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

AVALIAÇÃO DE METODOLOGIA ALTERNATIVA *IN VITRO*
AO TESTE DE IRRITAÇÃO OCULAR DE DRAIZE

Janice Campos de Azevedo

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Profa. Assoc. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto

São Paulo
1998

JANICE CAMPOS DE AZEVEDO

**Avaliação de Metodologia Alternativa *in vitro* ao Teste de
Irritação Ocular de Draize**

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Comissão Julgadora

Profa. Assoc. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto

Prof. Titular Alberto de Freitas Ribeiro

Prof. Titular Seizi Oga

São Paulo, 28 de agosto de 1998

*E fez Deus os animais selváticos,
segundo a sua espécie e os animais
domésticos conforme a sua espécie e
todos os répteis da terra, conforme
sua espécie. E viu Deus que isso
era bom.*

Gn 1.25

A Deus,

Socorro bem presente nas aflições

À minha amada família

*À Profa. Terezinha,
Pela amizade, compreensão
e dedicada orientação*

Agradecimentos

À Coordenadoria do Curso de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

À pesquisadora Áurea Silveira Cruz, chefe da Seção de Culturas Celulares do Instituto Adolfo Lutz, pela confiança em mim depositada e também pela valiosa colaboração para a realização deste trabalho.

À Farmacêutica Rosa Noriko Yamamoto pela paciência, compreensão e companheirismo.

Aos funcionários da Seção de Culturas Celulares pelo carinho com que me receberam.

Aos pesquisadores do setor de Farmacologia do INCQS, pelo desprendimento em transmitir seus conhecimentos.

Ao Prof. Jorge L. Seferin pelo apoio e incentivo.

À Hyun, ombro amigo em momentos difíceis.

Ao Márcio pelo desprendimento e valiosa colaboração.

À Bibliotecária Moema Rodrigues dos Santos pela revisão das bibliografias e pela segura orientação.

Sr. Claude Blondel pelos ensaios fotográficos realizados com tanto esmero.

À Zootecnista Silvânia Peres Neves e aos funcionários do biotério: Matildes, Eurides, Alexandre, Cristina, Eliane e Israel.

Ao Sr. José de Souza Sobrinho pela colaboração na parte experimental.

À Célia Yamamoto, uma grande incentivadora.

À Benê, Beth, Elaine e ao Jorge pela paciência e atenção nestes anos de convívio.

À Cristiane, Fábio, Fernanda, Karina, Lucilene, Sueli, Valdomero e Rita pelo incentivo, colaboração e agradável convivência diária.

SUMÁRIO

1. Introdução	2
2. Revisão da Literatura.....	5
2.1. Segurança do consumidor.....	5
2.1.1. Produtos Farmacêuticos	6
2.1.2. Material de Acondicionamento	7
2.1.3. Produtos Cosméticos	8
2.2. Metodologia Analítica	9
2.2.1. Generalidades.....	9
2.2.2. Irritação Ocular.....	12
2.2.2.1. Estruturas Morfológicas do Globo Ocular.....	14
2.2.2.2. Testes <i>in vivo</i>	14
2.2.3.3. Testes <i>in vitro</i>	18
2.2.2.3.1. Cultura de Células	18
2.2.3.3.2. Outras Metodologias.....	22
3. Objetivos	25
4. Materiais e Métodos.....	27
4.1. Materiais	27
4.2. Métodos	30
4.2.1. Apresentação das Amostras	30
4.2.2. Avaliação da Segurança Biológica.....	30
4.2.2.1. Tratamento das Amostras.....	30
4.2.2.2. Teste <i>in vivo</i>	32

4.2.3. Determinação do pH	37
5. Resultados	39
5.1. Testes <i>in vivo</i>	39
5.2. Testes <i>in vitro</i>	41
6. Discussão	91
7. Conclusão	108
8. Referências Bibliográficas	111
Resumo	129
Summary	130

Introdução

1. Introdução

Para garantir a qualidade de seus produtos, as indústrias cosmética e de medicamentos têm como instrumento inúmeras técnicas analíticas que valem-se de metodologias distintas abrangendo ensaios físicos, químicos e também biológicos sendo, portanto, ainda grande o emprego de microrganismos e animais organizados. Em função da crueldade, por vezes associada aos testes envolvendo animais, forte oposição tem sido exercida por entidades não governamentais, que pressionam as autoridades, no sentido da proibição desta metodologia.

Sempre que possível os métodos biológicos tendem a ser substituídos por outros de natureza físico-química que possam de maneira eficaz substituí-los. Ainda uma outra tendência é substituir o ensaio utilizando animais por outros, alternativos, que adotem tecidos, estruturas ou células. Assim é que, empregou-se inicialmente culturas de células primárias, passando posteriormente para culturas secundárias, ganhando no geral em especificidade e reprodutibilidade da resposta.

Vários fatores conduziram a intensa busca de métodos alternativos para os testes realizados em animais, através da realização de ensaios *in vitro*. À severidade dos testes somaram-se as limitações de natureza material, interesses econômicos, bem como a dificuldade de transferência dos resultados obtidos em animais para o homem, devido às diferenças estruturais e fisiológicas entre as espécies.

Para o teste de irritação ocular, onde utiliza-se coelhos, vários estudos têm sido feitos para utilização de culturas celulares na avaliação do potencial irritante das substâncias que, durante sua utilização, entrem em contato com os olhos ou que sejam empregadas em sua proximidade.

Com os ensaios *in vitro* busca-se uma alternativa que possa resultar em procedimentos sensíveis, que possuam reprodutibilidade e que não estejam sujeitos a critérios subjetivos de interpretação.

Revisão da Literatura

2. Revisão da Literatura

2.1 Segurança do Consumidor

Aspectos envolvendo a qualidade e segurança tornam-se progressivamente mais intensos, atingindo de forma muito especial os produtos cosméticos, bem como os medicamentos e produtos afins. Para tanto os produtores valem-se de pesquisas de novas substâncias, assim como de novas formulações quando então, torna-se imprescindível a aplicação de métodos analíticos clássicos e o desenvolvimento de novas metodologias. Aliado a isto, as autoridades governamentais, no cumprimento de suas atribuições, atuam não apenas como órgãos fiscalizadores mas essencialmente normativos. Nesta tarefa, promovem debates que culminam em legislação onde normatiza-se as substâncias químicas que podem ser utilizadas, bem como os testes requeridos para cada produto especificamente (22, 23, 24, 25).

2.1.1 Produtos Farmacêuticos

A indústria farmacêutica conta atualmente com uma tecnologia altamente avançada para garantir a qualidade dos medicamentos produzidos. Novas técnicas, conceitos e metodologias são desenvolvidos com o objetivo de garantir um produto mais eficaz e que, simultaneamente, ofereça menores riscos quanto à toxicidade. São inúmeros os métodos químicos, físicos e biológicos descritos em compêndios oficiais (47, 93, 94) que se mostram úteis na confirmação de que todo o esforço na busca da qualidade do produto desde o planejamento e durante as diferentes etapas do processo industrial tenha sido bem sucedido, culminando na obtenção de produtos seguros.

2.1.2 Material de Acondicionamento

Para a adequada dispensação das diferentes formas farmacêuticas ou cosméticos, visando preservar durante a armazenagem e transporte as características que garantissem um produto eficaz, inicialmente fez-se uso de material de acondicionamento constituído de frascos de vidro, que garantiam uma menor interação com os produtos neles contidos, bem como constituíam-se em uma barreira eficiente contra o ambiente externo. A evolução da tecnologia, associada à maior competitividade atualmente observada entre as empresas ocasionou o uso de polímeros como material de acondicionamento, por proporcionarem, dentre outras vantagens, menor custo devido à grande disponibilidade de oferta, menor preço de transporte graças à maior leveza e, no geral, menor risco de quebras.

Contrapondo a estas vantagens surge a preocupação com as interações entre o material polimérico e o produto nele contido através de fenômenos como permeabilidade a gases, adsorção de componentes da formulação acondicionada ou liberação de componentes da massa polimérica. Diferentes riscos advêm das características específicas de cada polímero, como polaridade, hidrofobicidade, caráter cristalino (33). Particularmente a liberação de componentes, representados por oligômeros, antioxidantes, pigmentos, plastificantes dentre outros, podem interferir na segurança biológica do produto. Embora boas práticas industriais minimizem os riscos, a adequação e compatibilidade destes materiais quanto à aplicação devem ser comprovados através de testes descritos em publicações oficiais (93, 94).

2.1.3 Produtos Cosméticos

O produto cosmético, com seu emprego milenar iniciado nas culturas mais antigas, passou por alterações conceituais básicas. No início tinha-se por meta efeitos efêmeros como coloração da pele ou mesmo alguma alteração fisiológica como, por exemplo, o aumento da íris. Visava-se assim atender aos conceitos de beleza vigentes.

Gradualmente, passou-se a objetivar um cosmético, que além da satisfação dos desejos imediatos do usuário fosse também fisiologicamente compatível. Com o avanço do conhecimento químico e tecnológico, cada vez mais novas substâncias foram incorporadas pela indústria cosmética, sendo necessário a comprovação de sua inocuidade, visando garantir a segurança dos consumidores. A pele intacta, devido a sua grande extensão e em decorrência das suas funções intrínsecas, constitui-se no órgão do nosso organismo mais exposto aos cosméticos em geral. Ainda que represente uma barreira relativamente efetiva à penetração de muitas substâncias, estudos realizados no campo da absorção cutânea indicam que a pele é permeável a uma grande variedade de compostos (101).

Justifica-se, portanto, a preocupação no sentido de obtenção de formulações seguras e que sejam adicionalmente submetidas a avaliações comprobatórias quanto à inocuidade.

2.2 Metodologia Analítica

2.2.1 Generalidades

Toda a evolução no conhecimento científico e tecnológico, considerada em adição ao esforço dos produtores quanto ao desenvolvimento de formulações otimizadas juntamente com a obtenção de insumos de fornecedores qualificados e rígido controle das etapas do processo produtivo, não tornam dispensável a comprovação de que se tenha atingido plenamente os parâmetros de qualidade.

A avaliação biológica visando a segurança do consumidor é empregada em função do potencial de risco do produto, que pode advir de características de toxicidade (DL_{50}) de matérias-primas utilizadas na formulação, de impurezas incorporadas quando da obtenção da matéria-prima ou em diferentes etapas do processo produtivo, tornando-se por vezes crucial dependendo da via de administração, da dosagem terapêutica efetiva e para certos grupos de produtos, da extensão, local e área de aplicação.

Deve-se discernir entre a avaliação toxicológica que precede o lançamento de um produto - ensaios pré-clínicos e clínicos - e aquela efetuada rotineiramente visando comprovar a qualidade do produto através do cumprimento das especificações já definidas (105).

A metodologia descrita por Draize e colaboradores (42) muito contribuiu para os testes realizados com animais, pois as metodologias ainda hoje empregadas resultam de alterações do trabalho daqueles pesquisadores compreendem testes tais como irritação ocular, irritação dérmica primária e cumulativa, realizada em coelhos, teste de sensibilização utilizando cobaias (46, 47, 93, 94). Sua aplicação abrange distintos grupos de produtos, porém sempre aplicados sobre tecido cutâneo, mucosa ou regiões definidas, como olhos e áreas circunvizinhas.

Para produtos utilizados na região dos olhos, materiais poliméricos ou plásticos para acondicionamento de produtos oftálmicos é indicado o teste de irritação ocular, empregando coelhos (94). Para plásticos e outros polímeros empregados em materiais de uso médico-hospitalar são indicados testes de toxicidade sistêmica em camundongos, e de toxicidade intracutânea e implante, em coelhos (93, 94), e eventualmente o teste de irritação dérmica. A seleção quanto à bateria de testes está sempre vinculada ao tipo de uso do produto, assim como o grau de risco envolvido.

Dentre os medicamentos, alguns exigem testes biológicos específicos como o teste para substâncias vasodepressoras, realizado em gatos, onde utiliza-se a histamina como padrão biológico de referência. Para soros e vacinas são necessários os testes de toxicidade sistêmica, usando camundongos e outras espécies animais. Pela exigência de apirogenicidade em medicamentos injetáveis, realiza-se o teste comprobatório empregando coelhos (47, 93, 94).

A confiabilidade e reprodutibilidade do experimento com animais é dependente do reagente biológico, do delineamento experimental, das instalações e recursos, além do elemento humano executor e auxiliar. Em estudo interlaboratorial com 25 instituições compreendendo indústrias químicas, farmacêuticas e de cosméticos, onde foram avaliados os resultados dos testes de irritação ocular e irritação cutânea ficando, após análise estatística dos dados obtidos, demonstrada uma variabilidade significativa entre os resultados como, por exemplo, concluiu-se pela necessidade de treinamento complementar para os analistas, para diminuir os equívocos e subjetividade na interpretação das reações em estudo (100).

Em 1980, Koehler (64) descreve a avaliação toxicológica, realizada em humanos, de vários produtos abrangendo principalmente cosméticos e sugere que o emprego de animais passe a ser restrito àqueles testes que avaliem o potencial mutagênico, teratogênico e de irritação ocular devido aos riscos inerentes a estes testes.

Phillips & colaboradores (79) realizando estudos de irritação dérmica utilizando coelhos e voluntários humanos demonstraram que o teste em animais foi capaz de prever com precisão os compostos irritantes e não irritantes quando comparados com a pele humana, porém não foi possível distinguir entre compostos leve ou moderadamente irritantes. Os autores concluíram que para as substâncias nas quais o teste em coelhos não foi conclusivo somente o teste em humanos poderia fornecer a resposta precisa.

Com o objetivo de evitar a necessidade de extrapolação dos dados obtidos em animais para o ser humano, Walker & colaboradores (98) elaboraram um protocolo para a realização dos testes de irritação dérmica em voluntários, empregando substâncias não irritantes ou levemente irritantes. Os autores descreveram os cuidados referentes a questões éticas, como a obediência à Convenção de Helsiki de 1964, os procedimentos quanto ao estudo completo e conhecimento da estabilidade do produto a ser testado, bem como quanto às formas de aplicação do mesmo a fim de evitar experiências indesejáveis.

2.2.2 Irritação Ocular

A preocupação com a segurança de um produto utilizado nos olhos ou ao redor destes, decorre das graves consequências que podem advir das lesões provocadas por um produto altamente irritante, podendo levar, inclusive, ao comprometimento da visão.

2.2.2.1 Estruturas Morfológicas do Globo Ocular (95)

As estruturas de particular interesse para este estudo compreendem íris, conjuntiva e córnea.

A íris é a extensão anterior do corpo ciliar. Apresenta uma superfície relativamente achatada com uma abertura circular no centro, chamada pupila. A pupila varia no tamanho, tendo a mesma forma e função que o diafragma de uma câmera fotográfica.

A função da íris é controlar a quantidade de luz que entra no olho. Isto ocorre por contração reflexa da pupila sob estímulo de luz e dilatação da pupila no escuro.

A conjuntiva é uma membrana mucosa transparente, fina, que reveste a esclerótida anterior até o limbo e a superfície posterior das pálpebras. A porção palpebral reveste as pálpebras enquanto a bulbar reveste o globo ocular.

Histologicamente, a conjuntiva consiste de 2 camadas: epitélio, composto de células cilíndricas e a substância própria que está subdividida nas camadas adenoidal e fibrosa.

A substância própria contém células caliciformes. Estas são, essencialmente, glândulas mucosas unicelulares; a mucina produzida auxilia as lágrimas a manterem úmidas a conjuntiva e a córnea.

A córnea é um tecido transparente e avascular comparável, em tamanho e estrutura, a um cristal de um pequeno relógio de pulso.

A córnea age como uma janela refringente e protetora, através da qual passam os raios de luz em direção à retina.

Em média a córnea de adulto tem 1 mm de espessura e 11,5 mm de diâmetro.

As camadas da córnea são cinco, sendo de fora para dentro: epitélio (contínuo ao epitélio conjuntival bulbar), membrana de Bowman, estroma, membrana de Descemet e endotélio.

Figura 1 - Ângulo da câmara anterior e estruturas vizinhas (Vaughan)

Consideram-se a seguir as informações obtidas, no que diz respeito aos aspectos de segurança biológica de produtos com contato ocular, envolvendo aspectos metodológicos convencionais ou não.

2.2.2.2 Testes *in vivo*

A metodologia utilizada atualmente para o teste de irritação ocular baseia-se nos estudos de Draize & colaboradores (42), que em 1944 procederam à avaliação do potencial irritante de medicamentos e outros produtos tópicos usados na região dos olhos através da observação das lesões provocadas na córnea, íris e conjuntiva dos olhos de coelhos albinos da raça Nova Zelândia. A cada lesão foi atribuída uma pontuação, em diferentes graus, de acordo com a intensidade da reação observada. O volume, forma de administração e os intervalos de observação também foram definidos, bem como o número de animais a serem utilizados. A avaliação do grau de irritação foi feita clinicamente, não havendo a necessidade de utilização de instrumentos. Este teste tornou-se a base para os métodos oficiais de avaliação da irritação ocular (46).

Contribuindo para a compreensão das lesões provocadas por substâncias irritantes, estudos utilizando uma lâmpada de fenda tornaram possível o exame de estruturas como, por exemplo, a retina. Apresentaram, contudo, a desvantagem do custo para aquisição do equipamento, assim como aumento no tempo dispendido com o teste(6, 72).

Kay & Calandra(63) propuseram alterações no critério de avaliação no teste inicialmente proposto por Draize & colaboradores (42), estabelecendo oito classificações para o potencial irritante. Os autores enfatizaram a importância das reações provocadas na córnea, tendo por base a consideração de que as lesões nesta estrutura estão mais frequentemente associadas ao comprometimento da visão.

Vários estudos têm sido desenvolvidos com vistas à padronização dos métodos biológicos, seja na busca de protocolos acessíveis ou de estudos intra e interlaboratoriais (20, 26, 27, 31)

Em contribuição ao detalhamento metodológico do teste de irritação ocular, Davies & Harper (40) realizaram estudos para avaliar o potencial

irritante de cinco xampus, empregando quatro variações metodológicas que consistiram na instilação de amostra sem diluição e diluída a 10% e posterior irrigação do olho do animal com água, e as mesmas amostras instiladas sem posterior irrigação. Os resultados obtidos demonstraram que as amostras diluídas a 10% são menos irritantes que as amostras testadas sem diluição, não evidenciando assim, o real potencial de irritação do produto. O mesmo efeito paliativo ocorreu com a irrigação após a instilação. Os autores concluíram que a metodologia que melhor expressa o risco real oferecido pelo produto é a instilação da amostra pura, sem a irrigação dos olhos do animal, evitando-se assim um resultado negativo incorreto.

Novos estudos realizados por Davies & colaboradores (39) avaliaram a influência de diferentes intervalos de tempo (4, 10, 20, 30, 60 e 120 s) para irrigação do olho do animal após instilação de lauril sulfato de sódio a 10%. Visavam contornar as diferenças quanto ao mecanismo de produção de lágrimas entre o olho humano e o do coelho, pois segundo os mesmos autores este mecanismo é mais efetivo em humanos. Os resultados demonstraram que a irrigação com água, após 10 segundos, diminuiu os danos à córnea não havendo, entretanto, diferença quanto aos diferentes volumes utilizados no enxague, de 20 mL ou 100 mL.

DeSouza & colaboradores (41) e Talsma & colaboradores (90) realizaram estudos para avaliar a possibilidade de redução do número de coelhos utilizados no teste de irritação ocular. No primeiro trabalho foram utilizados grupos de 2, 3, 4, 5 animais para o teste com 67 compostos utilizados na indústria petroquímica. Os resultados demonstraram que para para os grupos de 2, 3, 4 e 5 animais a precisão foi de 88, 93, 95 e 96%, respectivamente, quando comparados com grupo de 6 animais. Para os dados obtidos com 155 substâncias químicas, testados em grupos de 3 animais, no estudo de Talsma & colaboradores (90), obteve-se uma precisão de 94%, quando comparados aos resultados obtidos com 6 animais. Tais experimentos podem ser considerados no sentido de otimização dos testes.

Ainda com relação à redução do número de animais usados no teste de irritação ocular, Springer & colaboradores (88) discutem as variações descritas pelos diferentes organismos internacionais, onde as entidades européias (recomendam o uso de um único animal quando se testa um produto reconhecidamente irritante ou emprego de no mínimo 3 animais, enquanto os órgãos americanos recomendam o uso de 6 animais. Os autores sugerem que o uso de 6 animais evita, na maioria dos casos, um falso positivo ou falso negativo, além de raramente necessitar de uma segunda bateria de testes.

Indo ao encontro das eventuais críticas quanto às diferenças interespecies, particularmente entre grupos distantes no ciclo evolutivo, e com o propósito de sugerir a utilização de uma espécie primata, Buehler & Newmann (28) realizaram estudos com macacos rhesus (*Macaca mulatta*) paralelamente ao uso de coelhos albinos. Os resultados não coincidentes entre as duas espécies puderam ser explicados pelas diferenças anatômicas e fisiológicas. Em estudos posteriores realizados por Beckley & colaboradores (12), onde foram comparados os resultados obtidos com voluntários humanos e duas espécies animais - coelhos e macacos rhesus - demonstrou-se que as respostas obtidas com a espécie primata são as que melhor predizem as reações provocadas no olho humano.

Em estudos desenvolvidos por Weltman & colaboradores (102), os autores estudaram vários fatores que devem ser observados para garantir a confiabilidade dos resultados quando da realização do teste de irritação ocular empregando coelhos. Foram utilizadas duas amostras de xampus, tendo os pesquisadores concluído que na população de 8 animais utilizados não houve diferenças significativas entre as pontuações obtidas para as duas amostras. Os estudos demonstraram ainda que os animais liberados logo após a instilação apresentaram lacerações na pálpebra superior, provavelmente devido ao fato do animal esfregar o olho com as patas, o mesmo não acontecendo com os animais que foram mantidos imobilizados por um tempo maior. Os autores também salientaram a necessidade de

padronização da técnica de avaliação e pontuação das lesões, visando com isto evitar erros em decorrência de critérios subjetivos de avaliação.

Na busca de outra possível variação metodológica, o pré-tratamento dos olhos dos animais, com anestésico oftálmico, visando reduzir a dor, foi objeto de discussão por Seabaugh & colaboradores (85). Embora o anestésico possa contribuir para o aumento da permeabilidade da córnea, os autores concluem pelo uso deste recurso quando a substância a ser testada provoque dor no animal.

Griffith & colaboradores (56) estudaram, em coelhos, as reações provocadas pela instilação de volumes diferentes de substâncias comprovadamente irritantes para o olho humano. Foram empregados, no estudo, volumes de 0,003mL, 0,01mL, 0,03mL e 0,1 mL administrados diretamente no centro da córnea, sendo feito o acompanhamento por 21 dias utilizando a graduação proposta por Draize. Os resultados obtidos foram comparados com os dados disponíveis em literatura, para humanos, visando estabelecer um volume a ser aplicado que melhor correspondesse à resposta. Concluiu-se pela utilização do volume de 0,01 mL como o que melhor pode predizer a resposta humana.

Em estudo desenvolvido por Williams & colaboradores (104) , foram avaliados 7 compostos através da instilação de volumes de 0,1 mL e 0,01 mL. Os autores observaram que embora a redução do volume provocasse uma redução da intensidade do efeito observado, não houve mudança na classificação das reações observadas.

A redução do volume a ser instilado foi objeto de discussão por Lambert & colaboradores (66) sendo que os autores sugerem esta variação metodológica quando da avaliação de substâncias suspeitas de serem altamente irritantes. Após o teste, se classificadas como não irritantes, devem ser posteriormente testadas com a metodologia já padronizada, pela instilação de um volume de 0,1 mL. Para substâncias que não ofereçam risco potencial de irritação, a metodologia utilizando o volume de 0,1 mL

deve ser mantida até que dados substanciais com a redução do volume de instilação tenham sido obtidos.

2.2.2.3 Testes *in vitro*

Nas últimas décadas vários estudos têm sido desenvolvidos visando a implantação de metodologias *in vitro* como alternativa aos testes que utilizam animais(91, 44, 52). Além da severidade dos testes, estas metodologias são constantemente questionadas em função das diferenças antomo-fisiológicas entre o animal e o homem, quanto à variabilidade da resposta ao testes e dificuldade, em muitas situações, de padronizar as respostas exibidas pelo animal (43).

Para a avaliação de novas substâncias ou formulações, bem como de matérias-primas reconhecidamente irritantes têm sido propostas metodologias que façam uso de culturas celulares (2, 3, 14, 16, 17, 18, 74), órgãos animais isolados (29, 50, 69, 97, 99), determinação de relação estrutura-atividade (10, 36), bancos de dados informatizados (4, 30), sistemas elaborados a partir de matrizes protéicas (53). Estes novos testes são objeto de estudo visando fornecer melhores abordagens em áreas específicas para avaliação do risco toxicológico potencial, devendo para tanto serem validados para garantir a sensibilidade, reprodutibilidade e obtenção de respostas efetivamente úteis para assegurar a inocuidade do produto (55).

2.2.2.3.1 Cultura de Células

A cultura de tecidos teve início no começo do século XX, como método para estudo do comportamento das células animais livres das variações a que estariam submetidas como constituintes de um ser vivo, seja em decorrência da homeostase ou quando submetido a pressões

durante um experimento. Esta técnica foi desenvolvida primeiramente através do cultivo de fragmentos de tecidos, disto resultando o termo genérico cultura de tecidos que abrange a cultura de órgãos - cultura tridimensional de tecidos que mantém algumas ou todas as características do tecido no organismo vivo - e a cultura de células. O termo cultura de células refere-se às culturas derivadas de células dispersas obtidas de um tecido, de uma cultura primária ou de uma linhagem celular através de desagregação enzimática, mecânica ou química (48).

Dentre as várias técnicas existentes para o cultivo de células, as mais usadas são: cultura em suspensão, de explantação, em lamínula, em suspensão aderidas a partículas e em monocamada.

Em 1947, Earle e colaboradores desenvolveram a técnica de cultivo de células animais em monocamada sobre superfície sólida, usando meio líquido. Este método se aplica tanto a células de linhagem quanto à células primárias, com a vantagem de permitir o estudo microscópico minucioso das células que aderem à superfície sólida dos frascos e se multiplicam formando o tapete celular ou camada contínua.

Várias metodologias têm sido desenvolvidas objetivando propor alternativas aos testes empregando animais através do uso de culturas de células animais ou humanas (19, 57, 65, 68). A investigação quanto à viabilidade das células, após exposição ao agente potencialmente irritante, feita pelo emprego de corantes vitais (2, 17, 60, 61, 59) como vermelho neutro, cristal violeta, constitui-se em técnica bastante utilizada para estudo de métodos alternativos.

A metodologia empregando o vermelho neutro baseia-se na absorção do corante pela células viáveis e posterior acúmulo nos lisossomas (2, 17, 18). A viabilidade das células pode ser avaliada microscopicamente, observando-se as características morfológicas e através da quantificação espectrofotométrica do corante (15)

Com o objetivo de avaliar a resposta de dois modelos *in vitro* frente aos resultados obtidos com o teste de irritação dérmica, Osborne & Perkins (77) usaram cultura de células originárias de pele humana que foram expostas a substâncias químicas. A viabilidade das culturas de queratinócitos humanos foi avaliada através da capacidade de reter o corante vermelho neutro. O outro modelo representado pelas células de queratinócitos humanos com fibroblastos dérmicos foi avaliado quanto à viabilidade celular pela redução de MTT [brometo de 3 (4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5 difeniltetrazólio] que avalia a integridade das mitocôndrias (9). Os resultados demonstraram uma boa correlação entre as metodologias *in vivo* e *in vitro*, concluindo os autores serem estes dois sistemas bastante confiáveis por tratar-se de modelos derivados da pele humana.

Utilizando duas linhagens celulares obtidas de células de gengiva humana, Babich & Babich (2) estudaram o efeito tóxico do triclosan e lauril sulfato de sódio isolados ou em combinação. O efeito tóxico foi avaliado com base na absorção do corante vermelho neutro, seguida de acúmulo nos lisossomas das células. Os autores concluíram que com a associação das duas substâncias houve um aumento da toxicidade, o que reproduziu a resposta obtida em animais, contrastando, porém, com a resposta obtida em humanos.

Para avaliação prévia da toxicidade de sais de diversos metais, Borenfreund & Puerner (16) desenvolveram estudos empregando a linhagem celular estabelecida BALB/c 3T3 (fibroblastos de camundongo) e metodologia baseada na medida espectrofotométrica da absorbância do vermelho neutro incorporado pelo lisossoma das células viáveis.

Uma das vantagens, em potencial, dos testes *in vitro* é sua relativa rapidez. Entretanto os resultados obtidos por Riedell & colaboradores (81) demonstram que deve-se levar em conta o mecanismo de ação de cada substância sobre as células, para determinar o tempo de exposição à substância em teste. Isto também é discutido por Stark & colaboradores (89), sendo que os autores ainda descrevem fatores a serem considerados como

o tipo de célula e sua densidade, a volatilidade da substância teste, sua concentração, possíveis interações da substância em teste com os constituintes do meio como por exemplo a presença de agentes quelantes quando do teste de metais. Pode ocorrer o acúmulo da substância em determinadas células o que pode levar a uma subestimativa do efeito (59).

Watanabe & colaboradores (99) realizaram estudos com cultura primária de células de córnea de coelho obtendo uma boa correlação com os dados obtidos *in vivo*. Esta mesmo tipo celular foi objeto de estudo por Sasaki & colaboradores (83), através da comparação com 3 linhagens celulares estabelecidas. Os resultados obtidos demonstraram não haver diferenças significativas entre as respostas observadas para os quatro tipos de células.

Marinovich & colaboradores (71) utilizaram metodologia baseada na determinação do número de células viáveis após exposição ao agente tóxico, através da quantificação da proteína celular total, que é perdida pelas células cultivadas em monocamada, após exposição a uma substância tóxica. Foram avaliadas 20 amostras de xampus, sendo a citotoxicidade expressa como a concentração da amostra que causa a redução em 50% do conteúdo de proteína total. Os resultados obtidos demonstraram uma boa correlação com os resultados *in vivo*.

Esperisen & colaboradores (45) realizaram estudos empregando cultura tridimensional de fibroblastos humanos e a metodologia *in vivo* para o teste de irritação ocular, empregando coelhos. Os resultados obtidos pelos pesquisadores demonstraram uma boa correlação entre o tempo de recuperação requerido pelo animal e o intervalo necessário para que as células expostas ao agente irritante recuperassem sua viabilidade.

Das estruturas que constituem a córnea, o epitélio é a camada mais externa e constitui-se em uma importante barreira às substâncias químicas. Monocamadas de linhagens de células epiteliais desenvolvem esta mesma característica pois quando cultivadas sobre um suporte permeável formam

uma barreira impermeável a diversas substâncias, inclusive à fluoresceína sódica, uma substância inerte. Culturas em monocamada da célula MDCK (Madin-Darby canine kidney) cultivadas sobre membrana e posteriormente submetidas a tensoativos foram expostas à fluoresceína, sendo observada a passagem desta substância através da monocamada celular em decorrência da perda da integridade da camada de células. Os resultados obtidos *in vitro* demonstraram boa correlação com os dados *in vivo*, quanto à recuperação da permeabilidade da monocamada (35, 86).

2.2.2.3.1 Outras Metodologias

Estendendo o conceito de metodologia alternativa à quaisquer métodos ou informações que permitam fazer um estudo da segurança de substâncias químicas, torna-se bastante útil nesta avaliação a elaboração de um banco de dados, que deve integrar todas as informações existentes sobre segurança de diversas substâncias químicas, em humanos e animais (4).

Diversas metodologias, inclusive testes em humanos, podem contribuir grandemente para a diminuição dos testes realizados em animais (11).

Gautheron & colaboradores (50) estudaram a viabilidade e possíveis limitações da metodologia empregando córnea bovina para avaliação do potencial irritante de substâncias químicas, com vistas à substituição do teste de irritação ocular utilizando animais. Várias substâncias foram avaliadas não havendo limitação quanto à cor, solubilidade, valor de pH.

Várias outras metodologias procuram valer-se de métodos que em alguma instância não envolvam reagentes biológicos de qualquer natureza, ou que lancem mão de culturas celulares e mecanismos físico-químicos, em

paralelo. Neste contexto, o método Eytex (53) de avaliação de irritação ocular que consiste de ensaio simulado da opacificação da córnea, baseado nas alterações de um reagente de matriz protéica. Embora inicialmente empregando matriz de córnea bovina é hoje composto de reagentes , calibradores, equipamentos e instrumental padronizados.

Estudos também têm sido feitos para avaliação da relação estrutura-atividade (QSAR), partindo-se do princípio de que as propriedades de uma substância química estão diretamente relacionadas com sua estrutura molecular. Em estudos realizados com compostos orgânicos (álcoois alifáticos) foram obtidos resultados que demonstraram a validade da do modelo de estudo da relação estrutura-atividade quando comparados com dados já conhecidos quanto à classificação do potencial irritante das substâncias testadas (10).

Outra metodologia também objeto de estudo é o método Skintex (54), um modelo físico-químico para irritação dérmica que incorpora uma matriz de barreira e reagente sensível a alterações por irritantes químicos. Neste método as amostras são absorvidas ou penetram através da barreira externa de uma matriz de queratina e interagem diretamente com um reagente de proteínas da pele e globulina, sensível a irritantes químicos. A detecção das alterações na matriz de barreira ou sua integridade são verificadas através de um corante indicador ligado à matriz.

Faz-se necessário, para a implantação destas metodologias visando substituir os métodos que utilizam animais, um processo de validação com estudos inter e intra-laboratoriais (7, 8) que resultem em protocolos de domínio público. Para tanto, mesmo as metodologias *in vivo* necessitam de uma padronização, com critérios de avaliação que evitem a subjetividade dos julgamentos (55).

Objetivos

3. Objetivos

O objetivo primordial deste trabalho consistiu no estudo comparativo, quanto à inocuidade, entre o teste de irritação ocular, utilizando coelhos e o teste de citotoxicidade, empregando a técnica de cultura celular. Buscou-se assim parâmetros de correlação entres as metodologias *in vivo* e *in vitro*.

Paralelamente, propôs-se avaliar o comportamento de duas linhagens celulares diferentes - uma célula epitelial e outra fibroblástica - quando submetidas a agentes potencialmente irritantes.

Tendo em vista ser o material de estudo representado por medicamentos e cosméticos, de diferentes marcas disponíveis no mercado, assim como insumos empregados para a sua obtenção, também foi considerada como meta a investigação quanto à qualidade do produto oferecido para consumo, no tocante à rotulagem, visando verificar a obediência à legislação.

Materiais e Métodos

4. Materiais e Métodos

4.1 Materiais

As amostras utilizadas para este estudo compreenderam matérias-primas utilizadas na indústria para a produção de produtos cosméticos (tensoativos aniônicos, anfóteros e não-iônicos); produtos acabados (colírios, xampus) e material de acondicionamento para colírios (frascos de polietileno).

As amostras constituídas pelos tensoativos foram obtidas como doações e estão a seguir discriminadas, abrangendo os aniônicos, não-iônicos e anfóteros.

Tensoativos Aniônicos:

A - Surfax CN (Lauril sulfato de sódio) - 1 lote

B - Surfax SLA (Lauril éter sulfato de sódio/lauril éter sulfossuccinato de sódio) - 1 lote

C - Surfax 40 (Lauril sulfato de trietanolamina) - 1 lote

D - Surfax EDT (Lauril éter sulfato de trietanolamina) - 1 lote

Tensoativo Não-iônico:

E - Plantaren 2000 (Decil poliglicosídeo) - 1 lote

Tensoativo Anfótero:

F - Surfax ACR (Cocoamidopropil betaína) - 1 lote

Os colírios, obtidos junto aos produtores, englobam uma variedade de medicamentos empregados na terapêutica.

MAXITROL® (Dexametasona/ Sulfato de Neomicina/ Sulfato de Polimixina B) - 3 lotes

MAXIDEX® (Dexametasona) - 3 lotes

TOBREX® (Tobramicina) - 3 lotes

MYDRIACYL 1%® (Tropicamida) - 3 lotes

CLARIL® (Cloridrato de Nafazolina/Maleato de Feniramina) - 3 lotes

ISOPTO CARPINE 2%® (Cloridrato de Pilocarpina) - 1 lote

ISOPTO CARPINE 4%® (Cloridrato de Pilocarpina) - 2 lotes

Os frascos de acondicionamento, constituídos em polietileno de alta densidade, foram também obtidos através de doação representando dois diferentes fornecedores:

Frascos WHEATON 5 ml - 2 lotes

Frascos WHEATON 15 ml - 2 lotes

Frascos SANTA MARINA 5 ml - 2 lotes

Frascos SANTA MARINA 15 ml - 1 lote

Os xampus foram adquiridos dentre os produtos disponíveis no mercado, abrangendo tanto os de uso infantil quanto adulto:

Xampus para Adultos:

Xampu A - 3 lotes

Xampu B - 3 lotes

Xampu C - 3 lotes

Xampu D - 3 lotes

Xampus Infantis:

Xampu E - 3 lotes

Xampu F - 3 lotes

Xampu G - 3 lotes

Xampu H - 3 lotes

4.2 Métodos

4.2.1 Apresentação das Amostras

As amostras de produtos terminados, colírios e xampus, tal como apresentadas e disponíveis no mercado foram avaliadas quanto a aspectos de rotulagem, para verificar o cumprimento da legislação (22, 24): texto da rotulagem em português contendo nome de designação do produto, lote ou partida, data de fabricação, prazo de validade, razão social do fabricante e importador, composição, ingrediente ativo, número de registro do produto no Ministério da Saúde, nome do técnico responsável e seu número de registro na autarquia profissional a que pertence, assim como instruções de uso, alertas e precauções (22, 23,25).

4.4.2 Avaliação da Segurança Biológica

Os diferentes grupos de amostras representadas por colírios, material de acondicionamento para os mesmos, xampus e matérias-primas empregadas na sua fabricação, foram avaliados quanto à inocuidade, por metodologias *in vivo* e *in vitro*. As avaliações biológicas foram, em sua maioria, precedidas de preparo ou tratamento das amostras.

4.4.2.1 Tratamento das Amostras

Quando constituídas por colírios, as amostras foram testadas dispensando qualquer tratamento prévio ou diluição.

A amostragem obtida de frascos de polietileno para colírios foi de 20 unidades de cada lote, acondicionados em sacos plásticos. Com auxílio de tesoura de aço inoxidável, os frascos, sem lavagem prévia e após remoção da embalagem original foram, usando mãos enluvadas, cortados em sua porção cilíndrica de forma a permitir a obtenção de fragmentos de 5,0 cm x

0,3 cm, perfazendo uma área total de 60 cm² para volume de 20 mL de líquido extrator. Este foi constituído de solução de cloreto de sódio 0,9%, acondicionado, juntamente com os fragmentos, em erlenmeyer de 250 mL com tampa. O processo extrativo foi realizado à temperatura de 121°C por 1 hora, em autoclave, sendo que cada ciclo extrativo foi acompanhado de um controle negativo constituído de 20 mL de uma solução de cloreto de sódio 0,9%. Foram realizadas 2 réplicas dos extratos, em frascos e ciclos de autoclavação distintos, para cada lote de amostra. As extrações foram efetuadas 4 horas antes do emprego no teste e mantidas fechadas até então, preservando sua esterilidade.

A preparação dos tensoativos aniônicos, não-iônico e anfótero foi por diluições analíticas subsequentes, no momento do uso. Volumes de no mínimo 5 mL do produto original foram diluídos empregando provetas com tampa, em condições assépticas, empregando água destilada estéril de forma a permitir a obtenção dos tensoativos em concentrações de 30%, 10%, 1% e 0,1%.

Os xampus, tendo sido adquiridos em número de 3 lotes para cada uma das 8 diferentes marcas avaliadas foram mantidos na embalagem original até minutos antes do teste. Foram testados sem diluição prévia e diluídos analiticamente, sob cuidados de assepsia, em concentrações de 25%, 5%, 1% e 0,1%, tendo sido as diluições feitas com água destilada estéril.

4.2.2.2 Teste *in vivo*

O teste de irritação ocular foi realizado utilizando coelhos albinos adultos da raça Nova Zelândia de ambos os sexos, com peso variando de 2,5 kg a 3,5 kg, de procedência do biotério convencional da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Anteriormente ao uso, os animais foram observados quanto à ausência de irritação e isenção de quaisquer indícios de infecção ocular.

Os testes foram realizados na sala de testes do biotério, que assegurava condição ambiental mínima adequada, com ar condicionado e filtrado além de iluminação artificial. Todas as leituras foram efetuadas por dois analistas e se mantiveram constantes durante o transcorrer do trabalho

Foram empregados seis coelhos para cada uma das concentrações das amostras, tendo sido realizado um total de 173 testes. Foi admitido o reuso dos animais, sempre que a amostra apresentava resultado negativo e a reação observada obtinha pontuação abaixo de 1 para córnea e íris e abaixo de 2 para hiperemia e quemose.

Para a realização do teste foi instilado um volume de 0,1 mL da amostra, no saco conjuntival do olho direito do animal, servindo o olho esquerdo como controle. Imediatamente após a instilação manteve-se, com leve pressão dos dedos, o olho do animal fechado de forma a permitir contato uniforme com o produto.

Após 24 horas, foi feita a irrigação com água destilada e efetuada a primeira leitura das reações, segundo protocolo do Food and Drug Administration (46), que atribui graduações de acordo com as lesões provocadas pela amostra às diferentes estruturas oculares: córnea, íris e conjuntiva.

Às lesões da córnea são atribuídos grau 0 para ausência de ulceração ou opacidade, grau 1 para áreas difusas de opacidade, grau 2 para áreas translúcidas facilmente discerníveis com detalhes da íris levemente obscuros, grau 3 para córnea apresentando áreas de necrose e difícil visualização da pupila e grau 4 para completa opacidade da córnea.

As graduações atribuídas à íris compreendem grau 0 para íris normal, grau 1 para quando os vasos da íris apresentam congestão, inchaço mas esta ainda reage à luz e grau 2 para ausência de reação à luz ou hemorragia.

Na conjuntiva avalia-se distintamente a hiperemia e quemose, sendo que para a primeira atribui-se grau 0 para vasos normais, grau 1 para quando alguns vasos se encontram hiperemiados, grau 2 para vermelhidão difusa com vasos dificilmente discerníveis e grau 3 para vermelhidão intensa difusa.

Quanto à quemose considera-se grau 0 para ausência de edema, grau 1 para edema acima do normal (incluindo a membrana nictante), grau 2 para edema com eversão das pálpebras, grau 3 para pálpebras semi-fechadas e grau 4 para edema com pálpebras fechadas.

São consideradas como positivas as reações de grau 1 ou acima, para córnea e íris. Para hiperemia e quemose consideram-se positivas as respostas com grau 2 ou superior.

O critério de avaliação para definir o teste positivo ou negativo foi realizado segundo metodologia oficial (46), que considera como positivo o teste onde 4 ou mais animais exibam reação positiva. Se somente 1 animal exibir reação positiva, o resultado será considerado negativo, sendo o produto considerado não irritante.

Se 2 ou 3 animais exibirem uma reação positiva o teste deverá ser repetido utilizando um grupo diferente de 6 animais.

O segundo teste deverá ser considerado positivo se 3 ou mais animais exibirem uma reação positiva. Se somente 1 ou 2 animais, no segundo teste, exibirem uma reação positiva o teste deverá ser repetido com mais 6 animais

Se houver a necessidade de um terceiro teste, o produto será considerado irritante se algum animal exibir uma resposta positiva.

As observações prosseguiram após intervalos de 48 horas, 72 horas e 7 dias.

4.2.2.3 Teste *in vitro*

Para a realização do teste de citotoxicidade *in vitro* foram utilizadas duas linhagens celulares provenientes do American Type Culture Collection: NCTC clone 929 (ATCC-CCL 1) correspondente a células fibroblásticas de camundongo e células He La (ATCC CCL-2) célula epitelial de carcinoma de cérvix humano (1).

O trabalho foi desenvolvido em câmara asséptica com recurso de pressão positiva e sendo ainda provida de sistema de filtro absoluto. A câmara e ante-câmara eram em alvenaria, com piso em granilite, cantos arredondados, dispondo a câmara de bancadas de trabalho em aço inoxidável.

Os testes foram realizados empregando técnicas assépticas, fazendo-se uso de luvas, toucas, aventais e máscaras cirúrgicas estéreis.

As células foram cultivadas em garrafas de Roux contendo meio mínimo de Eagle com 10% de soro fetal bovino inativado, em estufa a $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$, por 48 horas. Para a preparação do meio de Eagle empregou-se água destilada, posteriormente submetida à purificação em aparelho Milli-Q Plus®. A adição do soro fetal bovino ocorreu após sua inativação a 56°C por 1 hora. O meio contendo o soro sofreu esterilização por filtração através de membranas de porosidade de $1,2\mu\text{m}$; $0,8\mu\text{m}$; $0,45\mu\text{m}$ e $0,22\mu\text{m}$, consecutivamente, precedidas por um pré-filtro (82).

Após o descarte do meio de crescimento, as células cultivadas em garrafas de Roux foram dispersas utilizando uma associação de tripsina 0,20% e versene a 0,02% e suspensas no mesmo meio de cultura, sendo que desta suspensão foram pipetados, para as placas de Petri descartáveis de 60 mm de diâmetro, um volume de 5 mL contendo cerca de 10^5

células/mL de meio. As placas foram incubadas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$, por 48 horas em estufa com ambiente de CO_2 a 5%.

O método utilizado para avaliar a citotoxicidade foi o de difusão em camada de agar sobreposta à monocamada de células, sendo utilizado um total de 6 placas por amostra (32, 93, 94, 37, 38, 80).

Após a formação do tapete celular e a avaliação microscópica da morfologia das células confirmando suas características, procedeu-se ao descarte do meio de crescimento, substituído por meio sólido de manutenção constituído de partes iguais do meio de Eagle duas vezes concentrado, sem soro fetal bovino, e de uma solução de agar a 1,8% contendo 0,01% de vermelho neutro. A fusão do agar em solução aquosa do indicador precedeu a mistura das partes constituintes do meio de manutenção e foi feita no momento do uso, estando ambos a uma temperatura de 44°C . Após homogeneização um volume de 5 mL do meio contendo agar foi adicionado sobre a camada de células.

Imediatamente após a solidificação à temperatura ambiente procedeu-se ao depósito, em cada placa, de 1 disco embebido em solução de amostra, ou na amostra concentrada. Foram empregados discos de papel de filtro qualitativo, de 5 mm de diâmetro, marca FRAMEX. As placas, contendo amostras e controles, foram novamente incubadas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ em ambiente de 5% de CO_2 , por 24 horas. Para cada amostra foram preparadas 6 placas e os controles positivo e negativo, constituíram-se de solução de hidróxido de sódio 1N e solução fisiológica obtida quando da preparação dos extratos, respectivamente.

A avaliação da toxicidade das amostras foi feita macroscopicamente pela medição do halo formado ao redor do disco de papel contendo a amostra e microscopicamente pela coloração e morfologia celulares, com a observação de formação de grânulos intra-citoplasmáticos, arredondamento ou lise celular (93). A graduação das reações foi feita obedecendo ao

descrito na Farmacopéia Americana 23^a edição, onde de acordo com o diâmetro do halo formado é atribuída uma pontuação: grau 0 para ausência de halo e lesões celulares embaixo ou ao redor da amostra, grau 1 para presença de células lesadas sob a amostra, grau 2 para halo de 0,5 cm, grau 3 para halo variando entre 0,5 cm e 1,0 cm e grau 4 para halo maior que 1,0 cm.

As fotomicrografias foram efetuadas em microscópio óptico marca ZEISS, modelo AXIOSKOP com máquina fotográfica acoplada utilizando filme KODAK GOLD Ultra 400.

4.2.3 Determinação do pH

Os valores de pH das amostras constituídas de colírios, xampus e matérias-primas foram determinados, a 25°C, em potenciômetro MICRONAL, modelo B 734, sem qualquer tratamento prévio, após calibração do aparelho com soluções tampões MERCK.

Resultados

5. RESULTADOS

5.1 Teste *in vivo*

Todas as amostras de colírio e frascos de polietileno apresentaram resultado negativo, para todos os lotes testados.

Para os xampus, tanto de uso adulto quanto infantil, as amostras diluídas a 5%, 1% e 0,1% apresentaram resultado negativo para todos os lotes testados. As Tabelas de 1 a 4 apresentam o número de animais que apresentaram reação positiva em qualquer dos intervalos de leitura, quando testadas as amostras de xampus de uso adulto e infantil não diluídos e nas concentrações de 25% e 5%.

As amostras de tensoativos apresentaram resultados negativos para as diluições a 1% e 0,1%. As Tabelas 5 e 6 apresentam o número de animais com reações positivas em qualquer intervalo de observação, para as amostras constituídas pelos tensoativos a 30% e 10%, respectivamente

Situação de olho normal do coelho é apresentada na Figura 17 e as lesões e reações nas diferentes estruturas são mostradas nas Figuras 18 a 23.

As Tabelas de 21 a 28 apresentam as médias, mediana, desvio padrão, valores mínimos e máximos das graduações das lesões na córnea, íris e conjuntiva - hiperemia e quemose - para as diluições de trabalho.

As médias das graduações por estrutura, durante o período de leitura, respectivamente, para xampus adulto e infantil, são apresentados nas Figuras 1 e 2 (100%); 3 e 4 (25%); 5 e 6 (5%). As médias das graduações para xampu adulto e infantil nas diferentes concentrações, para as diferentes estruturas, estão apresentadas nas Figuras de 7 a 10.

Para os tensoativos, as médias das graduações para cada dia e estrutura estão dispostas nas Figuras 11 e 12, respectivamente, para concentração de 30% e 10%. As médias das graduações obtidas para os tensoativos, nas duas concentrações, para as diferentes estruturas, estão nas Figuras de 13 a 16.

5.2 Teste *in vitro*

A ausência de citotoxicidade foi comprovada para todas as amostras de colírios testadas, assim como para as amostras representadas pelos extratos obtidos com os frascos de polietileno.

As Tabelas de 7 a 16 mostram os resultados obtidos nos testes de cultura celular, para xampus de uso adulto e infantil nas diferentes diluições, assim como os resultados para os tensoativos estão dispostos nas Tabelas de 17 a 20.

Os resultados dos testes utilizando as culturas celulares, quanto à frequência e porcentagens, estão demonstrados na Tabela 29, e a comparação entre os resultados obtidos com as metodologias *in vivo* e *in vitro* é apresentada nas Tabelas 30, 31 e 32, respectivamente, para xampus de uso infantil não diluídos e diluídos a 25% e 5%. As Tabelas 33, 34 e 35 apresentam os resultados para xampus de uso adulto a 25%, 5% e 1% e as Tabelas 36 a 39, para a totalidade dos xampus (de uso adulto e infantil), não diluídos, diluídos a 25%, 5% e 1%.

As Tabelas 40 a 43 mostram os valores de pH para xampus de uso adulto, xampus de uso infantil, tensoativos não diluídos e colírios, respectivamente.

As Figuras 24 e 25 mostram, respectivamente, os resultados negativo (controle) e positivo (xampu de uso adulto diluído a 5%) para o teste de citotoxicidade, avaliado macroscopicamente pelo halo de inibição.

As fotomicrografias das células normais, consideradas controle, são apresentadas nas Figuras 26 (células He La, 100x) e Figura 27 (células NCTC L 929, 100x). A Figura 28 apresenta zona limítrofe de resposta positiva, ou seja citotóxica.

As Tabelas 44, 45 e 46 mostram os resultados do teste *in vivo* e *in vitro*, para as amostras de xampus de uso adulto, de uso infantil e tensoativos, respectivamente

Tabela 1: Número de animais, em uma população de 6 animais, que exibiram reação positiva, para as estruturas observadas, quando testadas amostras de xampus de uso adulto não diluídos.

Amostra		Córnea	Íris	Conjuntiva		Resposta
				Hiperemia	Quemose	
A	Lote 1	2/6	4/6	6/6	3/6	+
	Lote 2	0/6	2/6	4/6	4/6	+
	Lote 3	3/6	4/6	4/6	5/6	+
B	Lote 1	1/6	6/6	4/6	6/6	+
	Lote 2	2/6	6/6	6/6	6/6	+
	Lote 3	4/6	5/6	6/6	5/6	+
C	Lote 1	5/6	4/6	5/6	4/6	+
	Lote 2	1/6	6/6	5/6	6/6	+
	Lote 3	3/6	5/6	5/6	6/6	+
D	Lote 1	2/6	6/6	6/6	4/6	+
	Lote 2	1/6	6/6	4/6	3/6	+
	Lote 3	1/6	6/6	6/6	6/6	+

(+) amostra irritante

(-) amostra não irritante

Tabela 2: Número de animais, em uma população de 6 animais, que exibiram reação positiva, para as estruturas observadas, quando testadas amostras de xampus de uso adulto diluídos a 25%.

Amostra		Córnea	Íris	Conjuntiva		Resposta
				Hiperemia	Quemose	
A	Lote 1	0/6	0/6	0/6	0/6	-
	Lote 2	0/6	0/6	0/6	0/6	-
	Lote 3	0/6	0/6	1/6	0/6	-
B	Lote 1	0/6	0/6	0/6	0/6	-
	Lote 2	0/6	4/6	0/6	4/6	+
	Lote 3	0/6	0/6	1/6	0/6	-
C	Lote 1	0/6	0/6	0/6	0/6	-
	Lote 2	0/6	0/6	1/6	0/6	-
	Lote 3	0/6	0/6	0/6	0/6	-
D	Lote 1	0/6	1/6	0/6	0/6	-
	Lote 2	0/6	0/6	0/6	0/6	-
	Lote 3	0/6	1/6	1/6	0/6	-

(+) amostra irritante

(-) amostra não irritante

Tabela 3: Número de animais, em uma população de 6 animais, que exibiram reação positiva, para as estruturas observadas, quando testadas amostras de xampus de uso infantil não diluídos.

Amostra		Córnea	Íris	Conjuntiva		Resposta
				Hiperemia	Quemose	
E	Lote 1	0/6	0/6	0/6	0/6	-
	Lote 2	0/6	0/6	0/6	0/6	-
	Lote 3	0/6	0/6	0/6	0/6	-
F	Lote 1	0/6	0/6	0/6	0/6	-
	Lote 2	0/6	0/6	0/6	2/6	+
	Lote 3	0/6	1/6	0/6	0/6	-
G	Lote 1	1/6	4/6	1/6	3/6	+
	Lote 2	0/6	2/6	2/6	2/6	+
	Lote 3	1/6	4/6	2/6	4/6	+
H	Lote 1	0/6	0/6	0/6	1/6	-
	Lote 2	0/6	0/6	1/6	0/6	-
	Lote 3	0/6	0/6	0/6	0/6	-

(+) amostra irritante

(-) amostra não irritante

Tabela 4: Número de animais, em uma população de 6 animais, que exibiram reação positiva, para as estruturas observadas, quando testadas amostras de xampus de uso infantil diluídos a 25%.

Amostra		Córnea	Íris	Conjuntiva		Resposta
				Hiperemia	Quemose	
E	Lote 1	0/6	0/6	0/6	0/6	-
	Lote 2	0/6	0/6	0/6	0/6	-
	Lote 3	0/6	0/6	1/6	0/6	-
F	Lote 1	0/6	0/6	0/6	0/6	-
	Lote 2	0/6	1/6	0/6	0/6	-
	Lote 3	0/6	0/6	1/6	0/6	-
G	Lote 1	0/6	0/6	0/6	0/6	-
	Lote 2	0/6	0/6	1/6	0/6	-
	Lote 3	0/6	0/6	0/6	0/6	-
H	Lote 1	0/6	1/6	0/6	0/6	-
	Lote 2	0/6	0/6	0/6	0/6	-
	Lote 3	0/6	1/6	1/6	0/6	-

(+) amostra irritante

(-) amostra não irritante

Tabela 5: Número de animais, em uma população de 6 animais, que exibiram reação positiva, para as estruturas observadas, quando testadas amostras de tensoativos diluídos a 30%.

Amostra	Córnea	Íris	Conjuntiva		Resposta
			Hiperemia	Quemose	
Surfax CN	4/6	6/6	4/6	4/6	+
Surfax SLA	2/6	5/6	3/6	4/6	+
Surfax 40	0/6	6/6	3/6	6/6	+
Surfax EDT	0/6	6/6	4/6	5/6	+
Plantarem 2000	3/6	4/6	3/6	3/6	+
Surfax ACR	2/6	6/6	3/6	6/6	+
(+) amostra irritante			(-) amostra não irritante		

Tabela 6: Número de animais, em uma população de 6 animais, que exibiram reação positiva, para as estruturas observadas, quando testadas amostras de tensoativos diluídos a 10%.

Amostra	Córnea	Íris	Conjuntiva		Resposta
			Hiperemia	Quemose	
Surfax CN	0/6	1/6	0/6	0/6	-
Surfax SLA	0/6	0/6	0/6	0/6	-
Surfax 40	0/6	0/6	0/6	0/6	-
Surfax EDT	0/6	6/6	0/6	1/6	+
Plantarem 2000	0/6	0/6	0/6	0/6	-
Surfax ACR	1/6	5/6	1/6	2/6	+
(+) amostra irritante			(-) amostra não irritante		

Tabela 7: Número de placas que apresentaram reação de citotoxicidade para as duas linhagens celulares com amostras de xampus de uso adulto não diluídos

Amostra		Linhagens Celulares		Resposta
		NCTC L 929	He La	
A	lote 1	6/6	6/6	+
	lote 2	6/6	6/6	+
	lote 3	6/6	6/6	+
B	lote 1	6/6	6/6	+
	lote 2	6/6	6/6	+
	lote 3	6/6	6/6	+
C	lote 1	6/6	6/6	+
	lote 2	6/6	6/6	+
	lote 3	6/6	6/6	+
D	lote 1	6/6	6/6	+
	lote 2	6/6	6/6	+
	lote 3	6/6	6/6	+
(+) amostra citotóxica		(-) amostra não citotóxica		

Tabela 8: Número de placas que apresentaram reação de citotoxicidade para as duas linhagens celulares com amostras de xampus de uso adulto diluídos a 25%

Amostra		Linhagens Celulares		Resposta
		NCTC L 929	He La	
A	lote 1	6/6	6/6	+
	lote 2	6/6	6/6	+
	lote 3	6/6	6/6	+
B	lote 1	6/6	6/6	+
	lote 2	6/6	6/6	+
	lote 3	6/6	6/6	+
C	lote 1	6/6	6/6	+
	lote 2	6/6	6/6	+
	lote 3	6/6	6/6	+
D	lote 1	6/6	6/6	+
	lote 2	6/6	6/6	+
	lote 3	6/6	6/6	+
(+) amostra citotóxica		(-) amostra não citotóxica		

Tabela 9: Número de placas que apresentaram reação de citotoxicidade para as duas linhagens celulares com amostras de xampus de uso adulto diluídos a 5%

Amostra		Linhagens Celulares		Resposta
		NCTC L 929	He La	
A	lote 1	6/6	6/6	+
	lote 2	6/6	6/6	+
	lote 3	6/6	6/6	+
B	lote 1	6/6	6/6	+
	lote 2	6/6	6/6	+
	lote 3	6/6	6/6	+
C	lote 1	6/6	6/6	+
	lote 2	6/6	6/6	+
	lote 3	6/6	6/6	+
D	lote 1	6/6	6/6	+
	lote 2	6/6	6/6	+
	lote 3	6/6	6/6	+
(+) amostra citotóxica		(-) amostra não citotóxica		

Tabela 10: Número de placas que apresentaram reação de citotoxicidade para as duas linhagens celulares com amostras de xampus de uso adulto diluídos a 1%

Amostra		Linhagens Celulares		Resposta
		NCTC L 929	He La	
A	lote 1	0/6	0/6	-
	lote 2	0/6	0/6	-
	lote 3	1/6	0/6	-
B	lote 1	6/6	6/6	+
	lote 2	6/6	6/6	+
	lote 3	6/6	6/6	+
C	lote 1	6/6	6/6	+
	lote 2	5/6	5/6	+
	lote 3	6/6	6/6	+
D	lote 1	4/6	6/6	+
	lote 2	6/6	6/6	+
	lote 3	4/6	6/6	+
(+) amostra citotóxica		(-) amostra não citotóxica		

Tabela 11: Número de placas que apresentaram reação de citotoxicidade para as duas linhagens celulares com amostras de xampus de uso adulto diluídos a 0,1%

Amostra		Linhagens Celulares		Resposta
		NCTC L 929	He La	
A	lote 1	0/6	0/6	-
	lote 2	0/6	0/6	-
	lote 3	0/6	0/6	-
B	lote 1	0/6	0/6	-
	lote 2	0/6	0/6	-
	lote 3	0/6	0/6	-
C	lote 1	0/6	0/6	-
	lote 2	0/6	0/6	-
	lote 3	0/6	0/6	-
D	lote 1	0/6	0/6	-
	lote 2	0/6	0/6	-
	lote 3	0/6	0/6	-
(+) amostra citotóxica		(-) amostra não citotóxica		

Tabela 12: Número de placas que apresentaram reação de citotoxicidade para as duas linhagens celulares com amostras de xampus de uso infantil não diluídos

Amostra		Linhagens Celulares		Resposta
		NCTC L 929	He La	
E	lote 1	6/6	6/6	+
	lote 2	6/6	6/6	+
	lote 3	6/6	6/6	+
F	lote 1	6/6	6/6	+
	lote 2	6/6	6/6	+
	lote 3	6/6	6/6	+
G	lote 1	6/6	6/6	+
	lote 2	6/6	6/6	+
	lote 3	6/6	6/6	+
H	lote 1	6/6	6/6	+
	lote 2	6/6	6/6	+
	lote 3	6/6	6/6	+
(+) amostra citotóxica		(-) amostra não citotóxica		

Tabela 13: Número de placas que apresentaram reação de citotoxicidade para as duas linhagens celulares com amostras de xampus de uso infantil diluídos a 25%

Amostra		Linhagens Celulares		Resposta
		NCTC L 929	He La	
E	lote 1	6/6	6/6	+
	lote 2	6/6	6/6	+
	lote 3	6/6	6/6	+
F	lote 1	6/6	6/6	+
	lote 2	6/6	6/6	+
	lote 3	6/6	6/6	+
G	lote 1	6/6	6/6	+
	lote 2	6/6	6/6	+
	lote 3	6/6	6/6	+
H	lote 1	6/6	6/6	+
	lote 2	6/6	6/6	+
	lote 3	6/6	6/6	+
(+) amostra citotóxica		(-) amostra não citotóxica		

Tabela 14: Número de placas que apresentaram reação de citotoxicidade para as duas linhagens celulares com amostras de xampus de uso infantil diluídos a 5%

Amostra		Linhagens Celulares		Resposta
		NCTC L 929	He La	
E	lote 1	0/6	0/6	-
	lote 2	0/6	0/6	-
	lote 3	0/6	0/6	-
F	lote 1	6/6	6/6	+
	lote 2	6/6	6/6	+
	lote 3	6/6	6/6	+
G	lote 1	6/6	6/6	+
	lote 2	6/6	6/6	+
	lote 3	6/6	6/6	+
H	lote 1	6/6	6/6	+
	lote 2	6/6	6/6	+
	lote 3	6/6	6/6	+
(+) amostra citotóxica		(-) amostra não citotóxica		

Tabela 15: Número de placas que apresentaram reação de citotoxicidade para as duas linhagens celulares com amostras de xampus de uso infantil diluídos a 1%

Amostra		Linhagens Celulares		Resposta
		NCTC L 929	He La	
E	lote 1	0/6	0/6	-
	lote 2	0/6	0/6	-
	lote 3	0/6	0/6	-
F	lote 1	0/6	0/6	-
	lote 2	0/6	0/6	-
	lote 3	0/6	0/6	-
G	lote 1	0/6	0/6	-
	lote 2	0/6	0/6	-
	lote 3	0/6	0/6	-
H	lote 1	0/6	1/6	-
	lote 2	0/6	0/6	-
	lote 3	0/6	0/6	-
(+) amostra citotóxica		(-) amostra não citotóxica		

Tabela 16: Número de placas que apresentaram reação de citotoxicidade para as duas linhagens celulares com amostras de xampus de uso infantil diluídos a 0,1%

Amostra		Linhagens Celulares		Resposta
		NCTC L 929	He La	
E	lote 1	0/6	0/6	+
	lote 2	0/6	0/6	+
	lote 3	0/6	0/6	+
F	lote 1	0/6	0/6	+
	lote 2	0/6	0/6	+
	lote 3	0/6	0/6	+
G	lote 1	0/6	0/6	+
	lote 2	0/6	0/6	+
	lote 3	0/6	0/6	+
H	lote 1	0/6	0/6	+
	lote 2	0/6	0/6	+
	lote 3	0/6	0/6	+
(+) amostra citotóxica		(-) amostra não citotóxica		

Tabela 17: Número de placas que apresentaram reação de citotoxicidade para as duas linhagens celulares com amostras de tensoativos diluídos a 30%

Amostra	Linhagens Celulares		Resposta
	NCTC L 929	He La	
Surfax CN	6/6	6/6	+
Surfax SLA	6/6	6/6	+
Surfax 40	6/6	6/6	+
Surfax EDT	6/6	6/6	+
Plantarem 2000	6/6	6/6	+
Surfax ACR	6/6	6/6	+
(+) amostra citotóxica	(-) amostra não citotóxica		

Tabela 18: Número de placas que apresentaram reação de citotoxicidade para as duas linhagens celulares com amostras de tensoativos diluídos a 10%

Amostra	Linhagens Celulares		Resposta
	NCTC L 929	He La	
Surfax CN	6/6	6/6	+
Surfax SLA	6/6	6/6	+
Surfax 40	6/6	6/6	+
Surfax EDT	6/6	6/6	+
Plantarem 2000	6/6	6/6	+
Surfax ACR	6/6	6/6	+
(+) amostra citotóxica	(-) amostra não citotóxica		

Tabela 19: Número de placas que apresentaram reação de citotoxicidade para as duas linhagens celulares com amostras de tensoativos diluídos a 1%

Amostra	Linhagens Celulares		Resposta
	NCTC L 929	He La	
Surfax CN	0/6	0/6	-
Surfax SLA	0/6	0/6	-
Surfax 40	0/6	0/6	-
Surfax EDT	0/6	0/6	-
Plantarem 2000	0/6	0/6	-
Surfax ACR	0/6	0/6	-
(+) amostra citotóxica	(-) amostra não citotóxica		

Tabela 20: Número de placas que apresentaram reação de citotoxicidade para as duas linhagens celulares com amostras de tensoativos diluídos a 0,1%

Amostra	Linhagens Celulares		Resposta
	NCTC L 929	He La	
Surfax CN	0/6	0/6	-
Surfax SLA	0/6	0/6	-
Surfax 40	0/6	0/6	-
Surfax EDT	0/6	0/6	-
Plantarem 2000	0/6	0/6	-
Surfax ACR	0/6	0/6	-
(+) amostra citotóxica	(-) amostra não citotóxica		

Tabela 21: Médias, medianas, desvios padrão, valores mínimos e máximos das graduações de cada reação no teste *in vivo*, para xampu de uso adulto não diluído

Estrutura		Dia			
		1	2	3	7
Córnea	Média	0.153	0.181	0.239	0.250
	Mediana	0.000	0.000	0.000	0.000
	DP	0.362	0.387	0.547	0.622
	Mínimo	0	0	0	0
	Máximo	1	1	2	3
Íris	Média	0.736	0.569	0.333	0.114
	Mediana	1.000	1.000	0.000	0.000
	DP	0.444	0.499	0.475	0.320
	Mínimo	0	0	0	0
	Máximo	1	1	1	1
Conjuntiva (hiperemia)	Média	1.472	1.681	1.264	0.514
	Mediana	1.000	2.000	1.000	0.000
	DP	0.503	0.601	0.712	0.731
	Mínimo	1	0	0	0
	Máximo	2	3	3	3
Conjuntiva (quemose)	Média	2.222	1.486	0.986	0.486
	Mediana	2.000	1.000	1.000	0.000
	DP	0.859	1.199	1.094	0.979
	Mínimo	0	0	0	0
	Máximo	4	4	3	3

DP: desvio padrão

Tabela 22: Médias, medianas, desvios padrão, valores mínimos e máximos das graduações para cada reação no teste *in vivo*, para xampu de uso infantil não diluído

Estrutura		Dia			
		1	2	3	7
Córnea	Média	0.013	0.000	0.000	0.042
	Mediana	0.000	0.000	0.000	0.000
	DP	0.113	0.000	0.000	0.264
	Mínimo	0	0	0	0
	Máximo	1	0	0	2
Íris	Média	0.179	0.103	0.026	0.014
	Mediana	0.000	0.000	0.000	0.000
	DP	0.386	0.305	0.159	0.119
	Mínimo	0	0	0	0
	Máximo	1	1	1	1
Conjuntiva (hiperemia)	Média	0.987	0.795	0.308	0.070
	Mediana	1.000	1.000	0.000	0.000
	DP	0.254	0.589	0.565	0.351
	Mínimo	0	0	0	0
	Máximo	2	3	3	2
Conjuntiva (quemose)	Média	0.744	0.244	0.051	0.056
	Mediana	0.500	0.000	0.000	0.000
	DP	0.889	0.461	0.274	0.333
	Mínimo	0	0	0	0
	Máximo	3	2	2	2

DP: desvio padrão

Tabela 23: Médias, medianas, desvios padrão, valores mínimos e máximos das graduações de cada reação no teste *in vivo*, para xampu de uso adulto diluído a 25%

Estrutura		Dia			
		1	2	3	7
Córnea	Média	0.000	0.011	0.011	0.011
	Mediana	0.000	0.000	0.000	0.000
	DP	0.000	0.105	0.105	0.105
	Mínimo	0	0	0	0
	Máximo	0	1	1	1
Íris	Média	0.222	0.100	0.011	0.011
	Mediana	0.000	0.000	0.000	0.000
	DP	0.444	0.337	0.105	0.105
	Mínimo	0	0	0	0
	Máximo	2	2	1	1
Conjuntiva (hiperemia)	Média	0.911	0.511	0.189	0.033
	Mediana	1.000	0.000	0.000	0.000
	DP	0.466	0.566	0.421	0.181
	Mínimo	0	0	0	0
	Máximo	2	2	2	1
Conjuntiva (quemose)	Média	0.322	0.111	0.022	0.011
	Mediana	0.000	0.000	0.000	0.000
	DP	0.596	0.350	0.211	0.105
	Mínimo	0	0	0	0
	Máximo	2	2	2	1

DP: desvio padrão

Tabela 24: Médias, medianas, desvios padrão, valores mínimos e máximos das graduações de cada reação no teste *in vivo*, para xampu de uso infantil diluído a 25%

Estrutura		Dia			
		1	2	3	7
Córnea	Média	0.000	0.000	0.000	0.000
	Mediana	0.000	0.000	0.000	0.000
	DP	0.000	0.000	0.000	0.000
	Mínimo	0	0	0	0
	Máximo	0	0	0	0
Íris	Média	0.000	0.000	0.000	0.000
	Mediana	0.000	0.000	0.000	0.000
	DP	0.000	0.000	0.000	0.000
	Mínimo	0	0	0	0
	Máximo	0	0	0	0
Conjuntiva (hiperemia)	Média	0.264	0.069	0.028	0.000
	Mediana	0.000	0.000	0.000	0.000
	DP	0.444	0.256	0.165	0.000
	Mínimo	0	0	0	0
	Máximo	1	1	1	0
Conjuntiva (quemose)	Média	0.000	0.000	0.000	0.000
	Mediana	0.000	0.000	0.000	0.000
	DP	0.000	0.000	0.000	0.000
	Mínimo	0	0	0	0
	Máximo	0	0	0	0

DP: desvio padrão

Tabela 25: Médias, medianas, desvios padrão, valores mínimos e máximos das graduações de cada reação no teste *in vivo*, para xampu de uso adulto diluído a 5%

Estrutura		Dia			
		1	2	3	7
Córnea	Média	0.000	0.000	0.000	0.000
	Mediana	0.000	0.000	0.000	0.000
	DP	0.000	0.000	0.000	0.000
	Mínimo	0	0	0	0
	Máximo	0	0	0	0
Íris	Média	0.000	0.000	0.000	0.000
	Mediana	0.000	0.000	0.000	0.000
	DP	0.000	0.000	0.000	0.000
	Mínimo	0	0	0	0
	Máximo	0	0	0	0
Conjuntiva (hiperemia)	Média	0.027	0.014	0.000	0.000
	Mediana	0.000	0.000	0.000	0.000
	DP	0.164	0.117	0.000	0.000
	Mínimo	0	0	0	0
	Máximo	1	1	0	0
Conjuntiva (quemose)	Média	0.000	0.000	0.000	0.000
	Mediana	0.000	0.000	0.000	0.000
	DP	0.000	0.000	0.000	0.000
	Mínimo	0	0	0	0
	Máximo	0	0	0	0

DP: desvio padrão

Tabela 26: Médias, medianas, desvios padrão, valores mínimos e máximos das graduações de cada reação no teste *in vivo*, para xampu de uso infantil diluído a 5%

Estrutura		Dia			
		1	2	3	7
Córnea	Média	0.000	0.000	0.000	0.000
	Mediana	0.000	0.000	0.000	0.000
	DP	0.000	0.000	0.000	0.000
	Mínimo	0	0	0	0
	Máximo	0	0	0	0
Íris	Média	0.000	0.000	0.000	0.000
	Mediana	0.000	0.000	0.000	0.000
	DP	0.000	0.000	0.000	0.000
	Mínimo	0	0	0	0
	Máximo	0	0	0	0
Conjuntiva (hiperemia)	Média	0.028	0.000	0.000	0.000
	Mediana	0.000	0.000	0.000	0.000
	DP	0.165	0.000	0.000	0.000
	Mínimo	0	0	0	0
	Máximo	1	0	0	0
Conjuntiva (quemose)	Média	0.000	0.000	0.000	0.000
	Mediana	0.000	0.000	0.000	0.000
	DP	0.000	0.000	0.000	0.000
	Mínimo	0	0	0	0
	Máximo	0	0	0	0

DP: desvio padrão

Tabela 27: Médias, medianas, desvios padrão, valores mínimos e máximos das graduações de cada reação no teste *in vivo*, para tensoativos diluídos a 30%

Estrutura		Dia			
		1	2	3	7
Córnea	Média	0.000	0.167	0.278	0.056
	Mediana	0.000	0.000	0.000	0.000
	DP	0.000	0.378	0.454	0.232
	Mínimo	0	0	0	0
	Máximo	0	1	1	1
Íris	Média	1.083	0.861	0.556	0.000
	Mediana	1.000	1.000	0.000	0.000
	DP	0.368	0.487	0.735	0.000
	Mínimo	0	0	0	0
	Máximo	2	2	2	0
Conjuntiva (hiperemia)	Média	1.111	1.528	1.306	0.083
	Mediana	1.000	1.000	1.000	0.000
	DP	0.319	0.654	0.577	0.280
	Mínimo	1	1	0	0
	Máximo	2	3	2	1
Conjuntiva (quemose)	Média	1.889	1.306	0.889	0.167
	Mediana	2.000	1.000	1.000	0.000
	DP	0.785	0.710	0.950	0.507
	Mínimo	1	0	0	0
	Máximo	4	3	3	2

DP: desvio padrão

Tabela 28: Médias, medianas, desvios padrão, valores mínimos e máximos das graduações para cada reação no teste *in vivo*, para tensoativos diluídos a 10%

Estrutura		Dia			
		1	2	3	7
Córnea	Média	0.024	0.000	0.000	0.000
	Mediana	0.000	0.000	0.000	0.000
	DP	0.154	0.000	0.000	0.000
	Mínimo	0	0	0	0
	Máximo	1	0	0	0
Íris	Média	0.381	0.071	0.024	0.000
	Mediana	0.000	0.000	0.000	0.000
	DP	0.539	0.261	0.154	0.000
	Mínimo	0	0	0	0
	Máximo	2	1	1	0
Conjuntiva (hiperemia)	Média	0.905	0.738	0.310	0.000
	Mediana	1.000	1.000	0.000	0.000
	DP	0.297	0.497	0.468	0.000
	Mínimo	0	0	0	0
	Máximo	1	2	1	0
Conjuntiva (quemose)	Média	0.810	0.214	0.024	0.000
	Mediana	1.000	0.000	0.000	0.000
	DP	0.634	0.470	0.154	0.000
	Mínimo	0	0	0	0
	Máximo	2	2	1	0

DP: desvio padrão

Tabela 29: Resultados dos testes *in vitro* (frequências, porcentagens por linha e por coluna) com as células Hela e NCTC:

Graduação Hela	Graduação NCTC				Total
	0	1	3	4	
0	237	1	0	1	239
	99.2	0.4	0.0	0.4	29.6
	90.1	12.5	0.0	0.2	
1	14	1	0	1	16
	87.5	6.2	0.0	6.2	1.9
	5.3	12.5	0.0	0.2	
3	3	2	15	3	23
	13.0	8.7	65.2	13.0	2.7
	1.1	25.0	71.4	0.6	
4	9	4	6	538	557
	1.6	0.7	1.1	96.6	66.7
	3.4	50.0	28.6	99.1	
Total	263	8	21	543	835
	31.5	1.0	2.5	65.0	100.0

Tabela 30: Resultados dos testes *in vivo* e *in vitro* para xampus de uso infantil não diluídos

<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>		Total
	-	+	
-	0 (0.0)	8 (66.7)	8 (66.7)
+	0 (0.0)	4 (33.3)	4 (33.3)
Total	0 (0.0)	12 (100.0)	12 (100.0)

Tabela 31: Resultados dos testes *in vivo* e *in vitro* para xampus de uso infantil diluídos a 25%

<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>		Total
	-	+	
-	0 (0.0)	12 (100.0)	12 (100.0)
+	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Total	0 (0.0)	12 (100.0)	12 (100.0)

Tabela 32: Resultados dos testes *in vivo* e *in vitro* para xampus de uso infantil diluídos a 5%

	<i>In vitro</i>		
<i>In vivo</i>	-	+	Total
-	3 (100.0)	9 (100.0)	12 (100.0)
+	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Total	3 (100.0)	9 (100.0)	12 (100.0)

Tabela 33: Resultados dos testes *in vivo* e *in vitro* para xampus de uso adulto diluídos a 25%

	<i>In vitro</i>		
<i>In vivo</i>	-	+	Total
-	0 (0.0)	11 (91.7)	11 (91.7)
+	0 (0.0)	1 (8.3)	1 (8.3)
Total	0 (0.0)	12 (100.0)	12 (100.0)

Tabela 34: Resultados dos testes *in vivo* e *in vitro* para xampus de uso adulto diluídos a 5%

	<i>In vitro</i>		
<i>In vivo</i>	-	+	Total
-	0 (0.0)	12 (100.0)	12 (100.0)
+	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Total	0 (0.0)	12 (100.0)	12 (100.0)

Tabela 35: Resultados dos testes *in vivo* e *in vitro* para xampus de uso adulto diluídos a 1%

	<i>In vitro</i>		
<i>In vivo</i>	-	+	Total
-	3 (100.0)	9 (100.0)	12 (100.0)
+	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Total	2 (100.0)	10 (100.0)	12 (100.0)

Tabela 36: Resultados dos testes *in vivo* e *in vitro* para xampu de uso adulto e infantil não diluídos

	<i>In vitro</i>		
<i>In vivo</i>	-	+	Total
-	0 (0.0)	8 (33.3)	8 (33.3)
+	0 (0.0)	16 (66.7)	16 (66.7)
Total	0	24 (100.0)	24 (100.0)

Tabela 37: Resultados dos testes *in vivo* e *in vitro* para xampu de uso adulto e infantil diluídos a 25%

	<i>In vitro</i>		
<i>In vivo</i>	-	+	Total
-	0	23 (95.8)	23 (95.8)
+	0	1 (4.2)	1 (4.2)
Total	0	24 (100.0)	24 (100.0)

Tabela 38: Resultados dos testes *in vivo* e *in vitro* para xampus de uso adulto e infantil diluídos a 5%

+	<i>In vitro</i>		Total
	-	+	
<i>In vivo</i>			
-	3 (100.0)	21 (100.0)	24 (100.0)
+	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Total	3 (100.0)	21 (100.0)	24 (100.0)

Tabela 39: Resultados dos testes *in vivo* e *in vitro* para xampus de uso adulto e infantil diluídos a 1%

	<i>In vitro</i>		Total
	-	+	
<i>In vivo</i>			
-	15 (100.0)	9 (100.0)	24 (100.0)
+	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Total	15 (100.0)	9 (100.0)	24 (100.0)

Tabela 40: Valores de pH para amostras de xampus de uso adulto

Amostra	Lote	pH
A	1	7,48
	2	7,22
	3	6,70
B	1	7,35
	2	7,35
	3	7,33
C	1	7,78
	2	7,72
	3	7,94
D	1	7,25
	2	7,35
	3	7,34

Tabela 41: valores de pH para amostras de xampus de uso infantil

Amostra	Lote	pH
E	1	7,28
	2	7,08
	3	7,12
F	1	7,18
	2	6,85
	3	7,05
G	1	7,32
	2	7,34
	3	7,58
H	1	6,68
	2	6,58
	3	6,62

Tabela 42: Valores de pH para amostras de tensoativos

Amostra	Lote	pH
Surfax CN	26.0025	8,78
Surfax SLA	25.0049	4,99
Surfax 40	25.0028	7,45
Surfax EDT	91.6132	6,58
Surfax ACR	_____	5,42
Plantarem 2000	_____	8,23

Tabela 43: valores de pH para amostras de colírios

Amostra	Lote	pH
Maxitrol	NC 030	5,55
	NC 027	5,65
	MK 013	5,58
Maxidex	MM 016	5,73
	NC 025	5,65
	MK 010	5,75
Tobrex	NB 053	7,74
	ND 041	7,74
	NB 027	7,69
Mydriacyl 1%	NJ 026	4,71
	NF 023	4,90
	NH 075	4,76
Isopto Carpine 2%	MG 037	3,98
Claril	ND 025	6,19
	NF 006	6,22
	ME 047	6,22
Isopto Carpine 4%	KM 014	4,21
	NF 010	4,29

Tabela 44: Resultados dos testes *in vivo* e *in vitro* empregando amostras de xampus de uso adulto não diluídos e após diluições

Amostra	Lote	100% <i>in vivo</i>	25% <i>in vivo</i>	5% <i>in vivo</i>	1% <i>in vivo</i>	0,1% <i>in vivo</i>
A	1	I	NI	NI	NI	NI
	2	C	C	C	NC	NC
	3	C	NI	NI	NC	NC
B	1	I	NI	NI	NI	NI
	2	C	I	C	C	NC
	3	C	NI	NI	C	NC
C	1	I	NI	NI	NI	NI
	2	C	NI	NI	C	NC
	3	C	NI	NI	C	NC
D	1	I	NI	NI	NI	NI
	2	C	NI	NI	C	NC
	3	C	NI	NI	C	NC

I - Irritante NI - Não Irritante C - Citotóxico NC - Não Citotóxico

Tabela 45: Resultados dos testes *in vivo* e *in vitro* empregando amostras de xampus de uso infantil não diluídos e após diluições

Amostra	Lote	100% <i>in vivo</i> <i>in vitro</i>		25% <i>in vivo</i> <i>in vitro</i>		5% <i>in vivo</i> <i>in vitro</i>		1% <i>in vivo</i> <i>in vitro</i>		0,1% <i>in vivo</i> <i>in vitro</i>	
E	1	NI	C	NI	C	NI	NC	NI	NC	NI	NC
	2	NI	C	NI	C	NI	NC	NI	NC	NI	NC
	3	NI	C	NI	C	NI	NC	NI	NC	NI	NC
F	1	NI	C	NI	C	NI	C	NI	NC	NI	NC
	2	NI	C	NI	C	NI	C	NI	NC	NI	NC
	3	NI	C	NI	C	NI	C	NI	NC	NI	NC
G	1	I	C	NI	C	NI	C	NI	NC	NI	NC
	2	I	C	NI	C	NI	C	NI	NC	NI	NC
	3	I	C	NI	C	NI	C	NI	NC	NI	NC
H	1	NI	C	NI	C	NI	C	NI	NC	NI	NC
	2	NI	C	NI	C	NI	C	NI	NC	NI	NC
	3	NI	C	NI	C	NI	C	NI	NC	NI	NC
I - Irritante	NI - Não Irritante	C - Citotóxico		NC - Não Citotóxico							

Tabela 46: Resultados dos testes *in vivo* e *in vitro* para todas as diluições empregando amostras de tensoativos

Amostra	30% <i>in vivo</i> <i>in vitro</i>		10% <i>in vivo</i> <i>in vitro</i>		1% <i>in vivo</i> <i>in vitro</i>		0,1% <i>in vivo</i> <i>in vitro</i>	
Surfax CN	I	C	NI	C	NI	NC	NI	NC
Surfax SLA	I	C	NI	C	NI	NC	NI	NC
Surfax 40	I	C	NI	C	NI	NC	NI	NC
Surfax EDT	I	C	I	C	NI	NC	NI	NC
Surfax ACR	I	C	I	C	NI	NC	NI	NC
Plantarm 2000	I	C	NI	C	NI	NC	NI	NC

I - Irritante

NI - Não Irritante

C - Citotóxico

NC - Não Citotóxico

Figura 1: Médias das graduações por estrutura para cada dia, para xampu adulto (100%)

Figura 2: Médias das graduações por estrutura para cada dia, para xampu infantil (100%)

Figura 3: Médias das graduações por estrutura para cada dia, para xampu adulto (25%)

Figura 4: Médias das graduações por estrutura para cada dia, para xampu infantil (25%)

Figura 5: Médias das graduações por estrutura para cada dia, para xampu adulto (5%)

Figura 6: Médias das graduações por estrutura para cada dia, para xampu infantil (5%)

Figura 7: Médias das graduações da córnea para cada dia e diferentes concentrações dos xampus

Figura 8: Médias das graduações da íris para cada dia e diferentes concentrações dos xampus

Figura 9: Médias das graduações da hiperemia para cada dia e diferentes concentrações dos xampus

Figura 10: Médias das graduações da quemose para cada dia e diferentes concentrações dos xampus

Figura 11: Médias das graduações das estruturas para cada dia, para tensoativos (30%)

Figura 12: Médias das graduações das estruturas para cada dia, para tensoativos (10%)

Figura 13: Médias das graduações da córnea para cada dia e diferentes concentrações dos tensoativos

Figura 14: Médias das graduações da íris para cada dia e diferentes concentrações dos tensoativos

Figura 15: Médias das graduações para hiperemia para cada dia e diferentes concentrações dos tensoativos

Figura 16: Médias das graduações para quemose para cada dia e diferentes concentrações dos tensoativos

Figura 17 - Olho Normal

Figura 18 - Quemose Grau 1, observação após 24h, amostra de xampu de uso adulto diluído a 25%

Figura 19 - Córnea Grau 0, Irite Grau 1, Hiperemia Grau, Quemose Grau 3, observação após 24h, amostra de xampu de uso adulto não diluído

Figura 20 - Córnea Grau 1, Irite Grau 1, Hiperemia Grau 2 e Quemose Grau 2, observação após 24h, amostra de xampu de uso adulto não diluído

A (Pannus) B (Opacidade)

Figura 21 - Córnea Grau 0, Irite Grau 1, Hiperemia Grau 2 e Quemose Grau 3, observação após 48h, amostra de xampu de tensoativo aniônico diluído a 30%

Figura 22 - Quemose Grau 4, observação após 24h, amostra de xampu de uso adulto não diluído

Figura 23 – Secreção, após 24h de instilação da amostra

Figura 24 - Placa com controle negativo (solução fisiológica 0,9%)

Figura 25 - Citotoxicidade *in vitro* (resultado positivo), presença de halo ao redor da amostra, xampu de uso adulto diluído a 5%

Figura 26 - Células He La coradas pelo vermelho neutro
Fotomicrografia (100x)

Figura 27 - Células NCTC L 929 coradas pelo vermelho neutro
Fotomicrografia (100x)

Figura 28 - Zona limítrofe do halo de contraste, células NCTC L 929.
Fotomicrografia (100 x)

Discussão

6. DISCUSSÃO

As amostras de produtos terminados, portanto representando exatamente as condições sob as quais o consumidor no geral as recebe, foram analisadas quanto ao cumprimento da legislação. Aquelas representadas pelos colírios atenderam às exigências com relação à rotulagem apresentando o texto em português com designação do produto, lote ou partida, data de fabricação, prazo de validade, razão social do fabricante, ingrediente ativo, indicação de ser um produto estéril, número de registro do produto no Ministério da Saúde, nome do técnico responsável e seu número de registro na autarquia profissional. Ainda, eram sempre acompanhadas das bulas, também com o texto em conformidade com as exigências legais.

As amostras de xampus representadas pelas letras A, B, C, e D, para xampus de uso adulto; letras E, F, G e H para xampus de uso infantil, apresentaram a rotulagem de acordo com o requerido pela legislação quanto à discriminação qualitativa dos ingredientes ativos. Apenas uma delas apresentava adicionalmente a descrição quantitativa da fórmula do produto. Todas continham informação quanto ao número de registro no Ministério da Saúde, bem como o número de registro do responsável técnico na autarquia profissional correspondente.

Na amostra de xampu de uso infantil, representado pela letra H, não constava o nome do técnico responsável, sendo que o primeiro lote adquirido ainda apresentava o número do protocolo no Ministério da Saúde. Os lotes adquiridos posteriormente já continham o número de registro do produto, sendo que em todos os lotes houve a apresentação do texto em português, embora em etiqueta adesiva adicional.

Ainda atrelada aos aspecto legal, pode-se mencionar exigência quanto à inocuidade do produto. Em produtos farmacêuticos no geral, esta característica está representada pelo teste de inocuidade via injeção

sistêmica, conforme preconizado na Farmacopéia Brasileira IV (47), não sendo requerido especificamente o teste de irritação ocular.

Em se tratando de produtos cosméticos, em particular para xampus infantis, desde 1977, pelo Decreto nº 79094 (23), é prevista a exigência quanto ao teste de irritação ocular. Embora possa se criticar a ausência de requisito equivalente para o produto adulto, de outro lado este grupo de consumidores certamente terá o cuidado no enxague cuidadoso de porções residuais que venham a atingir os olhos, justificando a diferença.

Ainda assim, julgou-se interessante, no presente trabalho, proceder à avaliação de amostragem não apenas de xampus destinados ao uso infantil, mas também adulto. Esta abrangência permitiu ter conhecimento amplo da qualidade biológica dos xampus, que reflete diretamente condições de seriedade no desenvolvimento do produto, assim como no atendimento a *Boas Práticas de Fabricação*, por parte dos produtores.

A avaliação da toxicidade de substâncias potencialmente irritantes prescinde de um modelo para ser empregado nos casos onde espera-se uma resposta severa, pois a utilização de voluntários defronta-se com aspectos de natureza ética ou mesmo econômica, embora existam vários estudos neste sentido (11, 70).

Devido às dificuldades acima citadas, a metodologia tradicionalmente empregada é aquela que faz uso de animais, que nos últimos tempos têm sofrido restrições, seja por não predizer fielmente a resposta humana, ou ainda pela agressão imposta aos animais devido à severidade dos testes.

Esforços têm sido feitos no sentido de desenvolvimento de metodologias que sirvam de alternativa ao uso de animais, no geral denominados métodos *in vitro* (5, 13, 42, 47, 49).

Apesar de tais tendências, a avaliação do potencial irritante de substâncias que entram em contato com os olhos tem sido feita através da

metodologia proposta por Draize (42), onde são empregados coelhos. Este teste recebe inúmeras críticas devido às diferenças fisiológicas existentes entre o olho humano e o do coelho, dentre as quais a existência da membrana nictante no olho do coelho. Embora esta diferença anatômica possa ser responsável pela exacerbação do efeito-resposta, em estudo realizado por Buehler & Newman (28) onde houve a remoção cirúrgica da membrana, não foi observada alteração no tempo de recuperação da córnea após exposição ao agente irritante.

As diferenças ocorrem também quanto ao mecanismo de produção de lágrimas, bem menos efetivo no coelho e pela diferença de espessura das estruturas anatômicas do olho (28). A córnea é composta de 5 camadas: epitélio, membrana de Bowman, estroma, membrana de Descemet e endotélio, sendo conhecidas as diferenças quanto à espessura das camadas. A membrana de Bowman tem a espessura de 1,75 μm no olho do coelho e 8,4 μm no olho humano, podendo esta diferença explicar a maior sensibilidade revelada pelo olho do animal. A fim de obter uma resposta que melhor reproduza a reação do olho humano, entre outras variáveis, tem sido objeto de estudo a diminuição do volume de amostra a ser instilado (66), para testes prévios ou seja de triagem de novas substâncias ou formulações.

No presente trabalho optou-se por trabalhar com o volume descrito em metodologia oficial por questões práticas, como a correta medição do volume e segurança quanto ao contato efetivo deste volume de forma homogênea com a superfície do globo ocular. O número de animais utilizado neste estudo respeitou metodologia descrita em protocolo do FDA (46), que recomenda a utilização de 6 animais para o teste. Entretanto, estudos têm sido desenvolvidos visando reduzir o número de animais, principalmente quando na avaliação de substâncias altamente irritantes (41, 88). O autores propõem a redução para até um coelho, sendo que, em se obtendo resposta negativa, a amostra seja testada em um número maior de animais (88).

Em função das observações feitas durante o desenvolvimento dos trabalhos práticos, não recomendamos tal modificação devido às variações

apresentadas por alguns animais, o que no entanto, não comprometeu a execução do teste por ter-se trabalhado com uma população mais expressiva. Aliado a isto, faz-se necessário mencionar um dispêndio maior de tempo, pois quando da redução do número de animais, haverá a necessidade de uma segunda bateria de testes em caso de resposta positiva, ou seja irritante.

Dentre as metodologias alternativas propostas, a cultura de células se apresenta como um método bastante promissor, pois modelos podem ser obtidos de células humanas (34, 45, 92), o que permitiria a realização dos testes em estruturas semelhantes às aquelas que estarão de fato expostas às substâncias químicas, obtendo-se, assim uma resposta confiável. Células de diversas origens têm sido empregadas para estudos de citotoxicidade, sendo que linhagens celulares estabelecidas (1) são objeto de primeira escolha, pois consistem em reagente biológico com características definidas e que não apresentam as limitações de uma cultura primária, seja com relação à obtenção, padronização ou manutenção.

Várias linhagens, abrangendo células epiteliais e fibroblásticas, têm sido objeto de estudo visando comprovar uma correlação com os dados obtidos *in vivo*, tendo as duas células escolhidas para este estudo contemplado estas duas classificações. Por se tratar de uma linhagem celular estabelecida, as células He La garantem uma reprodutibilidade nos resultados, assegurada pela manutenção de suas características durante o transcorrer do trabalho experimental, conforme se depreende do seu emprego em estudos de vários autores, para avaliação de potencial irritante de tensoativos (61) ou avaliação da biocompatibilidade de material de uso médico-hospitalar (37, 38, 80). Sua sensibilidade foi comprovada por Cruz & colaboradores (38) através da comparação com outras células empregando o método de difusão em camada de agar (32).

A linhagem celular NCTC L 929 (fibroblastos de camundongo), também empregada neste estudo, é a célula descrita na Farmacopéia Americana 23ª edição (93) para realização do teste de citotoxicidade para

materiais poliméricos utilizando método de difusão em camada de agar, tendo sido utilizada para avaliação da qualidade de produtos médico-hospitalares (80). Também é a célula de escolha para o teste de citotoxicidade para produtos absorventes descartáveis de uso externo e intravaginal, descrito na portaria 1.480 do Ministério da Saúde (23), por ser uma célula de fácil manuseio e visualização da toxicidade devido a sua morfologia e tamanho.

Observando os resultados obtidos nos teste de irritação ocular, considerando inicialmente o grupo de colírios, foi tranquilizador observar que para as duas metodologias, as sete marcas de produtos utilizados mostraram-se seguras quanto ao caráter tóxico. De certa forma esta constatação pode ser facilmente entendida, uma vez que a formulação é basicamente uma solução aquosa isotonicada, contendo os princípios ativos em concentrações relativamente baixas, embora possam ser observados os valores de pH (Tabela 43), de forma geral inferiores à faixa recomendável para produtos cosméticos (24).

Exceto no produto Tobrex®, para o qual os três lotes estudados forneceram valores na faixa de 7,69 a 7,74, para as demais marcas os valores estiveram entre 6,22 e 3,98, resultado obtido para o Isopto Carpine 2%. Tal fato dirige a pensamento no sentido de questionar, não a inexistência de legislação específica para este parâmetro aplicável a colírios, mas sim no sentido de reavaliar a faixa de pH, proposta para cosméticos. Estudos demonstram que substâncias alcalinas promovem maiores danos à córnea que substâncias ácidas, devido à maior dificuldade, destas últimas em atravessar o epitélio córneo, que funciona como uma barreira de proteção para as estruturas mais internas (73).

Comportamento semelhante no que diz respeito a segurança biológica foi observado para os frascos de acondicionamento para colírios testados através de seus extratos. A inércia química inerente ao polietileno, material polimérico empregado na sua confecção (33), assim como o

emprego de solução fisiológica como meio extrator explicam tal comportamento e, inclusive, os valores extremamente compatíveis de pH na faixa de 7,0 a 7,4. Aspecto a considerar, embora não se tenha abrangido, no presente trabalho, seria investigar quais materiais poliméricos têm sido empregados no acondicionamento de xampus, pois dependendo de sua estabilidade química podem contribuir de forma direta para a liberação de componentes da massa polimérica, ou indireta, devido a problemas de estabilidade do sistema e interação com componentes da formulação cosmética, eventuais reações de natureza tóxica e, simultaneamente, eventuais desvios de pH.

No caso dos tensoativos, insumos tipicamente empregados na manufatura de xampus, passa-se a observar, para ensaios *in vivo* e *in vitro*, resultados positivos. Anteriormente à interpretação mais detalhada de tais resultados, expressos quando da diluição dos insumos a 30% na Tabela 5 e 10% na Tabela 6, vale lembrar o critério de interpretação dos testes descritos na metodologia item (4.2.2.2), que considera como resultado negativo para a amostra quando somente 1 animal apresenta resultado positivo para qualquer uma das estruturas observadas. Para 2 ou 3 animais com resultado positivo é indicada condição de reteste e acima de 4 animais caracteriza-se uma amostra irritante para o olho.

Para considerar o animal exibindo resultado positivo é feita a avaliação de três estruturas do olho: córnea, íris e conjuntiva, sendo que nesta última observa-se a hiperemia e quemose. São consideradas como positivas as reações de grau 1 para córnea e íris e grau 2 para hiperemia e quemose.

Observa-se para os tensoativos diluídos a 30% (Tabela 5), que todas as amostras são irritantes, sendo que praticamente toda a população de animais evidenciou resultados positivos para íris, e em menor número para córnea. Mais comumente porém, tais componentes representam 10% ou menos de uma formulação de xampu (96), sendo isto considerado para proceder ao teste de outras diluições. Tal consideração leva a contemplar a

Tabela 6, onde apenas o Surfax EDT e Surfax ACR, respectivamente aniônico e anfótero, mostram quadro de resposta positiva predominante da íris (6 e 5 do total de 6 animais, respectivamente).

Paralelamente à metodologia *in vivo*, na observação da Tabela 17, que apresenta os resultados obtidos com as duas linhagens celulares adotadas, NCTC L 929 e células He La, percebe-se que todos os tensoativos estudados, na concentração de 30%, apresentaram resposta citotóxica para as 12 placas (seis de cada linhagem). Resposta equivalente ficou demonstrada com a diluição a 10% (Tabela 18).

Através da comparação das Tabelas 6 e 19 surge a possibilidade de direcionamento para a busca de correlação entre os dois métodos, pois pode-se verificar que após a diluição da amostra em um fator de 10 vezes, obtendo-se nova amostra na concentração de 1 %, houve concordância dos resultados entre as metodologias *in vivo* e *in vitro*.

Ainda, a observação comparativa das Tabelas 6, 18 e 19 que podem ser consideradas como abrangendo a região limítrofe das respostas positivas, verificou-se que para o teste em animais (Tabela 6) há menor uniformidade das respostas ao se considerar a totalidade das amostras e ainda no mesmo animal respostas distintas para cada compartimento. Embora no teste *in vivo* possa haver maior similaridade ao se considerar a fisiologia do sistema da visão, deve-se atentar para a desvantagem deste método quando comparado ao método *in vitro* com relação à uniformidade da resposta conferida pelas culturas celulares (Tabelas 18 e 19).

Também a observação de valores calculados de média, mediana, desvio padrão, valores máximo e mínimo apresentados para os tensoativos a 30% e 10%, respectivamente, mostram valor de desvio padrão de 0,950, para quemose, no terceiro dia de teste, o que novamente reflete a variabilidade da resposta ao se trabalhar com animais.

Quando foi feito o planejamento do número de seis placas a serem utilizadas para o teste *in vitro* tinha-se a consciência de que cada uma representava um número relevante de entidades biológicas, permitindo representatividade do ponto de vista estatístico. O intuito foi, somando-se a esta vantagem, criar um forma de comparação com o número de animais utilizados no teste *in vivo*.

O cálculo das médias das graduações obtidas para a córnea, íris, hiperemia e quemose no primeiro, segundo, terceiro e sétimo dia após a instilação, conforme metodologia oficial (46), permitiram construir gráficos ilustrativos de evolução das reações. Assim, respectivamente, para os tensoativos na concentração de 30% e 10% (Tabelas 27 e 28), observa-se valores no geral mais intensos no primeiro dia de observação, mas ainda significativos no terceiro dia. Em decorrência disto pode-se, dentro da metodologia *in vivo*, considerar a possibilidade de redução do tempo de observação final, para efeito de liberação do produto, do sétimo para o terceiro dia.

Outro parâmetro estudado envolveu a influência da concentração da substância em teste (tensoativo a 30% e 10%), no decorrer do tempo sobre a córnea (Figura 13), íris (Figura 14), hiperemia (Figura 15) e quemose (Figura 16). É interessante notar que, no caso da córnea, o pico da reação promovido pelo tensoativo a 30%, embora no nível 0,3, portanto bastante abaixo do limite preconizado pela metodologia oficial, para a reação ser considerada positiva, só ocorre no terceiro dia. Para hiperemia (Figura 16) também exclusivamente para o valor médio das graduações dos tensoativos a 30%, é mostrado um pico no segundo dia de teste. Em todas as demais situações foi característico o decaimento da intensidade, a partir do primeiro dia seguido à instilação.

Ao se avaliar os valores de pH das amostras de tensoativos (Tabela 42), observa-se uma faixa de valores variando de 8,78 a 4,99 para os tensoativos aniônicos, um valor de 5,42 para o tensoativo de caráter anfótero e 8,23 para o de caráter não-iônico. A grande variação entre os valores de

pH dos tensoativos aniônicos dificulta o estabelecimento de uma relação entre a característica de segurança destes produtos e o seu pH, pois embora a medida deste valor seja umas propriedades físico-químicas avaliadas para uma triagem de substâncias potencialmente irritantes (58), os resultados da Tabela 5 demonstram diferenças significativas nas reações apresentadas por este grupo de tensoativos, como a variação da graduação para as lesões na córnea de 0 a 4, sendo que não foi possível corroborar as conclusões de estudos realizados por Sasaki e colaboradores (83), utilizando metodologia *in vitro*, onde autores obtiveram resultados que comprovaram serem os tensoativos aniônicos mais tóxicos, para as células, que os não-iônicos.

Embora o contato accidental com os olhos, do xampu não diluído, deva ser admitido, não representa a situação de risco mais provável. Ainda assim, inclusive por orientação da metodologia oficial (46), procedeu-se aos testes obedecendo em todos os aspectos esta orientação, sendo demonstrados os resultados nas Tabelas 1 e 3, respectivamente para uso adulto e infantil. Foi dado prosseguimento ao estudo também com a diluição das amostras a 25% (Tabelas 2 e 4, respectivamente para o produto de uso adulto e infantil), assim como a 5%. Nesta última concentração, todas as leituras efetuadas, relativas às diferentes estruturas, mostraram-se negativas, dispensando portanto a tabulação de resultados.

Nota-se, observando a Tabela 1, que todos os xampus adultos avaliados segundo a metodologia *in vivo* evidenciaram resposta do tipo irritante. Foi a situação mais agressiva, chamando a atenção o número elevado de animais apresentando, inclusive, reações de opacidade (Figura 21). A gravidade desta constatação deve ser enfatizada, pois são as lesões à córnea as que maior comprometimento trazem à visão (27, 63, 95) pois se constitui na barreira de proteção das estruturas internas do olho.

Priorizando a avaliação dos danos causados à córnea, a metodologia *in vitro* utilizando córnea bovina para avaliação da opacidade provocada por substâncias irritantes foi empregada por vários autores (34, 35) e os

resultados obtidos com esta metodologia têm evidenciado uma boa correlação com os dados *in vivo*. A restrição ao método é feita em função da relativa dificuldade de obter o reagente biológico, resultante do sacrifício dos animais em matadouros e o pouco tempo disponível, para o uso, após a obtenção desta estrutura.

Embora número ainda maior de animais tenham apresentado reações envolvendo a íris e conjuntiva (hiperemia e quemose), a observação do gráfico ilustrativo das médias das graduações por estrutura (Figura 2) mostra o decréscimo destas reações, enquanto para a córnea observa-se uma tendência de crescimento até o sétimo dia.

Na impossibilidade e mesmo não necessitando documentar todas as situações, de normalidade e reações irritantes observadas, selecionou-se uma coletânea que abrangesse as diferentes estruturas estudadas, em caráter exemplificativo. Assim, a Figura 18 mostra o olho normal, sendo visualizadas as estruturas da córnea que se apresenta transparente, íris com coloração normal e conjuntiva.

A quemose que é caracterizada pelo dano causado às células epiteliais da microcirculação resultando em extravasamento de fluidos intravasculares para o tecido conjuntival, provoca um edema especialmente na conjuntiva palpebral, podendo ser visualizada na Figura 18. Esta reação foi provocada pela instilação de amostra xampu de uso adulto diluído a 25%, no primeiro dia de leitura

A Figura 19 demonstra a irite de grau 1 provocada por xampu de uso adulto, no primeiro dia de leitura. A irite se caracteriza pela congestão dos vasos sanguíneos que leva à alteração da coloração normal da íris. Nos experimentos onde a irritação provocada pela amostra resultou em opacidade sobre a córnea, pode-se constatar que a evolução da lesão ocorria após o segundo dia de observação, para a maioria dos casos. Na Figura 20 pode ser observada a reação de grau 1 para córnea evidenciando o aparecimento de opacidade, caracterizada por uma mancha de aspecto

leitoso sobre a córnea, resultante de um edema ou exsudato inflamatório no estroma córneo. Em alguns animais houve a formação de pannus em decorrência da proliferação endotelial, pigmentação e vascularização da córnea. O aparecimento desta alteração indica que a substância instilada deve ser considerada um irritante ocular severo (46). A reação apresentada na Figura 20 resultou da instilação de xampu de uso adulto não diluído.

A Figura 22 mostra o grau máximo de graduação da conjuntiva, com edema intenso que dificulta o fechamento dos olhos, resultante da instilação de xampu de uso adulto não diluído.

A figura 23 mostra a secreção normalmente observada no primeiro dia de leitura. Após a instilação da amostra há uma produção de uma secreção comparável à lagrima humana, mas decorrido algum tempo observa-se a produção desta secreção viscosa (28).

Embora diluído a 25%, o lote 2 da amostra B apresentou resposta característica de irritante ocular, uma vez que quatro dos seis animais apresentaram reação positiva para a íris (Tabela 2). A causa de tal efeito certamente não está vinculada com o desvio de pH, pois conforme se observa na Tabela 40, o pH das amostra de xampu de uso adulto encontram-se na faixa de neutralidade. Tal comportamento poderia talvez ser explicado por avaliação da relação estrutura-atividade através do estudo, por exemplo, de propriedades hidrofóbicas ou hidrofílicas. Estudos neste sentido têm sido desenvolvidos para alguns compostos como álcoois e acetatos, visando a utilização para avaliação do seu potencial irritante (36, 10).

Nos testes de citotoxicidade, empregando as linhagens celulares He La e NCTC L 929, os resultados foram sempre caracterizados por respostas citotóxicas para os xampus de uso adulto sem diluição (Tabela 7), diluído a 25% (Tabela 8). Quando se trabalhou com diluições de 1% (Tabela 10) apenas um produto (3 lotes) apresentou ausência de citotoxicidade.

Os xampus infantis, quando testados pela metodologia *in vivo* (Tabela 3) mostraram que uma das amostras (E) evidenciou ausência de qualquer reação positiva. Também apresentaram resposta negativa as amostras F e H para todos os lotes, apesar de um animal apresentar irite (lote 3 do produto F), um animal apresentar quemose (lote 1 do produto H) e um animal apresentar hiperemia (lote 2 do produto H). A única amostra com resultado positivo, para os três lotes, foi a G, que passou a apresentar resposta negativa quando testada na concentração de 25%, para 2 do 3 lotes testados.

As figuras 2 e 4 evidenciam respostas de hiperemia, seguida de quemose, irite e reação da córnea, respectivamente para os xampus infantis não diluídos e diluídos a 25%. É interessante observar o decaimento das reações, quando comparadas as duas figuras, principalmente para a hiperemia, onde no xampu infantil não diluído ocorre primeiramente uma elevação da graduação da resposta até o segundo dia de observação, para em seguida haver o decaimento. Já para o xampu infantil diluído (Figura 4), além da graduação da hiperemia estar abaixo da graduação observada para o xampu não diluído, o declínio da reação se inicia no primeiro dia de observação.

Quanto ao pH, que variou de 6,58 a 7,58, os xampus infantis apresentaram-se na faixa da neutralidade atendendo às exigências da legislação oficial (24).

Nos testes empregando culturas celulares, obtiveram-se respostas citotóxicas, nas duas linhagens celulares utilizadas, para os xampus infantis sem diluição (Tabela 12) e diluídos a 25% (Tabela 13). Quando diluídos a 5% (Tabela 14), unicamente os três lotes da amostra E apresentaram resposta negativa, indicando ausência de citotoxicidade, tanto para as células He La quanto NCTC L 929. É interessante confrontar este dado com a Tabela 3, onde para a amostra não diluída, evidencia ausência total de

reações nos olhos dos coelhos. Este paralelo reforça a percepção de correlação entre os métodos *in vivo* e *in vitro*, apenas devendo-se sempre respeitar as sensibilidades dos diferentes reagentes biológicos (5, 7, 8, 9).

Na diluição de 1% (Tabela 15) todos os produtos apresentaram resposta negativa, indicando ausência de citotoxicidade, sendo que para o produto H, apenas o lote 1 apresentou uma placa com resposta positiva para as células He La, mas que ainda assim mantém a ausência de citotoxicidade para este lote. Apesar da coerência com o observado por Cruz & colaboradores (38), quanto à maior sensibilidade das células He La quando comparada com a linhagem NCTC L 929, este único resultado não contraria a perfeita correlação observada em todo decorrer do presente trabalho (Tabela 29) onde constam os resultados da totalidade dos testes *in vitro* para todas as amostras em estudo, onde pode-se observar que somente seis casos apresentaram valor *in vitro* 1, 3 ou 4 utilizando a célula NCTC L 929 e que obtiveram valores menores com a célula Hela.

Em 38 casos foram encontrados resultados maiores para a célula Hela e menores com a célula NCTC, demonstrando ser a célula Hela mais sensível. Não houve coincidência em 44 dos 835 casos, porém os resultados coincidiram em 791 do total de 835 (95%).

Foi calculada a correlação de Spearman entre os resultados obtidos com os dois tipos de células e o valor do coeficiente de correlação foi $r=0.950$ ($p=0.001$); ou seja, é aceita a hipótese de existência de associação entre os resultados obtidos com um e outro tipo de célula, e existe uma forte associação entre os resultados ($r=0.95$).

Novamente numa abordagem inerente ao teste *in vivo*, é interessante que se busque o comparativo entre os produtos de uso adulto e infantil. As Figuras 7, 8, 9 e 10 mostram, para cada uma das reações e estruturas, as diferenças e similaridades no seu comportamento. Assim, alterações na córnea permanecem como o parâmetro que melhor evidencia a severidade do xampu adulto sem diluição pela não recuperação do quadro no decorrer

dos sete dias (Figura 7); as médias das graduações da íris (Figura 8), assim como a hiperemia (Figura 9) e quemose (Figura 10), mostram a mesma tendência, ou seja, o declínio das graduações, para as amostras testadas diluídas, excetuando as amostras de xampu de uso adulto testadas sem diluição, que para hiperemia (Figura 9) exibem uma elevação no segundo dia, entrando em declínio posteriormente.

A excelente reprodutibilidade dos testes *in vitro* limitou a elaboração de cálculos de médias, medianas, valores máximos e mínimos e desvio padrão, que puderam ser calculados para o teste *in vivo* (Tabelas 21, 22, 23, 24, 25 e 26, 27 e 28), os quais culminaram em gráficos de tendência de comportamento, conforme anteriormente apresentado.

As Tabelas 30, 31 e 32 apresentam o quadro comparativo de respostas *in vivo* e *in vitro*, respectivamente para xampus infantis não diluídos e na concentração de 25% e 5%, evidenciando correlação entre as metodologias. Aplicou-se na correlação similaridade entre os seis animais empregados na metodologia *in vivo*, e as seis réplicas de populações de células plaqueadas, no método *in vitro*.

Para as amostras que compreendem xampus infantis nas concentrações de 1% e 0,1% todos os resultados foram negativos tanto para os teste *in vivo* quanto *in vitro*, aspecto incentivador para a proposta de metodologia alternativa *in vitro*.

Para xampus de uso adulto não diluído observou-se perfeita correlação pois todos os resultados, pelas duas metodologias, mostraram-se positivos, daí não se ter apresentado, os mesmos, sob a forma de tabela. Quando nas concentrações a 25%, 5% e 1% a correlação menos ideal de resultados está apresentada nas Tabelas 33, 34, 35.

Nova abordagem de correlação, envolvendo de forma globalizada os xampus infantis e adultos (Tabelas de 36 a 39), empregando teste *in vitro* detectou como positivos todos os resultados das amostras que

compreendem os xampus nas concentrações de 100%, enquanto que, para a mesma concentração o teste *in vivo* encontrou positivos 16 dos 24 casos (66,7%) (Tabela 36).

Todos os resultados obtidos, com o teste *in vitro*, para amostras de xampus com concentração de 25% foram positivos, enquanto que o teste *in vivo* encontrou 2 resultados positivos dos 24 observados (8,3%) (Tabela 37).

Na concentração de 5%, para amostras de xampus, os testes *in vivo* não detectaram qualquer resultado como positivo, mas o teste *in vitro* para xampus com concentração de 5% deu resultado positivo em 21 dos 24 casos (87,5%) e para concentração de 1% em 10 dos 24 casos (41,7%) (Tabela 38).

Os 24 resultados para xampus com concentração de 0.1% foram negativos tanto para os testes *in vivo* quanto para os *in vitro* (células Hela e NCTC) (Tabela 39).

Para os tensoativos os 6 resultados obtidos foram positivos tanto para testes *in vivo* quanto para *in vitro*.

Visualiza-se portanto, na análise cuidadosa dos resultados obtidos, que existe uma boa correlação entre a metodologia convencional, empregando animais e aquela empregando cultura celular, seja adotando a linhagem NCTC L 929 ou He La, cujos resultados foram concordantes, sendo necessário, num primeiro momento, que se trabalhe com um leque de opções técnicas, particularmente de diluições dos produtos. Nesta fase, maior dispêndio de trabalho qualificado, assim como maior quantidade de reagente biológico será certamente necessário. Este dispêndio inicial, entretanto, será compensado quando da implementação, primeiramente como método de triagem, na avaliação do potencial de irritação de matérias-primas e/ ou formulações.

Em segunda instância, deve-se buscar a implementação da metodologia, devidamente validada, para a substituição plena do teste animal (21). Para tanto, apresenta-se o presente trabalho como uma contribuição, a ser levada aos organismos oficiais de normatização, no sentido de que seja acatada a inovação.

Haverá desta forma um grande avanço, sendo todos favorecidos, uma vez que a sensibilidade e reprodutibilidade do método são inquestionáveis, preservando a segurança do consumidor , e que aspectos técnico-laboratoriais e de custo, seja para o laboratório privado ou oficial também apresentarão vantagens indiscutíveis.

Conclusão

7. CONCLUSÃO

1. Os resultados obtidos aplicando-se os testes *in vivo* e *in vitro* apresentaram uma boa correlação, quando da avaliação das amostras constituídas de colírios e material de acondicionamento.
2. Ficou evidenciada uma boa correlação entre os resultados obtidos através das duas metodologias, para as amostras de xampus de uso adulto ou infantil e tensoativos, quando estas foram testadas sem diluição, o mesmo acontecendo quando avaliadas após sucessivas diluições.
3. A maior sensibilidade das culturas celulares pode ser comprovada pela resposta citotóxica obtida com as amostras de xampus e tensoativos testadas após sucessivas diluições, que apresentaram, para o teste *in vivo*, resultados negativos.
4. Os resultados obtidos com as duas linhagens celulares empregadas neste estudo, para a avaliação pelo método *in vitro*, foram coincidentes para todas as amostras testadas.
5. A avaliação biológica das matérias-primas, representadas pelos tensoativos, assim como pelos frascos de acondicionamento oferecidos às indústrias cosmética e farmacêutica, obteve resultados satisfatórios que permitiram comprovar a segurança dos produtos comercializados.
6. Do ponto de vista legal os produtos disponíveis no mercado local e representados por 18 lotes de colírios abrangendo 7 diferentes formulações, assim como 8 marcas de xampus, sendo 4 para uso adulto e 4 de uso infantil, atendem às exigências legais para a comercialização quanto à rotulagem.

7. Considerando a metodologia *in vivo*, hoje acatada por órgãos oficiais e a metodologia alternativa empregando as culturas celulares, os colírios abrangidos no presente trabalho apresentam-se seguros para o consumo, não promovendo a irritação ocular e apresentando ausência de citotoxicidade.
8. Aplicando-se a metodologia oficial *in vivo*, aos xampus disponíveis no mercado, foi possível constatar que dentre os de uso infantil, três dos quatro utilizados para este estudo estão de acordo com a legislação quanto à exigência de não irritabilidade ocular. Embora a legislação não exija esta característica para o produto de uso adulto, todas as amostras testadas se mostram inadequadas de acordo com este parâmetro.
9. A metodologia *in vitro* pode ser recomendada, na avaliação da irritação ocular de distintos grupos de produtos, em substituição à metodologia *in vivo*, para a triagem inicial de novas substâncias ou produtos.
10. A adoção de metodologia *in vitro* como teste para liberação de produtos terminados deve ser considerada, desde que precedida de validação criteriosa.

Referências Bibliográficas

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS *

1. AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION - **Catalogue of cells & hybrydomas**. 5. ed. Rockville: ATCC. 1985. 305 p.
2. BABICH, H., BABICH, J.P., Sodium lauryl sulfate and triclosan: *in vitro* cytotoxicity studies with gingival cells. **Toxicol. Lett.**, Amsterdam, v.91, p.189-196, 1997.
3. BABICH, H., BORENFREUND, E. Citotoxic effects of food and pharmaceuticals on cells in culture as determined with neutral red assay. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v.79, p.592-594, 1990.
4. 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, 1992.
5. BAGLEY, D.M., BRUNER, L.H., SILVA, O. de, COTTIN, M., O'BRIEN, K.A.F., UTTLEY, M., WALKER, A.P. An evaluation of five alternatives *in vitro* to the rabbit eye irritation test *in vivo*. **Toxicol. in Vitro**, Oxford, v.6, p. 275-284, 1992.

* De acordo com norma NBR 6023/89 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 1997.

6. BALDWIN, H.A., McDONALD, T.O., BEASLEY, C.H. Slit-lamp examination of experimental animal eyes. II. Grading scales and photographic evaluation of induced pathological conditions. **J. Soc. Cosmet. Chem.**, New York , v.24, p.181-195, 1973.
7. 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.
8. BALLS, M., CLOTHIER, R.H. Comments on the scientific validation and regulatory acceptance of *in vitro* toxicity tests. **Toxicol. in Vitro**, Oxford, v.5, p. 535-538, 1991.
9. BARILE, F.A., ARJUN, S., HOPKINSON, D. *In vitro* cytotoxicity testing: biological and statistical significance. **Toxicol. in Vitro**, Oxford, v.7, p. 111-116, 1993.
10. BARRAT, M.D. QSARS for the eye irritation potential of neutral organic chemicals. **Toxicol. in Vitro**, Oxford, v.11, p.1-8, 1991.
11. BASON, M.M., HARVELL, J., REALICA, B., GORDON, V., MAIABACH, H.I. Comparison of *in vitro* and human *in vivo* dermal irritancy data for four primary irritants. **Toxicol. in Vitro**, Oxford, v.6, p.383-387, 1992.
12. BECKLEY, J.H., RUSSEL, T.J., RUBIN, L.F. Use of Rhesus monkey for predicting human response to eye irritants. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, New York, v.15, p.1-9, 1969.

13. BLEIN, O., ADOLPHE, M., LAKHDAR, B., CAMBAR, J., GUBANSKI, G., CASTELLI, D., CONTIE, C., HUBERT, F., LATRILLE, F., MASSON, P., CLOUZEAU, J., BIGOT, J.F. Le, SILVA, O. de, DOSSOU, K.G. Correlation and validation of alternative methods to the Draize eye irritation test. **Toxicol. in Vitro**, Oxford, v.5, p. 555-558, 1991.
14. BOUE-GRABOT, M., HALAVIAT, B., PINON, J.F. A simple method for cytotoxicity studies of non-hydrosoluble substances. Possible application as an alternative to the Draize test for cosmetics and toiletries. **ATLA Altern. Lab. Anim.**, Nottingham, v.20, p.307-312, 1992.
15. 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, p. 1-6, 1988.
16. BORENFREUND, E., PUERNER, J.A. Cytotoxicity of metals, metal-metal and metal-chelator combinations assayed *in vitro*. **Toxicology**, Shannon, v.39, p.121-134, 1986.
17. BORENFREUND, E., PUERNER, J.A. Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. **Toxicol. Lett.**, Amsterdam, v.24, p.119-124, 1985. Apud: **Chem. Abstr.**, Columbus, v.102, n.abstr. 180295f, 1985

18. BORENFREUND, E., PUERNER, J.A. A simple quantitative procedure using monolayer culture for citotoxicity assays (HTD/ NR 90). **J. Tissue Cult. Methods**, Gaithersburg, v.9, p.7-9, 1984.
19. 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.
20. 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.
21. BRANTOM, P.G., BRUNER, L.H., CHAMBERLAIN, M., DE 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., MARENUM, 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.
22. BRASIL. Leis, decretos, etc. Portaria nº 71 de 29 de maio de 1996. **Diário Oficial da União**, Brasília, 4 jun. 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].

23. BRASIL. Leis, decretos, etc. Portaria nº 1480 de 31 de dezembro de 1990. **Diário Oficial da União**, Brasília, 7 jan. 1991. [O Ministério da Saúde atualiza os requisitos de qualidade aplicáveis aos produtos absorventes higiênicos descartáveis destinados ao asseio corporal].
24. BRASIL. Leis, decretos, etc. Decreto nº 79094 de 5 de janeiro de 1977. **Diário Oficial da União**, Brasília, 5 jan. 1977. [O Ministério da Saúde submete a sistema de vigilância sanitária os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, produtos de higiene, saneantes e outros].
25. BRASIL. Leis, decretos, etc. Lei nº 6360 de 23 de setembro de 1976. **Diário Oficial da União**, Brasília, 4 set. 1976. [O Ministério da Saúde dispõe sobre a vigilância a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos dá outras providências].
26. BRUNER, L.H., SPIRA, H., BALLS, M., HILL, R.N. Perspectives on alternatives to the eye irritation test: Industry, public interest, government. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.35, p. 165-166, 1997.
27. 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.

28. BUEHLER, E.V., NEWMANN, E.A. A comparison of eye irritation in monkeys and rabbits. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, New York, v.6, p.701-710, 1964.

29. CHAMBERLAIN, M., GAD, S.C., GAUTHERON, P. Organotypic models for the assessment: prediction of ocular irritation. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.35, p. 23-37, 1997.

30. 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.

31. CHAMBERS, W.A., GREEN, S., GUPTA, K.C., HILL, R.N., HUNTLEY, K., HURLEY, P.M., LAMBERT, L.A., LEE, C.C., LEE, J.K., LIU, P.T., LOWTHER, D.K., ROBERTS, C.D., SEABAUGH, V.M., SPRINGER, J.A., WILCOX, N.L. Scoring for eye irritaton tests. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.31, p. 111-115, 1993.

32. 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.

33. COOPER, J. Plastic containers for pharmaceutical: testing and control, Geneva: World Health Organization, 1974. 204p.

34. CORNELIS, M., DUPON, Ch., 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, p.119-128, 1992.

35. COTTIN, M., ZANVIT, A. Fluorescein leakage test: auseful tool in ocular safety assessment. **Toxicol. in Vitro**, v.11, p.399-405, 1997.
36. CRONIN, M.T.D., BASKETTER, D.A., YORK, M. A quantitative structure activity relationship (QSAR) investiation of a Draize eye irritation database. **Toxicol. in Vitro**, Oxford, v.8, p. 21-28, 1994.
37. CRUZ, A.S., CUPPOLONI, K.M., MARTINEZ, C.H.O., GOMES, L.F.S. Culturas celulares na detecção da toxicidade de materiais médico-hospitalares e outros que entram em contato com o ser humano. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, v.47, p.51-57, 1987.
38. CRUZ, A.S., FIGUEIREDO, C.A., MARTINEZ, C.H.O., GOMES, L.F.S. Detecção da citotoxicidade de materiais biocompatíveis nas linhagens celulares MRC-5, He La e RC-IAL. **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, v.34, p.99-105, 1992.
39. DAVIES, R.E., KYNOCH, S.R. LIGGETT, M.P. Eye irritation tests- an assessment of the maximum delay time for remedial irrigation. **J. Soc. Cosmet. Chem.**, New York ,v.27, p.301-306, 1976.
40. DAVIES, R.E., HARPER, K.H. The potential irritancy to the rabbit eye mucosa of commercially available cream shampoos. **J. Soc. Cosmet. Chem.**, New York ,v.18, p.663-679, 1967.
41. DeSOUZA, D.J., ROUSE, A.A., SMOLON, W.J. Statistical consequences of reducing the number of rabbits utilized in eye

irritation testing: data on 67 petrochemicals. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, New York, v.76, p.234-242, 1984.

42. DRAIZE, J.H., WOODWARD, G., CALVERY, H.O. Methods for the study of irritation and toxicity substances applied topically to the skin and mucous membranes. **J. Pharmacol. Exp.Ther.**, Baltimore, v.82, p.377-390, 1944.

43. 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.

44. 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, p.245-250, 1995.

45. ESPERSEN, R.J., OLSEN, P., NICOLAISEN, G.M., JENSEN, B.L., RASMUSSEN, E.S. Assessment of recovery from ocular injury using a human tissue equivalent model. **Toxicol. in Vitro**, Oxford, v.11, p. 81-88, 1997.

46. ESTADOS UNIDOS. Office of federal register. **Code of federal regulation**: title 16. Washington: US Government Printing Office,. 1986. pt. 1500.42.

47. FARMACOPÉIA brasileira. 4ed. São Paulo: Atheneu, 1988. pt.1.

48. FRESHNEY, R.I. **Culture of animal cells:** a manual of basic technique. 2.ed. New York: Alan R. Liss, 1987. 397p.
49. GARLE, M.J., FENTEM, J.H., FRY, J.R. *In vitro* cytotoxicity tests for prediction of acute toxicity *in vivo*. **Toxicol. in Vitro**,. Oxford, v.8, p.1303-1312, 1994.
50. GAUTHERON, P., GIROUX, J., COTTIN, M., AUDEGOND, L., MORILLA, A., MAYORDOMO-BLANCO, L., TORTAJADA, A., HAYNES, G., VERICAT, J.A., PIROVANO, R., GIGLIO TOS, E., HAGEMAN, C., VANPARYS, P., DEKNUDT, G., JACOBBS, G., PRINSEN, M., KALWEIT, S., SPIELMANN, H. Interlaboratory assessment of the bovine corneal opacity and permeability (BCOP) assay. **Toxicol. in Vitro**, Oxford, v.8, p.381-392, 1994.
51. GETTINGS, S.D., BAGLEY, D.M., CHUDKOWSKI, M., DEMETRULLAS, J.L., DIPASQUALE, L.C., GALLI, C.L., GAY, R., HINTZE, K.L., JANUS, J., MARENUS, K.D., MUSCATIELLO, M.J., PAPE, W.J.W., RENSKERS, K.J., RODDY, M.T., SCHNETZINGER, R. Development of potential alternatives to the Draize eye test: the CTFA evaluation of alternatives program. Phase II: review of materials and methods. **ATLA Altern. Lab. Anim.**, Nottingham, v.20,. p.164-171, 1992.
52. 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 CTFA evaluation of alternatives program: an evaluation of *in vitro* alternatives to the Draize primary eye irritation test. (Phase III) surfactant-based formulations. **Toxicol. in Vitro**, Oxford, v.34, p.79-117, 1996.
53. GORDON, V., The scientific basis of the EYTEX™ system. **ATLA Altern. Lab. Anim.**, Nottingham, v.20, p.537-548, 1992.
54. GORDON, V.C., KELLY, C.P., REALICA, B. Determinação de irritação ocular e dérmica por métodos *in vitro*. **Cosmet. Toiletries**, São Paulo, v.3, n.3, p.30-45, 1991.
55. GREEN, S., CHAMBERS, W. A., GUPTA, K. C., HILL, R. N., HURLEY, P.M., LAMBERT, L. A., LEE, J. K., LIU, P. T., LOWTHER, D. K., ROBERTS, C. D., SEABAUGH, V.M., SPRINGER, J. A., WILCOX, N. L. Criteria for *in vitro* alternatives for the eye irritation test. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.31, p.81-85, 1993.
56. GRIFFITH, J.F., NIXON, G.A., BRUCE, R.D., REER, P.J., BANNAN, E.A. Dose-response studies with chemical irritants in the albino rabbit eye as a basis for selecting optimum testing conditions for predicting hazard to the human eye. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, New York, v.55, p.501-513, 1980.
57. 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.

58. HURLEY, P.M., CHAMBERS, W.A., GREEN, S., GUPTA, K.C., HILL, R.N., LAMBERT, L.A., LEE, C.C., LEE, J.K., LIU, P.T., LOWTHER, D.K., ROBERTS, C.D., SEABAUGH, V.M., SPRINGER, J.A., WILCOX, N.L. Screening procedures for eye irritation. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.31, p. 87-94, 1993.
59. HUGGETT, A.C., SCHILTER, B., ROBERFROID, M., ANTIGNAC, E., KOEMAN, J.H. Comparative methods of toxicity testing. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.34, p. 183-192, 1996.
60. 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, p.149-154, 1993.
61. ITAGAKI, H., HAGINO, S., KATO, S., KOBAYASHI, T., UMEDA, M. An *in vitro* alternative to the Draize eye-irritation test: evaluation of the cristal violet staining test. **Toxicol. in Vitro**, Oxford, v.5, p.139-143, 1991.
62. JÄRKEID, L., KJELLSTRAND, P., MARTINSON, E., WIESLANDER, A. Toxicity of 20 chemicals from the MEIC programme determined by growth inhibition of L-929 fibroblast-like cells. **ATLA Altern. Lab. Anim.**, Nottingham, v.25, p.55-59, 1997.
63. KAY, J.H., CALANDRA, J.C. Interpretaton of eye irritation tests. **J. Soc. Cosmet. Chem.**, New York, v.13, p.281-289, 1962.

64. KOEHLER, P.B. Clinical aspects of safety testing cosmetic products in the nineteen-eighties. **J. Soc. Cosmet. Chem.**, New York, v.31, p.213-218, 1980.
65. 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. **Toxicol. in Vitro**, Oxford, v.9, p. 333-340, 1995.
66. LAMBERT, L.A., CHAMBERS, W.A., GREEN, S., GUPTA, K.C., HILL, R.N., HURLEY, P.M., LEE, C.C., LEE, J.K., LIU, P.T., LOWTHER, D.K., ROBERTS, C.D., SEABAUGH, V.M., SPRINGER, J.A., WILCOX, N.L. The use of low-volume dosing in the eye irritation test. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.31, p. 99-103, 1993.
67. LEWIS, R.W., McCALL, J.C., BOTHAM, P.A. Use of *in vitro* test battery as a prescreen in the assesment of ocular irritancy. **Toxicol. in Vitro**, Oxford, v.8, p. 75-79, 1994.
68. 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, p. 155-158, 1993.
69. LUEPKE, N.P. Hen's egg chorioallantoic membrane for irritation potential. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.23, p.287-291, 1985.
70. MALICH, G., MARKOVIC, B., WINDER, C. The sensitivity and specificity of the MTS tetrazolium assay for detecting the in vitro

cytotoxicity of 20 chemicals using human cell lines. **Toxicology**, Shannon, v.124, p.179-192, 1997.

71. MARINOVICH, M., VIVIANI, B., GALLI, C.L. The predominant role of surfactants in the modulation of toxicity of detergent products: an *in vitro* analysis of shampoos. **Toxicol. in Vitro**, Oxford, v.6, p. 275-284, 1992.
72. McDONALD, T.O., BALDWIN, H.A., BEASLEY, C.H. Slit-lamp examination of experimental animal eyes. I. Techniques of illumination and the normal eye. **J. Soc. Cosmet. Chem.**, New York, v.24, p.163-180, 1973.
73. MURPHY, J.C., OSTERBERG, R.E., SEABAUGH, V.M., BIERBOWER, G.W. Ocular irritancy responses to various pHs of acids and bases with and without irrigation **Toxicology**, Shannon, v.23, p. 281-291, 1982.
74. NOSER, F. Cultura de células a serviço da cosmetologia. **Cosmet. Toiletries Ed. Port.**, São Paulo, v.3, n.3, p.46-47, 1991.
75. O'BRIEN, K.F.A., DIXIT, M.B., McCALL, J.C., BOTHAM, P.A., LEWIST, R.W. Na interlaboratory assessment of the Eytex system. **Toxicol. in Vitro**, Oxford, v.6, p.549-556, 1992.
76. O'BRIEN, K.F.A., 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, p.311-313, 1990.

77. OSBORNE, R., PERKINS, M.A. *In vitro* skin irritation testing with human skin cell cultures. **Toxicol. in Vitro**, Oxford, v.5, p.563-567, 1991.
78. PERLMAN, D., LUMMIS, W.L., GEIERSBACH, H.J. Differential agar-diffusion bioassay for cytotoxic substances. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v.58, p. 633-634, 1969.
79. PHILLIPS, II, L., STEINBERG, M., MAIBACH, H.I., AKERS, W.A. A comparison of rabbit and human skin response to certain irritants. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, New York, v.21, p.369-382, 1972.
80. PINTO, T.J.A. **Controle de qualidade de produtos médicos-hospitalares:** características de biocompatibilidade em materiais poliméricos, São Paulo, 1994. 125p. [Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP].
81. RIDELL, R.J., PANACER, D.S., WILDE, S.M., CLOTHIER, R.H., BALLS, M. The importance of exposure period and cell type in *in vitro* cytotoxicity tests. **ATLA Altern. Lab. Anim.**, Nottingham, v.14, p.86-92, 1986.
82. RIZZO, E., TUCHIYA, H.N., MARTINEZ, C. **Técnicas básicas de cultura celular**. 4.ed. São Paulo: Instituto Butantan, 1983. 123p.

83. SASAKI, K., TANAKA, N., WATANABE, M., YAMADA, M. Comparison of citotoxic effects of chemicals in four different cell types. **Toxicol. in Vitro**, Oxford, v.5, p.403-406, 1991.
84. SCALA, R.A., SPRINGER, J. Guidelines for the evaluation of eye irritation alternative tests: criteria for data submission. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.35, p. 13-22, 1997.
85. 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 anaesthetics. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.31, p. 95-98, 1993.
86. SHAW, A.J., BALLS, M., CLOTHIER, R.H., BATEMAN, N.D. Predicting ocular irritancy and recovery from injury using madin-darby canine kidney cells. **Toxicol. in Vitro**, Oxford, v.5, p.569-571, 1991.
87. SILVA, O. de, COTTIN, M., DAMI, N., ROGUET, R., CATROUX, P., TOUFIC, A., SICARD, C., DOSSOU, K.G., GERNER, I., SCHLEDE, E., SPIELMANN, H., GUPTA, K.C., HILL, R.N. Evaluation of eye irritation potential: Statistical analysis and tier testing strategies. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.35, p. 159-164, 1997.
88. 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.

89. STARK, D.M., SHOPSIS, C., BORENFREUND, E., BABICH, H.
Progress and problems in evaluating and validating alternative assays in toxicology. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.24, n.6/7, p.449-455, 1986.
90. TALSMA, D.M., LEACH, C.L., HATOUM, N.S., GIBBONS, R.D., ROGER, J. C., GARVIN, P.J. Reducing the number of rabbits in the Draize eye irritancy test: a statistical analysis of 155 studies conducted over six years. **Fundam. Appl. Toxicol.**, Akron, v.10, p.146-153, 1988.
91. TEAL, J.J. Início de nova era: teste de segurança sem animais. **Cosmet. Toiletries Ed. Port.**, São Paulo, v.3, n.3, p.20-24, 1991.
92. TRIGLIA, D., SHERARD BRAA, S., YONAN, C., NAUGHTON, G.K. Cytotoxicity testing using neutral red and MTT assays on a three-dimensional human skin substrate. **Toxicol. in Vitro**, Oxford, v.5, p.573-578, 1991.
93. UNITED States pharmacopeia. 23.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1995. p. 1697 –1703.
94. UNITED States pharmacopeia. 22.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1990. p.1495-1500.
95. VAUGHAN,D., ASBURY, T. **Oftalmologia geral**. 1.ed.São Paulo: Atheneu, 1977. 330p.

96. VIGLIOGLIA, P.A. **Cosmiatria II**. 2.ed. Buenos Aires: Americana, 1989. 406p
97. VINARDELL, M.P., MACIÁN, M. Comparative study of the het-cam test and the Draize eye test for assesment of irritancy potential. **Toxicol. in Vitro**, Oxford, v.8, p.467-470, 1994.
98. WALKER, A.P., BASKETTER, D.A., BAVEREL, M., DIEMBECK, W., MATTHIES, W., MOUGIN, D., PAYE, M., RÖTHLISBERGER, R., DUPUIS, J . Test Guidelines of assessment of skin compatibility of cosmetic finished products in man. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v.34, p.651-660, 1996.
99. WATANABE, M., WATANABE, K., SUSUKI, K., NIKAIDO, O., ISSHII, I. KONISHI, H. Use of primary rabbit cornea cells to replace the Draize rabbit eye irritancy test. **Toxicol. in Vitro**, Oxford, v.3, p.329-334, 1989.
100. WEIL, C.S., SCALA, R.A. Study of intra- and interlaboratory variability in the results of rabbit eye and skin irritation tests. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, New York, v.19, p.276-360, 1971.
101. WEINBERG, E.H., SPRINGER, S.T. The evaluation *in vitro* of fragrances materials for phototoxic activity. **J. Soc. Cosmet. Chem.**, New York, v.32, p.303-315, 1981.

102. WELTMAN, A.S., SPARBER, S.B., JURTSCHUK, T. Comparative evaluation and influence of various factors on eye-irritation scores. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, New York, v.7, p.308-319, 1965.
103. WHITTAM, J.H., ed. **Cosmetic safety**. New York: Marcel Dekker, 1987. 347 p.
104. WILLIAMS, S.J., GRAEPEL, J.G. Evaluation of ocular irritancy potential: an intralaboratory variability and effect of dosage volume. **Toxicol. Lett.**, Amsterdam, v. 12, p.235-241, 1982
105. ZANINI, A.C., OGA, S., **Farmacologia aplicada**. 5.ed. São Paulo: Atheneu, 1994. p.651-680.

RESUMO

Para a avaliação do potencial irritante de substâncias aplicadas topicamente tem-se utilizado metodologias que baseiam nos estudos de Draize, onde preconiza-se o uso de animais. Devido à forte oposição a estes testes, intensa tem sido a busca por métodos alternativos visando diminuir ou eliminar a utilização de animais. Este estudo avaliou o potencial irritante de diversas substâncias através de duas metodologias: o teste *in vivo*, empregando metodologia oficial do Food and Drug Administration (FDA), onde utiliza-se coelhos e o teste de citotoxicidade *in vitro* - método de difusão em camada de agar sobreposta à monocamada de células - empregando as linhagens celulares He La e NCTC L 929 e o corante vital vermelho neutro. As amostras de produto acabado abrangeram colírios, testados sem diluição e xampus de uso adulto e infantil testados puros e diluídos a 25%, 5%, 1% e 0,1%. As matérias-primas compreenderam tensoativos aniônicos, não-iônicos e anfóteros testados após diluição. O material de acondicionamento foi representado por frascos de polietileno para colírios, testados através dos seus extratos em solução de NaCl 0,9%. Os resultados obtidos com as amostras de colírios e frascos de acondicionamento foram negativos quanto à irritação ocular em coelhos e comprovaram ausência de citotoxicidade nas duas linhagens celulares. As amostras de xampus apresentaram boa correlação dos resultados quando testadas sem diluição ou diluídas a 1,0% e 0,1%. Foi calculada a correlação de Spearman entre os dados obtidos com as duas linhagens celulares sendo o valor do coeficiente $r = 0,950$ indicando uma correlação direta entre os resultados obtidos com as duas células. Os resultados demonstram a possibilidade de desenvolvimento de metodologias alternativas, sujeitas à validação, que resultem em procedimentos sensíveis, reprodutíveis, não sujeitos a critérios subjetivos de interpretação, visando assim, num primeiro estágio diminuir o uso de animais pelo emprego destas metodologias em avaliações prévias do potencial irritante de substâncias químicas.

SUMMARY

To evaluate the irritability potential of topically laid on substances, some methodologies based on Draize's study where the use of animals is demanded, have been used. Due to the strong opposition of society and scientific community, the search for alternative methods having in view the reduction or even the elimination of animals have been intense, either through the use of volunteers or of *in vitro* methodologies. The present study has evaluated the irritability of several substances including finished products, raw materials and packaging materials through two methodologies: the *in vivo* test which makes use of official methodology from Food and Drug Administration (FDA), where rabbits are employed and the cytotoxicity *in vitro* test – method of diffusion in agar layer added to the monolayer of cells – using He La and NCTC L 929 cells lines and neutral red. The samples of the finished products embraced eye drops, tested without dilution, and shampoos for adults and children use both concentrated and diluted to 25%, 5%, 1% and 0.1%. Raw materials included anionis, non-anionic and amphoteric surfactants tested after dilution. The packaging material, represented by eye drops polyethylene bottles, was tested through its extracts in a NaCl 0,9% solution. The results obtained with the samples of eye drops and packaging materials were negative as for ocular irritation in rabbits and confirmed the absence of cytotoxicity in both cells lines. The samples of shampoos presented good correlation of results when tested without dilution or diluted to 1% and 0.1%. It has been calculated Spearman correlation considering dates obtained with two cells lines, with value of coefficient $r = 0,950$ showing a direct correlation between results obtained with two cells. The results obtained with this study are likely to lead to sensitive and reproductive procedures, which won't arise subjective criteria of interpretation. Thus, the elimination of the use of animals will be possible at a first stage of previous evaluation, and once a posterior validation of this methodology is done, the rational use of a smaller number of animals will be a reality.