendo assim, um estudo comparativo foi realizado entre testes de irritação ocular, cutânea e mucosa oral usando coelhos e testes *in vitro* pelos métodos de difusão em ágar e de captura do vermelho neutro, ambos usando as linhagens celulares NCTC clone 929, FPC-IAL e SIRC. Os cosméticos avaliados foram batons, bases faciais, pós compactos, *blushes*, sombras para os olhos, máscaras para os cílios, lápis ou delineadores para os olhos, e sabonetes líquidos de uso adulto e infantil. Os testes *in vivo* e as linhagens celulares utilizadas no método de difusão em ágar foram escolhidas de acordo com o local de uso dos produtos, com exceção da linhagem NCTC clone 929 que foi utilizada na avaliação de todas as amostras. Das 204 amostras, 141 foram avaliadas pelo teste de irritação cutânea e linhagem FPC-IAL, 80 pelo teste de irritação ocular e linhagem SIRC e 78 pelo teste de irritação de mucosa oral e linhagem FPC-IAL. Somente as amostras de sabonetes líquidos foram avaliadas também pelo método de captura do vermelho neutro com as três linhagens celulares. Na avaliação *in vitro* as amostras foram analisadas em diferentes concentrações e o parâmetro observado foi viabilidade celular com o corante vermelho neutro. Os resultados obtidos permitiram observar que as amostras positivas no método de difusão em ágar que apresentaram até índice de zona 3 ou seja, halo de morte celular variando de 0,5 a 1,0 cm a partir da amostra, segundo a Farmacopéia Americana, não apresentaram irritação ocular, cutânea ou de mucosa oral. As amostras que apresentaram índice de zona 4, apresentaram diferentes graus de irritação ocular e cutânea com exceção de 2 sabonetes líquidos de uso infantil que não apresentaram reações *in vivo*, embora apresentaram citotoxicidade até a concentração de 10%. Este método apresentou correlação significativa com o teste de irritação ocular, inclusive para os valores individuais da

córnea e conjuntiva. Quanto ao método de captura do vermelho neutro obteve-se correlação significativa para o teste de irritação cutânea e ocular, podendo inferir que quando as amostras de sabonetes líquidos apresentarem IC₅₀ maior que 0,085% não irão induzir irritação cutânea e ocular nos coelhos. Não foi observada relação entre a origem das linhagens celulares usadas e o tecido alvo utilizado no teste *in vivo*, sendo que todas as linhagens mostraram correlação significativa com a linhagem NCTC clone 929. De acordo com os dados, conclui-se que os métodos *in vitro* são mais sensíveis e que o método de difusão em ágar usando a graduação da Farmacopéia Americana, pode ser adotado como ensaio de triagem na avaliação de cosméticos. Isto resulta de sua capacidade de predizer a irritação, contribuindo significativamente para a redução dos testes que utilizam animais.

ABSTRACT

The procedures described by Draize are the basis of both ocular and cutaneous irritation tests and have been adopted internationally for *in vivo* evaluation of products and substances. However, they have been criticized for ethical reasons, due to their cruelty towards animals. Therefore, alternative methodologies are being studied to evaluate the toxicity of products, which have contact with human beings. Thus, a comparative study was performed between ocular, cutaneous and oral mucosa irritation tests using rabbits and *in vitro* tests through agar diffusion method and neutral red uptake method, both with the use of NCTC clone 929, FPC-IAL and SIRC cell lines. Lipsticks, makeup base, face powder, blushes, eye shadows, mascara, pencils and eyeliners, as well as liquid soap for children and adult use were evaluated. The *in vivo* tests and the cell lines used in the agar diffusion test were chosen according to the place where the products are used. Only the NCTC clone 929 lineage was used in the evaluation of all the samples. From the 204 analyzed samples, 141 were evaluated through the cutaneous irritation test and FPC-IAL lineage, 80 through the ocular irritation test and SIRC lineage, and 78 through the oral mucosa irritation test and FPC-IAL lineage. Only the samples of liquid soap were also evaluated through the neutral red uptake method with the three cells lines. The samples submitted to the *in vitro* evaluation were analyzed in different concentrations and the observed parameter was cellular viability with the use of neutral red. The results obtained revealed that the agar diffusion test positive samples which presented up to degree 3 zone rate, that is cellular death halo varying from 0,5 to 1,0cm from the samples, according to USP 25, didn't provoke ocular, cutaneous or oral mucosa irritation. The samples which presented degree 4 zone also showed different degrees of ocular and cutaneous irritation, except to two units of liquid soap for children use which didn't present *in vivo* reactions, although citotoxicity up to 10% concentration. This method showed significant correlation with the ocular irritation test and also concerning the individual values of cornea and conjunctiva. As for the neutral red uptake test, it presented significant correlation in the ocular and cutaneous irritation test, what make it possible

to infer that when the liquid soap samples present IC_{50} above 0,085% they won't cause ocular and cutaneous irritations in rabbits. No relation was observed between the origin of the cell lines and the target tissue used in the *in vivo* test, having all the cellular lines shown significant correlation with the NCTC clone 929 line. According to the data, the *in vitro* methods are more sensitive and the diffusion agar method, using the American Pharmacopeia graduation, can be adopted as a sorting procedure in the evaluation of cosmetics. This is a result of its capacity of predicting irritation, what largely contributes for the reduction of animal using tests.