UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estratégia para a avaliação do potencial de irritação ocular de ingredientes cosméticos utilizando métodos alternativos à experimentação animal

Larissa de Lima Sá

Ribeirão Preto
2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estratégia para a avaliação do potencial de irritação ocular de ingredientes cosméticos utilizando métodos alternativos à experimentação animal

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientada: Larissa de Lima Sá

Orientadora: Profa. Dra. Lorena Rigo Gaspar Cordeiro

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 09/05/2017. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2017

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Sá, Larissa de Lima
Estratégia para a avaliação do potencial de irritação ocular de ingredientes cosméticos utilizando métodos alternativos à experimentação animal. Ribeirão Preto, 2017.
78 p.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.
Orientadora: Gaspar, Lorena Rigo.

1. Irritação ocular. 2. Métodos alternativos. 3. Cosméticos. 4. HET-CAM. 5. BCOP. 6. Histopatologia

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Larissa de Lima Sá
Título do trabalho: Estratégia para a avaliação do potencial de irritação ocular de ingredientes cosméticos utilizando métodos alternativos à experimentação animal

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientadora: Profa. Dra. Lorena Rigo Gaspar Cordeiro

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Dedicatória

À **Deus** pelo fortalecimento espiritual, psicológico e físico, bem como pela sabedoria concedida a mim durante esses anos.

Aos meus amados pais, **Maria Aparecida de Lima Sá** e **Raimundo Lemos Sá**, pelo amor, carinho, dedicação, compreensão, profissionalismo, por sempre me apoiarem e me incentivarem nessa caminhada acadêmica e, principalmente, me ensinarem a buscar a Deus antes de todas as coisas.

Ao meu irmão, **David de Lima Sá** e a todos os familiares e amigos pela motivação, companheirismo e carinho ao longo dessa jornada.

Agradecimento especial

À minha orientadora, **Lorena Rigo Gaspar Cordeiro**, pela oportunidade de fazer parte do grupo TECNOPROT, pelo apoio técnico, pelo entusiasmo pela pesquisa científica e por sempre passar o sentimento de que a nossa pesquisa é um trabalho árduo, mas recompensador, bem como pela amizade cativante.

Agradecimentos

Às minhas companheiras de laboratório, **Camila**, **Carol** e **Juliana** que, além de trabalharmos juntas, sempre me deram o suporte necessário nos momentos difíceis e foram amigas e conselheiras ao me ouvir. Agradeço também a **Karina**, **Gabriela**, **Marcela**, **Renata** e **Karen** pelo suporte técnico pelos momentos de descontração e muita risada.

Ao **Rodrigo Vieira Rodrigues** e à **Andréa Costa Fruet** do Instituto de Pesquisa Invitrocell por disponibilizarem o laboratório e pela ajuda técnica para a realização de uma parte do meu mestrado.

À **Vani Maria Alves** pelo auxilio técnico durante a confecção das lâminas histológicas.

Ao professor **Dr. Antônio Haddad** por compartilhar sua experiência e seus conhecimentos que foram de grande importância para a construção de parte desta pesquisa.

Aos **Professores** que cederam algum material ou equipamento para a realização deste trabalho, bem como fizeram alguma sugestão para o aperfeiçoamento da pesquisa.

Aos funcionários, **Eleni Angeli Passos** e **Rafael Braga Poggi**, por me atenderem prontamente na secretaria de pós-graduação e pelo excelente trabalho prestado.

À todos os **Professores** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP) que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho.

À todos os **Funcionários** da FCFRP-USP por contribuírem de alguma forma para a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho de Desenvolvimento à Pesquisa (CNPq) pelo apoio financeiro.

"Porque o Senhor dá a sabedoria, e da sua boca vem a inteligência e o entendimento. Feliz o homem que acha sabedoria, e o homem que adquire conhecimento."

(Provérbios 2:6; 3:13)

RESUMO

SÁ, L. L. **Estratégia para a avaliação do potencial de irritação ocular de ingredientes cosméticos utilizando métodos alternativos à experimentação animal.**
2017. 78f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Considerando que os produtos cosméticos são de livre acesso ao consumidor e alguns podem acidentalmente entrar em contato com os olhos, eles devem ser aprovados em testes de irritação ocular. Durante muitos anos, essa avaliação foi feita pelo teste de Draize utilizando animais de experimentação. Entretanto, devido a questões éticas envolvendo o uso desses animais, atualmente há uma busca por métodos alternativos para essa avaliação. Assim, o objetivo deste projeto foi propor uma estratégia para a avaliação do potencial de irritação ocular de alguns ingredientes cosméticos, como os tensoativos, dodecil sulfato de sódio (SDS), lauril éter sulfato de sódio (LESS), cocoilglutamato de sódio (CGS), polissorbato 20, capriloil/caproil metil glucamida (CCMG), cocoamidopropilbetaína (CAB), bem como os silicones, dimeticone e ciclopentasiloxano, utilizados na fabricação de produtos cosméticos para cabelo (shampoos), área dos olhos e rosto (demaquilantes e cremes). Para isso, foram utilizados métodos alternativos à experimentação animal, tais como Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) e ensaio de Permeabilidade e Opacidade de Córnea Bovina (BCOP) e análise histopatológica das córneas. O primeiro ensaio avalia os eventos vasculares, hiperemia, hemorragia e coagulação, que a substância teste possa causar na CAM, mimetizando, com isso, a conjuntiva ocular. Já o BCOP avalia as alterações na opacidade e na permeabilidade provocada pela substância teste. A análise histopatológica é uma ferramenta complementar ao ensaio de BCOP, avaliando o grau e a profundidade da lesão ocasionada pela substância teste na córnea bovina. A maioria dos tensoativos foi considerada irritante severo no ensaio de HET-CAM, com exceção do polissorbato 20 (10%) classificado como irritante moderado, enquanto que os silicones não foram irritantes. Já no ensaio de BCOP, a maioria dos tensoativos foi classificada como sem predição, exceto o polissorbato 20 (10%), o CCMG 1,5% e os silicones, os quais foram classificados como não irritantes. Na análise histopatológica, os tensoativos sem predição no BCOP, foram classificados como irritantes severos: SDS 10%, CAB 3% e 1,5% e CCMG 3%; irritantes moderados: LESS 10% e 7%; irritantes leves: SDS 1% e CGS 3%; e não irritantes: CGS 1,5% e CCMG 1,5%. Os silicones não causaram nenhum dano na córnea. Diante dos resultados obtidos no presente trabalho, a seguinte estratégia foi proposta para a avaliação do potencial de irritação ocular de ingredientes cosméticos: em um primeiro nível deve-se utilizar o ensaio de HET-CAM, o qual avalia os eventos vasculares, mimetizando a conjuntiva ocular. Em seguida, no 2º nível, com o ensaio de BCOP, avaliam-se os efeitos do ingrediente sobre a córnea (opacidade e permeabilidade). Se o ingrediente for classificado como irritante severo ou não irritante nos dois ensaios, ele não necessita de mais avaliações. Entretanto, se esse produto apresentar algum potencial irritante no HET-CAM e for classificado como sem predição ou sem categoria no BCOP, deve-se prosseguir para o 3º nível, a avaliação histopatológica. Nessa etapa o ingrediente é avaliado quanto ao grau e a profundidade da lesão que ele provoca na córnea bovina, possibilitando, até mesmo, inferir sobre a reversibilidade da lesão. Portanto, a estratégia proposta para avaliar o potencial de irritação ocular de ingredientes e produtos cosméticos é bastante promissora, pois é possível avaliar os eventuais danos que eles podem causar na conjuntiva ocular e na córnea por diferentes mecanismos toxicológicos, predizendo, assim, a toxicidade ocular desses produtos.
Palavras-chave: irritação ocular, métodos alternativos, cosméticos, HET-CAM, BCOP, histopatologia

ABSTRACT

SÁ, L. L. **Strategy for the evaluation of ocular irritation potencial of cosmetic ingredients using alternative methods to animal testing**. 2017. 78p. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Cosmetic products are freely available to the consumer and may accidentally come into contact with the eyes; thus they must be approved by eye irritation tests. For many years, these evaluations were performed in experimental animals (Draize test). However, due to ethical issues involving the use of animals, there is a search for alternative methods for this evaluation. Thus, the aim of this project was to measure the ocular irritation potential of some cosmetic ingredients, such as sodium dodecyl sulfate (SDS), sodium cocoylglutamate (SCG), polysorbate 20, capryloyl /caproyl methyl glucamide (CCMG), cocoamidopropyl betaine (CAPB), as well as silicones, dimethicone and cyclopentalosiloxane, used to manufacture cosmetic products for hair (shampoos), eye and face area (make-up removers and creams). For that purpose, alternative methods of animal experimentation were used, such as Hen's Egg Test - Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) and Bovine Corneal Permeability and Opacity (BCOP) test and histopathological analysis of the corneas. The first assay evaluates the vascular events, hyperemia, hemorrhage and coagulation, which a test substance can cause in the CAM, simulating endpoints that occur in ocular conjunctiva. BCOP evaluates alterations in opacity and permeability caused by test substance on the cornea. The histopathological analysis is a complementary tool to BCOP test, evaluating the degree and depth of the lesion caused by the test substance in the bovine cornea. Most of the surfactants were non-irritant on HET-CAM, except polysorbate 20 (10%) that was classified as moderate irritant, while silicones were non-irritant. In the BCOP assay, most surfactants were classified as unpredicted, except polysorbate 20 (10%) and CCMG 1.5%, and silicones, which were classified as no category (non-irritant). In the histopathological analysis, unpredictive surfactants in BCOP were better classified as severe irritants: SDS10%, CAB 3% and 1.5% and CCMG 3%; moderate irritants: LESS 10% and 7%; mild irritants: SDS 1% and CGS 3%; and non-irritant: CGS 1.5% and CCMG 1.5%. Silicones did not cause any damage on the cornea. Considering the results obtained in the present study, the following tiered strategy was proposed for the evaluation of the ocular irritation potential of cosmetic ingredients: the first tier should be the HET-CAM assay, which evaluates the vascular events, simulating the conjunctiva. Then, the second tier, with the BCOP assay, the effects of the ingredient on the cornea (opacity and permeability) are evaluated. If the ingredient is classified as a severe irritant or non-irritant in both tests, it does not require further evaluation. However if that ingredient or product is considered as a potential irritant in HET-CAM and in BCOP, i.e. it is classified as unpredicted or no category, it is necessary to proceed to the third tier, the histopathological evaluation. At this stage, the ingredient is evaluated for the degree and depth of the lesion that it provoked in the bovine cornea, allowing even to infer about the reversibility of the lesion. Finally, the proposed strategy for evaluating the potential of eye irritation is very promising to evaluate ingredients and cosmetic products, since it is possible to evaluate the possible damages that they can cause in the conjunctiva and in the cornea by different toxicological mechanisms, thereby predicting the ocular safety of those products.

Keywords: eye irritation, alternative methods, cosmetics, HET-CAM, BCOP, histhopatology

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Anatomia do olho humano mostrando as suas diferentes estruturas (A) e a conjuntiva ocular (B)..... 6

Figura 2 – Histologia da córnea humana demonstrando as suas diferentes camadas..... 7

Figura 3 – Histologia da córnea bovina demonstrando as suas diferentes camadas..... 16

Figura 4 – Representação de uma molécula de tensoativo..... 18

Figura 5 – Estrutura química dos tensoativos aniônicos estudados..... 19

Figura 6 – Estrutura química do tensoativo anfótero cocoamidopropilbetaína (CAB)..... 19

.

Figura 7 – Estrutura química dos tensoativos não iônicos estudados..... 20

Figura 8 – Estrutura química geral dos silicones..... 20

Figura 9 – Estrutura química dos silicones estudados: dimeticone e ciclopentasiloxano..... 21

Figura 10 – Representação esquemática do ensaio de HET-CAM..... 27

Figura 11 – Representação esquemática do ensaio de BCOP..... 29

Figura 12 – Esquema representativo do potencial de irritação ocular de uma substância química aplicada na córnea bovina de acordo com a localização da lesão no epitélio..... 32

Figura 13 – Membrana cório-alantóide antes (0s) e 30s, 2 min. e 5 min. após a aplicação de NaCl 0,9%..... 39

Figura 14 – Membrana cório-alantóide antes (0s) e 30s, 2 min. e 5 min. após a aplicação de SDS 1%, demonstrando os sinais de hemorragia (↑)..... 39

Figura 15 – Membrana cório-alantóide antes (0s) e 30s, 2 min. e 5 min. após a aplicação de LESS a 27% (A), 10% (B), 7% (C) e 1% (D), demonstrando os sinais de hemorragia (↑) e coagulação (🡅)..... 39

Figura 16 – Membrana cório-alantóide antes (0s) e 30s, 2 min. e 5 min. após a aplicação de CGS a 3% (A) e a 1,5% (B), demonstrando os sinais de hemorragia (↑)..... 40

Figura 17 – Membrana cório-alantóide antes (0s) e 30s, 2 min. e 5 min. após a aplicação de polissorbato 20 a 100% (A) e 10% (B), demonstrando os sinais de hemorragia (↑)..... 41

Figura 18 – Membrana cório-alantóide antes (0s) e 30s, 2 min. e 5 min. após a aplicação de CCMG a 3% (A) e a 1,5% (B), demonstrando os sinais de hemorragia (↑)..... 41

Figura 19 – Membrana cório-alantóide antes (0s) e 30s, 2 min. e 5 min. após a aplicação de CAB a 3% (A) e a 1,5% (B), demonstrando os sinais de hemorragia (↑) e coagulação (🡅)..... 42
.

Figura 20 – Membrana cório-alantóide antes (0s) e 30s, 2 min. e 5 min. após a aplicação de dimeticone..... 42

Figura 21 – Membrana cório-alantóide antes (0s) e 30s, 2 min. e 5 min. após a aplicação de ciclopentasiloxano..... 42

Figura 22 – Gráfico relacionando os eventos vasculares, hiperemia, hemorragia e coagulação, de acordo com a substância analisada no ensaio de HET-CAM. Barras: média ± IC 95%..... 43

Figura 23 – Gráficos relacionando a opacidade (A) e permeabilidade (B) de cada substância avaliada no ensaio de BCOP. Barras: média ± desvio padrão..... 48

Figura 24 – Fotomicrografias das córneas bovinas submetidas ao controle negativo NaCl 0,9% (A – IVIS: 0,5; classificação: não irritante) e ao controle positivo etanol 100% (B – IVIS: 62, classificação irritante severo). A seta indica os vacúolos nas células asas e basais. Coloração HE. Aumento de 20x..... 52

Figura 25 – Fotomicrografias das córneas bovinas submetidas ao SDS 1% (A – IVIS: 14, classificação: irritante leve), SDS 10% (B – IVIS: 43, classificação: irritante severo). A seta indica os núcleos picnóticos. Coloração HE. Aumento de 20x..... 52

Figura 26 – Fotomicrografias das córneas bovinas submetidas ao LESS 7% (A – IVIS: 20, classificação: irritante moderado), LESS 10% (B – IVIS: 27, classificação: irritante moderado). Coloração HE. Aumento de 20x..... 52

Figura 27 – Fotomicrografias das córneas bovinas submetidas ao CGS 1,5% (A – IVIS: 3,2, classificação: não irritante), CGS 3% (B – IVIS: 6,6, classificação: irritante leve). Coloração HE. Aumento de 20x..... 53

Figura 28 – Fotomicrografias das córneas bovinas submetidas ao CAB 1,5% (A – IVIS: 24, classificação: irritante severo), CAB 3% (B – IVIS: 38, classificação: irritante severo). Coloração HE. Aumento de 20x..... 53

Figura 29 – Fotomicrografia da córnea bovina submetida ao Polissorbato 20

(10%) (IVIS: 0,4, classificação: irritante discreto). Coloração HE. Aumento de 20x..... 53

Figura 30 – Fotomicrografias das córneas bovinas submetidas ao CCMG 1,5% (A – IVIS: 2, classificação: não irritante), CCMG 3% (B – IVIS: 29,6, classificação: irritante severo). As setas indicam os vacúolos na camada de células basais. Coloração HE. Aumento de 20x..... 54
.

Figura 31 – Fotomicrografias das córneas bovinas submetidas ao Dimeticone (A – IVIS: 0,5, classificação: não irritante) e Ciclopentasiloxano (B – IVIS: 0,4, classificação: não irritante). Coloração HE. Aumento de 20x..... 54

Figura 32 – Esquema representativo da proposta de estratégia de avaliação do potencial de irritação ocular de ingredientes cosméticos..... 58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Métodos alternativos validados e aceitos pela OECD ou em processo de validação para avaliar o potencial de irritação ocular..... 13

Tabela 2 – Descrição dos ingredientes cosméticos relacionando o seu tipo, a sua classificação GHS para irritação ocular e o seu valor de pH..... 25

Tabela 3 – Tempo em segundos relacionado com cada fenômeno vascular..... 28

Tabela 4 – Escore de irritação (MSc) e sua respectiva classificação de irritação no HET-CAM..... 28

Tabela 5 – Escore de irritação *in vitro* (IVIS) com sua respectiva categoria de irritação no BCOP..... 31
.

Tabela 6 – Classificação do potencial de irritação de uma substância química de acordo com a profundidade das lesões encontradas no epitélio da córnea bovina..... 33

Tabela 7 – Classificação do potencial de irritação de uma substância química de acordo com a profundidade das lesões encontradas no estroma da córnea bovina..... 33

Tabela 8 – Média e desvio padrão dos valores de escore médio de irritação (MSc) e classificação das substâncias estudadas. N=8..... 43

Tabela 9 – Valores de opacidade e permeabilidade com seus desvios padrão e escore de irritação *in vitro* (IVIS) e categoria de irritação das substâncias estudadas. N = 4..... 47

Tabela 10 – Classificação do potencial de irritação ocular das substâncias estudadas de acordo com o ensaio realizado e a sua classificação GHS..... 56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BCOP	Bovine Corneal Opacity and Permeability
CAB	Cocoamidopropilbetaína
CCMG	Capriloil/Caproil Metil Glucamida
CGS	Cocoilglutamato de sódio
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DO	Densidade Óptica
EMEM	*Eagle's Minimum Essential Medium*
FDA	*Food and Drug Administration*
HBSS	*Hanks' Balanced Salt Solution*
HET-CAM	*Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane*
INCI	*Internacional Nomenclature of Cosmetic Ingredients*
IVIS	*In Vitro Irritance Score*
LESS	Lauril Éter Sulfato de Sódio
LSS	Lauril Sulfato de Sódio
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
µg/mL	Micrograma por mililitro
MSc	*Mean Score*
mim	minuto
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
SCCS	*Scientific Committee on Consumer Safety*

SDS	*Sodium dodecyl sulfate*
s	segundos
TG	*Test Guidelines*
UI/mL	Unidade Internacional por mililitro
UN GHS	United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals
VIS	Visível

SUMÁRIO

Resumo..... i
Abstract..... ii
Lista de figuras..... iii
Lista de tabelas..... vii
Lista de abreviaturas e siglas..... viii

1. INTRODUÇÃO..... 1

2. REVISÃO DA LITERATURA..... 5
2.1 O olho humano..... 6
2.2 Irritação ocular e classificação GHS..... 7
2.3 Contextualização do teste de Draize..... 8
2.4 Métodos alternativos para a avaliação do potencial de irritação ocular..... 10
2.4.1 HET-CAM..... 13
2.4.2 BCOP..... 15
2.4.3 Histopatologia..... 17
2.5 Tensoativos..... 18
2.6 Silicones..... 20

3. OBJETIVOS..... 22
3.1 Objetivo geral..... 23
3.2 Objetivos específicos..... 23

4. MATERIAL E MÉTODOS..... 24
4.1 Material..... 25
4.1.1 Ingredientes cosméticos..... 25
4.1.2 Reagentes..... 26
4.1.3 Equipamentos e acessórios..... 26
4.2 Métodos..... 26
4.2.1 Avaliação do potencial de irritação ocular pelo ensaio de HET-CAM..... 27
4.2.2 Avaliação do potencial de irritação ocular pelo ensaio de BCOP..... 29

4.2.2.1 Preparo dos olhos..... 30
4.2.2.2 Aplicação da substância teste e determinação da opacidade e permeabilidade..... 30
4.2.3 Análise estatística..... 31
4.2.4 Confecção das lâminas histológicas..... 31
4.2.5 Avaliação histopatológica..... 32

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 34
5.1 Avaliação do potencial de irritação ocular pelo ensaio HET-CAM..... 35
5.2 Avaliação do potencial de irritação ocular pelo ensaio de BCOP..... 44
5.3 Avaliação histopatológica..... 49
5.4 Resumo dos resultados da avaliação do potencial de irritação ocular..... 54
5.5 Proposta de estratégia para a avaliação do potencial de irritação ocular..... 57

6. CONCLUSÃO..... 59

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 61

APÊNDICE 68

1. Introdução

Considerando que o produto cosmético é de livre acesso ao consumidor e que, principalmente, os produtos para cabelos, rosto e área dos olhos podem acidentalmente entrar em contato com os olhos, ocasionando sinais de irritação, é necessário garantir a segurança desses quando em contato com os olhos, ou seja, devem ser aprovados em testes de irritação ocular (ANVISA, 2012).

Durante muitos anos, o potencial de irritação ocular de produtos químicos foi avaliado, principalmente, pelo teste de Draize (DRAIZE et al., 1944), o qual envolve a instilação de substâncias no saco conjuntival de coelhos e a observação de alterações na conjuntiva, na íris e na córnea. Entretanto, devido a questões éticas envolvendo o uso de animais de experimentação, observa-se que nas últimas décadas houve grandes investimentos no desenvolvimento e validação de métodos alternativos *in vitro*, que têm como objetivo prever as respostas à irritação ocular observadas no teste de Draize (ESKES et al., 2005, ICCVAM, 2006a,b).

O uso de testes em animais para avaliação da eficácia e segurança de produtos cosméticos, bem como a comercialização destes e de suas matérias-primas que tenham sido testadas em animais foram proibidos na Comunidade Europeia (EC, 1976, 2003, 2013). No Brasil, o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) estabeleceu prazo até 2019 e 2021 (BRASIL, 2014, 2016) para a substituição obrigatória de alguns testes realizados em animais por métodos alternativos reconhecidos e validados pela *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD), e dentre eles estão os testes de irritação ocular, que foi o objeto de interesse do presente estudo.

A irritação ocular geralmente envolve mais de um mecanismo de toxicidade, sendo que somente um ensaio *in vitro*, que estuda apenas um ou dois desfechos, eventos ou *endpoints* não é suficiente para uma completa predição da segurança ocular do produto. Dessa forma, o ideal é a combinação de vários métodos alternativos dentro de uma estratégia de ensaio para a avaliação do potencial de irritação ocular de um determinado produto ou substância (SCOTT et al, 2010).

Atualmente, o ensaio de Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) e o ensaio de permeabilidade e opacidade de córnea bovina (BCOP, do inglês *Bovine Corneal Opacity and Permeability*) constituem métodos alternativos ao uso de animais para avaliação do potencial de irritação ocular.

O ensaio de HET-CAM, que fornece dados relacionados a eventos vasculares, incluindo hiperemia, hemorragia e coagulação, mimetiza a conjuntiva do olho (ICCVAM, 2006b), e tem por objetivo avaliar semiquantitativamente o potencial irritante de um produto

químico sobre a membrana cório-alantóide (CAM) de ovo embrionado de galinha por meio da observação dos efeitos irritantes sobre a mesma imediatamente após a aplicação do produto químico puro ou diluído (LUEPKE, 1985; LUEPKE; KEMPER, 1986). As vantagens desse teste é que ele é simples, rápido, de fácil manipulação e relativamente de baixo custo.

O ensaio de BCOP utiliza córneas isoladas dos olhos de bovinos recém-abatidos, os quais são descartados pelo abatedouro. As substâncias avaliadas são aplicadas na superfície do epitélio da córnea e os danos causados pelas mesmas são avaliados pelas alterações de opacidade e de permeabilidade da córnea. Ambas as medidas são utilizadas para calcular o escore de irritação, que é usado para atribuir uma classificação quanto ao grau de irritação ocular *in vitro* do produto químico testado para a previsão do seu potencial de irritação ocular *in vivo* (OECD, 2013).

Além disso, a avaliação histopatológica das córneas utilizadas no ensaio de BCOP pode ser uma ferramenta útil na identificação de danos nas camadas da córnea que não apresentaram valores significativos de opacidade e/ou permeabilidade, avaliando-se o grau e a profundidade dos danos (OECD, 2016), permitindo, com isso, discriminar entre irritantes leves e moderados (CATER; HARBELL, 2006).

Os tensoativos são componentes importantes na formulação de produtos cosméticos e de higiene, como shampoos, sabonetes e cremes em geral, devido as suas características de diminuir a tensão interfacial entre líquidos imiscíveis, emulsificação, detergência e outras. O lauril sulfato de sódio (LSS) ou dodecil sulfato de sódio (SDS, do inglês *sodium dodecyl sulfate*), o lauril éter sulfato de sódio (LESS) e o cocoilglutamato de sódio são tensoativos aniônicos, os quais já são conhecidos por sua irritabilidade cutânea (EFFENDY; MAIBACH, 1996), porém são amplamente empregados em shampoos, cremes emolientes, dentre outros, devido às suas propriedades detergente, espumante, emulsificante e solubilizante. O polissorbato 20 e o capriloil/caproil metil glucamida (CCMG) são tensoativos não iônicos e hidrofílicos, considerados mais suaves por ter baixo potencial irritante e são usados para obter emulsões do tipo óleo em água (O/A), como cremes hidratantes e produtos de limpeza facial, além de serem utilizados como cotensoativos em shampoos. Já o cocoamidopropilbetaína é um tensoativo anfótero supostamente menos agressivo que os aniônicos e, por isso, utilizado em combinação para melhorar a suavidade do produto, além de ter um alto poder de limpeza e de espuma (CORAZZA et al., 2010; CORRÊA, 2012).

Os silicones são polímeros formados por átomos de silício e oxigênio, quimicamente inertes, que permitem combinações com outras substâncias sem perderem as suas características. Por isso, eles são largamente empregados na fabricação de produtos para o

cabelo, rosto e corpo, principalmente por conferir toque seco, maciez e um sensorial agradável após a aplicação do produto. O dimeticone apresenta propriedade antiespumante, redução da sensação de oleosidade e pegajosidade, boa espalhabilidade e rápida secagem quando aplicado à pele, sendo utilizado em cremes, shampoos e condicionadores (CORRÊA, 2012). Já o ciclopentasiloxano é um silicone volátil que apresenta bom efeito condicionador para os cabelos e ação emoliente para a pele, baixa pegajosidade e toque seco, também presente em cremes, demaquilantes, máscara para cílios e condicionadores (JOHNSON et al., 2011).

Assim, o presente estudo é grande importância, pois avaliou o potencial de irritação ocular de substâncias frequentemente utilizadas na fabricação de shampoos, demaquilantes e produtos para a área dos olhos por meio dos testes alternativos à experimentação animal, visando propor uma estratégia para a substituição do teste de Draize, principalmente para substâncias com baixo potencial de irritação ocular, contribuindo, assim, para proposição de novas estratégias para a avaliação do potencial de irritação ocular de ingredientes cosméticos.

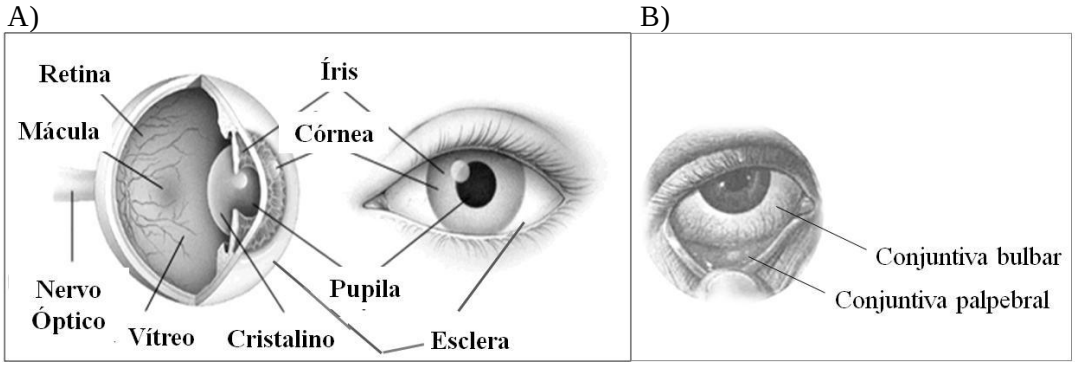
2. Revisão da Literatura

2.1 O olho humano

Os olhos são órgãos que refratam e focalizam raios luminosos que incidem sobre os fotorreceptores da parte posterior do olho resultando na formação das imagens.

O globo ocular é fibrovascular e é composto por três camadas concêntricas: a túnica fibrosa, a túnica vascular e a túnica neuroectodérmica. A túnica fibrosa é a camada mais externa do olho, composta da córnea e da esclera. A túnica vascular (ou úvea) é intermediária e compreende a coroide, o corpo ciliar e a íris. A túnica neuroectodérmica é a camada mais interna e é composta pela retina, que contém fotorreceptores e está conectada ao sistema nervoso central (Figura 1) (VAN De GRAAF, 2003).

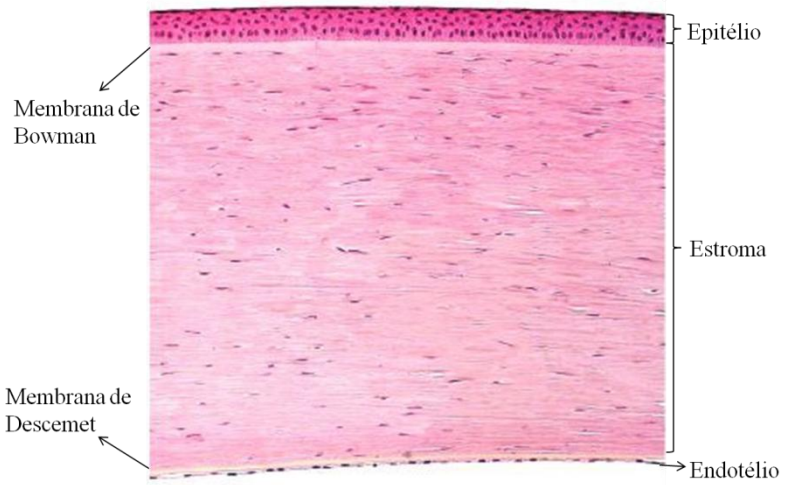
Figura 1 – Anatomia do olho humano mostrando as suas diferentes estruturas (A) e a conjuntiva ocular (B)



Fonte: Adaptado de http://retinaportugal.org.pt/wordpress/funcionamento-do-olho/

A córnea é uma superfície transparente e não vascularizada do olho e é composta de cinco camadas: o epitélio, a membrana de Bowman, o estroma, a membrana de Descemet e o endotélio (Figura 2). O epitélio é composto de células epiteliais não cornificadas com alta atividade mitótica (DANIELS et al., 2001). Essa camada serve como uma barreira para patógenos e ajuda a manter o estroma em um nível adequado de hidratação através das junções celulares que estão presentes em grande número. A membrana de Bowman, que separa o estroma do epitélio, é uma fina camada com ausência de células e composta de colágeno formando uma rede fina de fibrilas. O estroma é a camada mais espessa e é responsável pela integridade estrutural da córnea. O colágeno, produzido pelos queratinócitos do estroma, é estruturado de forma organizada, o que é fundamental para manter a transparência da córnea (MEEK; BOOTE, 2004). A membrana de Descemet, que separa o estroma do endotélio, é acelular e composta por colágeno secretado pelas células endoteliais. O endotélio, localizado entre a membrana de Descemet e o humor aquoso, é composto por uma camada única de células, as quais apresentam um baixíssimo potencial de autorrenovação (LOTZ et al., 2016).

Figura 2 – Histologia da córnea humana demonstrando as suas diferentes camadas



Fonte: Adaptado http://medicosdofuturo.blogspot.com.br/p/distrofia-fuch.html

A esclera é constituída de fibras elásticas e colágenas ligadas firmemente entre si, as quais conferem forma ao globo ocular, proteção às suas estruturas internas e produzem a cor branca e opaca observada no globo ocular. A esclera é avascular, mas contém receptores sensitivos para dor (VAN De GRAAF, 2003).

A conjuntiva é uma membrana mucosa que cobre a superfície exposta da esclera (conjuntiva bulbar) e a superfície interna das pálpebras (conjuntiva palpebral) (Figura 1). A conjuntiva contém vasos sanguíneos, nervos, glândulas e células inflamatórias. Assim, quando ocorre uma resposta inflamatória na conjuntiva, há dilatação dos vasos sanguíneos, extravazamento de fluidos e de células (ICCVAM, 2006a,b).

A camada intermediária do globo ocular é extremamente importante para a regulação do sangue e barreiras de permeabilidade ocular, manutenção da pressão intraocular no humor aquoso e drenagem do fluido ocular. É importante notar que alterações de qualquer destas características (por exemplo, edema, destruição celular, vascularização, proliferação celular) podem causar opacidade da córnea e perda da sua função (PARISH, 1985; VAN De GRAAF, 2003).

2.2 Irritação ocular e classificação GHS

Segundo Maurer e colaboradores (2002) e Jester (2006), existem quatro mecanismos de ação que levam à irritação ocular: lise da membrana celular, saponificação, coagulação e ações em macromoléculas. A lise da membrana está relacionada à ruptura da integridade da membrana que pode ocorrer após a exposição desta a um produto químico irritante como, por exemplo, um tensoativo. A coagulação é a precipitação ou desnaturação de macromoléculas, principalmente proteínas, característica da exposição a ácido, base ou solvente orgânico. Já a

saponificação é a degradação dos lipídeos por ação alcalina, gerando alguns sinais exteriores semelhantes à lise da membrana e à coagulação, mas a sua ação tende a ser progressiva através do tecido com o passar do tempo. Por fim, ações sobre macromoléculas são geradas quando substâncias químicas (ex.: peróxidos, oxidantes) reagem com componentes celulares ou organelas por meio de reação de alquilação ou ataque oxidativo a proteínas essenciais ou ácidos nucleicos, por exemplo, podendo ou não levar a lise ou coagulação.

Para garantir a segurança dos consumidores, todos os produtos químicos devem ser rotulados com informações pertinentes ao seu tipo e ao seu perigo, comunicando-os aos usuários por meio de símbolos e frases nos rótulos e nas fichas de informações de segurança de produtos químicos. No âmbito do Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS - Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals), desenvolvido pelas Nações Unidas (UN – United Nations), cujo objetivo é padronizar e harmonizar a classificação e a rotulagem de substâncias químicas e misturas, as mesmas são classificadas da seguinte maneira (UN, 2015):

- Categoria 1: irritantes severos ou corrosivos – efeitos oculares irreversíveis
- Categoria 2/2A: irritantes – efeitos oculares reversíveis em 21 dias
- Categoria 2B: irritantes leves – efeitos oculares reversíveis em 7 dias
- Sem Categoria ou Não Classificado: não irritantes

Em princípio, esse sistema incentiva o uso de informações a partir de métodos que não utilizem animais, no entanto, a definição atual das categorias de irritação ocular é baseada no teste de Draize.

2.3 Contextualização do teste de Draize

Em 1933, uma mulher de 38 anos ficou cega após ter desenvolvido uma reação severa que evoluiu para ceratite bilateral e eventual cicatrização da córnea. Essa reação foi consequência do uso da máscara para cílios *Lash-Lure*, um produto composto por derivado de alcatrão de carvão e para-fenilenodiamina, que podem causar blefarite alérgica, ceratoconjuntivite tóxica e ceratite bacteriana secundária (WILHELMUS, 2001).

Esse caso, dentre tantos outros, estimulou os países a criarem ações regulatórias para que a segurança dos consumidores fosse garantida. O Congresso dos EUA aprovou uma legislação, a Federal Food, Drug e Cosmetic Act de 1938, que ampliou o controle regulatório para cosméticos. Esta legislação exigia que os fabricantes avaliassem a segurança dos produtos antes de comercializá-los (WILHELMUS, 2001).

Foi nesse contexto que o teste de Draize (DRAIZE et al., 1944) foi desenvolvido pelo farmacologista da FDA, John H. Draize, com o propósito de garantir a segurança tanto de produtos cosméticos como de outros produtos, como inseticidas e antissépticos. Esse teste foi adotado pela OECD em 1981 com o *test guideline* (TG) 405, o qual sofreu algumas alterações ao longo dos anos, sendo que a última versão foi publicada em 2012.

O teste de Draize consiste na instilação do produto teste, em uma única dose, no saco conjuntival do olho de coelho albino. O grau da lesão ocular é avaliado pontuando as lesões na córnea (opacidade, densidade, ulceração), na íris (intensidade das rugas, congestão, inchaço, hiperemia, hemorragia, reação à luz), na conjuntiva (vermelhidão e difusão dos vasos) e nas pálpebras (inchaço/edema nas pálpebras). A duração do estudo deve ser suficiente para avaliar a reversibilidade ou irreversibilidade dos efeitos. A classificação GHS baseia-se nos escores médios obtidos nos dias 1, 2 e 3 após a exposição à substância teste e a reversibilidade ou irreversibilidade dos efeitos são observados por até 21 dias. (OECD, 2012).

Por um lado, esse teste apresenta os seguintes pontos positivos: demonstração de todos os possíveis mecanismos de ação que geram lesões oculares graves e reações de irritação ocular presentes nos olhos de coelhos; pode identificar todas as classes de substâncias (GHS sem categoria, categoria 1, categoria 2A e B); e detecção de reversibilidade e/ou a persistência dos efeitos (Draft GD on IATA for Eye Hazard Potential, OECD, 2016).

Por outro lado, existem vários pontos negativos desse teste, tais como (Draft GD on IATA for Eye Hazard Potential, OECD, 2016):

- teste não validado formalmente;
- para certos produtos químicos (por exemplo, sólidos, pegajosos), o piscar pode causar danos mecânicos, contribuindo para um grau mais elevado de irritação;
- o tipo de exposição animal não reflete o cenário de exposição acidental humana;
- diferenças na fisiologia e sensibilidade aos produtos químicos entre os olhos de coelho e os olhos humanos;
- o teste pode ser muito doloroso para os coelhos;
- baixa reprodutibilidade que pode ser devido à:
    - subjetividade nas pontuações das lesões oculares;
    - duração não clara e quantidade de exposição do produto teste nos olhos de coelho, que pode variar dependendo das propriedades do produto químico (sólido, pasta ou líquido), bem como do reflexo de piscar e lacrimejar do animal;
    - possibilidade de superestimar ou subestimar os resultados.

Um levantamento realizado por pesquisadores ligados ao ECVAM / JRC (European Centre for the Validation of Alternative Methods / Joint Research Centre) (ADRIAENS et al., 2014) avaliou quais eram os principais eventos associados ao teste de Draize publicados em artigos na literatura e a variabilidade desse ensaio. Levando em consideração apenas a variabilidade intra ensaio, pelo menos 11% dos produtos químicos classificados, pelo teste de Draize, como GHS categoria 1 poderiam ser igualmente identificados como Categoria 2, e cerca de 12% dos classificados como Categoria 2 poderiam ser igualmente identificados como produtos químicos sem categoria. Já quando a variabilidade inter ensaio foi considerada, a concordância foi de 65,2% para os produtos químicos classificados como apenas Categoria 2. Contudo, quando as Categoria 2A e Categoria 2B foram consideradas separadamente, a concordância observada foi de 56,5%. Além disso, outro artigo indicou que a concordância da ocorrência do mesmo evento (por exemplo, alterações na conjuntiva e na córnea) para classificação da mesma substância por diferentes laboratórios, foi de apenas 39,1% para os produtos químicos avaliados (BARROSO et al., 2016).

A última atualização do teste de Draize recomenda uma análise apurada dos dados existentes (*weight-of-evidence*) do produto em estudo, e envolve a utilização prévia de métodos que não utilizam animais, a fim de assegurar a necessidade ou não do teste em animais. Ou seja, se um produto for considerado irritante severo ou corrosivo, ou não irritante em um ensaio *in vitro* que seja capaz de distinguir essas classes de irritação, ele não poderá ser avaliado no olho de coelho (OECD, 2012).

Recentemente, a OECD disponibilizou um documento de orientação, complementar ao TG 405, sobre Abordagens Integradas para Avaliação de Testes (IATA, do inglês *Integrated Approaches for Testing Assessment*) para danos oculares (Draft GD on IATA for Eye Hazard Potential, OECD, 2016). Esta versão, ainda não foi finalizada, mas já propõe diversas etapas de avaliação do potencial de irritação ocular de uma substância, incluindo a citação de alguns métodos alternativos *in vitro* já validados ou em processo de validação, dentro da estratégia de ensaio antes de se considerar o ensaio em animais vivos.

2.4 Métodos alternativos para a avaliação do potencial de irritação ocular

Uma vez que, o teste de Draize tem sofrido diversas críticas em relação à metodologia, reprodutibilidade, relevância dos resultados, e ainda questões éticas envolvendo o uso de animais de experimentação (WILHELMUS, 2001; ADRIAENS et al., 2014), nas últimas décadas houve grande investimento para o desenvolvimento e validação de métodos

alternativos *in vitro*, que têm como objetivo prever as respostas à irritação ocular observadas no teste de Draize (ESKES et al., 2005, ICCVAM, 2006a,b, LOTZ et al. 2016).

O desenvolvimento de novos métodos para avaliar o potencial de irritação ocular tem como fundamento o Princípio dos 3 R's baseado no conceito proposto por William Russell e Rex Burch publicado no livro *Principles of Humane Experimental Technique* (1959), cujos "R's" são as iniciais das palavras *Reduction* (redução), *Refinement* (refinamento) e *Replacement* (substituição).

A redução tem como objetivo obter a mesma informação ou maximização da informação obtida por animal, reduzindo, com isso, o número de animais utilizados em pesquisas. O refinamento é a promoção do alívio ou a minimização da dor, sofrimento ou estresse do animal. Já a substituição é o emprego de um método científico que não use animais vertebrados vivos e que consiga, assim, predizer as respostas adequadas para os parâmetros estudados. Enquanto a redução e o refinamento são estabelecidos a curto prazo, a substituição ainda é um grande desafio a ser vencido a longo prazo por meio de estratégias que contemplem métodos que não utilizem animais e que permitam a extrapolação dos dados para os seres humanos.

Na Comunidade Europeia, foi proibido o uso de ensaios em animais para avaliação da eficácia e segurança de produtos cosméticos, bem como a comercialização destes e de suas matérias-primas que tenham sido avaliados em animais (EC, 1976, 2003, 2013). Mais recentemente, em 2014, no Brasil, o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), por meio das Resoluções Normativas 17, 18 e 31, estabeleceu prazo até 2019 e 2021 (BRASIL, 2014, 2016) para a substituição obrigatória de alguns testes realizados em animais por métodos alternativos reconhecidos e validados pela OECD, dentre os quais estão os testes de irritação ocular, que foi o objeto de interesse do presente trabalho.

Como a irritação ocular geralmente envolve mais de um mecanismo de toxicidade, e não existe, até o momento, um único método alternativo que substitua o teste de Draize para uma completa predição da segurança do produto, o ideal é a combinação de vários métodos alternativos dentro de uma estratégia de ensaio. A estratégia envolve inicialmente a obtenção de informações já existentes na literatura, como propriedades físico-químicas, dados históricos em animais e em humanos, seguida pelos testes *in vitro* (McNAMEE et al., 2009; OECD, 2012).

Uma estratégia de ensaio, combinando diferentes métodos alternativos, pode ser dividida em dois tipos de abordagem: Top-Down e Bottom-Up. A primeira é usada quando a substância teste apresenta evidências de ter um alto potencial de irritação ocular (GHS

categoria 1), enquanto que o Bottom-Up é executado quando a substância teste apresenta indícios de ter um potencial baixo potencial irritante (GHS categoria 2) ou não ser irritante (GHS sem categoria) (SCOTT et al, 2010). Esse tipo de estratégia vem sendo seguida e aperfeiçoada deste então (Draft GD on IATA for Eye Hazard Potential, OECD, 2016).

Para que se tenha uma estratégia de ensaio bem delineada deve-se lançar mão de ensaios que são validados e reconhecidos pela OECD, bem como daqueles que ainda não foram validados, mas são considerados válidos, ou seja, são descritos na literatura científica como sendo adequados para determinada avaliação. Atualmente, existem poucos ensaios, validados pela OECD, para avaliar o potencial de irritação ocular (Tabela 1) e todos eles conseguem distinguir com exatidão apenas se uma substância é irritante severo/corrosivo (GHS categoria 1) ou não irritante (GHS sem categoria). Além desses métodos, existem outros em estudo e/ou em processo de validação (Tabela1) para avaliar o potencial de irritação ocular e, alguns destes, propõe distinguir as substâncias moderada ou levemente irritantes (GHS categoria 2) das demais, como por exemplo, o modelo de hemi-córnea 3D (modelo de córnea humana reconstituída contendo epitélio e estroma).

Tabela 1 - Métodos alternativos validados e aceitos pela OECD ou em processo de validação para avaliar o potencial de irritação ocular

Métodos validados	**Métodos em processo de validação**
Teste de permeabilidade e opacidade de córnea bovina (Bovine Corneal Opacity Permeability, BCOP) – OECD TG 437	Teste da membrana cório-alantóide de ovo de galinha (HET-CAM)
Teste do olho isolado de galinha (Isolated Chicken Eye, ICE)– OECD TG 438	Ensaio da membrana cório-alantóide vascular (CAMVA)
Teste *in vitro* de curta duração (Short Time Exposure, STE, *in vitro* test) – OECD TG 491	Ensaio de opacidade / reversibilidade da córnea porcina (PorCORA)
Modelo de epitélio de córnea humana reconstituída (Reconstructed Human Cornea-like Epithelium, RhCE) – OECD TG 492	Teste de células vermelhas do sangue (RBC)
Teste de Permeação de Fluoresceína (Fluorescein Leakage) – OECD TG 460	Liberação de vermelho neutro (NRR)
	Cytosensor Microphysiometer
	Ocular Irritection®
	Teste do olho isolado de coelho (IRE)
	Teste de irritação ocular *ex-vivo* (EVEIT)
	Hemi-córnea 3D
	Ensaio de irritação de mucosa de lesma (SMI)

Fonte: Adaptado de Draft GD on IATA for Eye Hazard Potential, OECD, 2016.

Dentre os métodos propostos, consideramos que o ensaio de Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) e o ensaio de permeabilidade e opacidade da córnea bovina (BCOP) em combinação com o estudo histopatológico destas córneas constituem uma estratégia promissora para avaliação da toxicidade ocular sem utilizar animais de laboratório e que seja capaz de diferenciar as substâncias entre suas categorias de irritação, ou seja, irritantes severos, moderados, leves ou não irritantes.

2.4.1 HET-CAM

O ensaio de HET-CAM é um método que ainda está em processo de validação, porém ele já é aceito e usado em diversas empresas farmacêuticas, cosméticas e de produtos de higiene da Comunidade Europeia e dos Estados Unidos, tendo como

finalidade avaliar o potencial de irritação ocular de uma grande diversidade de substâncias ou produtos (ICCVAM, 2006b). Esse ensaio é um dos únicos que fornece, especificamente, dados semiquantitativos relacionados a eventos vasculares, incluindo hiperemia, hemorragia e coagulação, que podem ocorrer na membrana cório-alantóide (CAM) de ovo embrionado de galinha após a exposição da substância teste, simulando, assim a conjuntiva do olho (LUEPKE 1985; LUEPKE; KEMPER 1986).

A hiperemia é caracterizada pelo aparecimento de novos capilares e pela dilatação dos capilares já presentes na CAM, os quais se tornam mais vermelhos, podendo afetar os vasos de maior diâmetro também. A hemorragia é caracterizada pela liberação de sangue difuso dos vasos e/ou capilares, tendo diferentes aparências. Já a coagulação pode ser caracterizada pela opacidade (aparência na totalidade ou parte da membrana) ou pela trombose (ruptura do fluxo sanguíneo nos vasos, resultando em uma aparência segmentada).

A CAM é uma membrana respiratória vascularizada que envolve o embrião de galinha em desenvolvimento, e é composta de 3 camadas: ectodérmica (epitélio), mesodérmica (tecido conjuntivo e vasos sanguíneos) e endodérmica (células escamosas). Os vasos sanguíneos que estão presentes na camada mesodérmica contêm eritrócitos e leucócitos que estão envolvidos na resposta inflamatória após a exposição a estímulos externos (PARISH, 1985). Infere-se que os efeitos agudos induzidos por uma substância sobre os vasos sanguíneos e proteínas desta membrana são semelhantes aos efeitos induzidos pela mesma substância no olho de um coelho tratado, ou seja, a CAM mimetiza a conjuntiva ocular (LUEPKE 1985; LUEPKE; KEMPER 1986).

O ensaio de HET-CAM é realizado no 10º dia de incubação do ovo de galinha, por isso ele não é considerado um ensaio *in vivo*. Nesse período, a diferenciação embrionária do sistema nervoso central da galinha não é completa, consequentemente, é improvável que haja sofrimento através da percepção da dor. Isso porque o embrião possui poucas fibras sensoriais nesse período, sendo que o desenvolvimento das terminações nervosas sensoriais ocorre apenas entre os dias 11 e 14 de incubação. Além disso, os sistemas vasculares extraembrionários, como por exemplo, o saco vitelino e a CAM, não são sensíveis à dor por não serem inervados (ICCVAM, 2006b).

Segundo a Associação Americana de Medicina Veterinária (AVMA, 2013), os embriões de galinha menores do que 13 dias de incubação são considerados incapazes de sentir dor e, mesmo assim, eles devem passar por eutanásia no final do experimento, atendendo a preceitos éticos. No caso do ensaio de HET-CAM, realizado no 10º dia de

incubação, pode-se utilizar a eutanásia por hipotermia, na qual os ovos são colocados em um congelador a -20 °C.

Por um lado, esse ensaio apresenta algumas limitações, como por exemplo, a aplicação de substâncias coloridas ou muito viscosas e a subjetividade na análise dos resultados (ICCVAM, 2006b). Essa última foi amenizada, no presente estudo, utilizando-se controles positivo e negativo, bem como um microscópio USB com aumento de até 200x para uma melhor visualização da ocorrência dos eventos vasculares na CAM (normalmente essa análise era feita a olho nu).

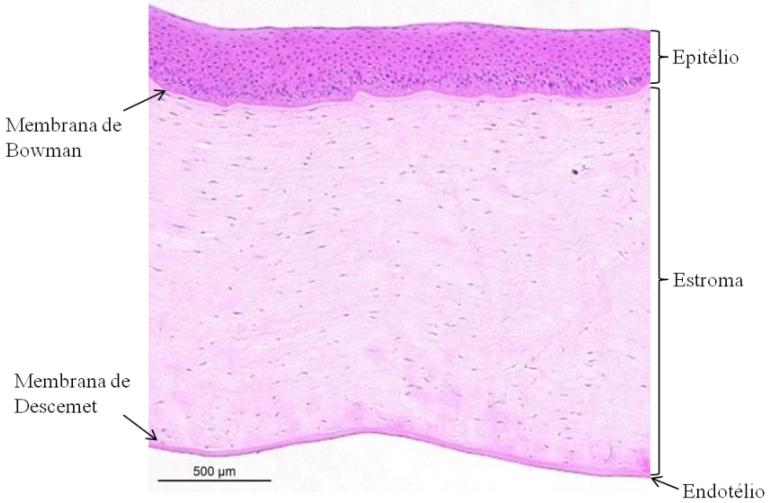
Por outro lado, por tratar-se de um teste simples, rápido, de fácil manipulação e relativamente de baixo custo, o HET-CAM tem sido usado como parte de estratégias de ensaios (SCHEEL et al., 2011; HAYASHI et al., 2012) para avaliar o potencial irritante de novas substâncias ativas e de produtos acabados nas áreas cosmética, farmacêutica e outras (DARIO et al., 2016; PESCINA et al., 2016).

2.4.2 BCOP

O ensaio de BCOP é considerado um modelo organotípico, ou seja, é um órgão inteiro isolado de um animal, que proporciona uma manutenção em curto prazo da função fisiológica e bioquímica normal da córnea num sistema isolado *in vitro* (CHAMBERLAIN et al., 1997). Esse ensaio já é validado e reconhecido pela OECD desde 2012, pelo TG OECD 437, para avaliar a irritação ocular de produtos químicos. A capacidade preditiva do ensaio de BCOP para a identificação de substâncias muito irritantes ou corrosivas (GHS Categoria 1) é de 78,5% de exatidão, 86% de sensibilidade e 74,6 de especificidade; enquanto que para a identificação de substâncias não irritantes (GHS sem categoria), a exatidão é de 69%, sensibilidade de 100% e especificidade de 31,5% em relação ao teste Draize (OECD, 2013).

Com isso, esse ensaio utiliza córneas isoladas dos olhos de bovinos recém-abatidos (para fins alimentícios), os quais são descartados pelo abatedouro. Além disso, a córnea bovina é muito semelhante à córnea humana, sendo constituída das seguintes camadas (Figura 3): epitélio, membrana de Bowman pouco desenvolvida, estroma, membrana de Descemet e endotélio. As principais diferenças entre a córnea humana e a córnea bovina são a espessura e o número de camadas de células epiteliais. A espessura da córnea humana é de aproximadamente 0,5 mm, enquanto que a bovina é de aproximadamente 0,8 mm; o número de camadas de células epiteliais na córnea humana é em média 5, enquanto que na bovina é em média 10-14 (ICCVAM, 2006a).

Figura 3 - Histologia da córnea bovina demonstrando as suas diferentes camadas



Fonte: Autoria própria.

Os parâmetros avaliados após a aplicação da substância teste sobre a superfície da córnea são: opacidade (quantidade de transmissão de luz através da córnea) e permeabilidade (quantidade de corante fluoresceína de sódio que penetra nas camadas de células da córnea) da córnea. A opacidade induzida por irritação da córnea indica desnaturação/precipitação de proteínas nas camadas epitelial ou no estroma e/ou inchaço, vacuolização ou danos nas células do estroma (ESKE et al., 2005; ICCVAM, 2006a). Esse tipo de alteração na córnea é um efeito adverso significativo que pode levar à perda de visão. Já o aumento da permeabilidade da córnea resulta de danos ao epitélio, cuja função é de barreira. Com isso, as medições são utilizadas para calcular o escore de irritação, que é usado para atribuir uma classificação quanto ao grau de irritação ocular *in vitro* do produto químico testado para a previsão do seu potencial de irritação ocular *in vivo* (OECD, 2013).

Esse ensaio é capaz de identificar corretamente as substâncias químicas e misturas que ocasionam danos oculares graves e irreversíveis (GHS categoria 1), bem como aquelas que não são irritantes e, por isso, não necessitam de classificação para irritação ocular (GHS sem categoria). No entanto, os produtos químicos que não se encaixam nessas duas categorias, ou seja, os irritantes que induzem lesões oculares reversíveis (GHS categoria 2), não são identificados de maneira específica somente com a realização deste teste, sendo necessária a execução de testes adicionais para estabelecer uma classificação exata e definitiva (OECD, 2013).

O ensaio de BCOP tem sido usado para avaliar a irritação ocular de diversos produtos, como por exemplo, higiene pessoal e cosméticos (COOPER et al., 2001; DONAHUE et al., 2011; FURUKAWA et al., 2015), materiais nanoparticulados (KOLLE et al., 2016), corantes

têxteis (OLIVEIRA et al., 2015) e produtos de limpeza (CATER; HARBELL, 2013), demonstrando a sua ampla aplicabilidade tanto na pesquisa científica acadêmica quanto na indústria.

2.4.3 Histopatologia

Levando em consideração que o ensaio de BCOP não é sensível para distinguir as substâncias moderadamente irritantes das levemente irritantes (GHS categoria 2), a avaliação histopatológica das córneas constitui-se uma ferramenta útil nessa identificação (CATER; HARBELL, 2006; OECD, 2016). Isso porque o estudo histopatológico é capaz de identificar os danos presentes nas camadas do tecido córneo que não apresentaram valores significativos de opacidade e/ou permeabilidade, avaliando-se as alterações morfológicas da córnea, o grau e a profundidade dos danos (COOPER et al., 2001; FURUKAWA et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2015).

Jester e colaboradores (1998) e Maurer e colaboradores (2002), ainda, inferem que a histopatologia pode ser capaz de predizer se o dano é reversível ou não. Eles verificaram que, para várias substâncias químicas, a profundidade da lesão, nas primeiras horas após a exposição, pode ser preditiva do grau e duração de possíveis lesões oculares. Apenas o dano epitelial, na córnea do coelho, está associado à recuperação desta camada desde que a lâmina basal não tenha sido afetada. Já lesões mais profundas, abrangendo o estroma e, até mesmo, o endotélio têm consequências mais graves e, até mesmo, irreversíveis.

Uma vez que, no ensaio de BCOP, as substâncias teste são aplicadas topicamente no epitélio da córnea bovina, a avaliação das alterações no tecido das córneas é realizada iniciando-se pela camada mais superficial do epitélio escamoso, avançando para as camadas mais profundas, até o endotélio. A profundidade da lesão depende da penetração da substância química na córnea e do potencial tóxico que a mesma pode induzir (OECD, 2016).

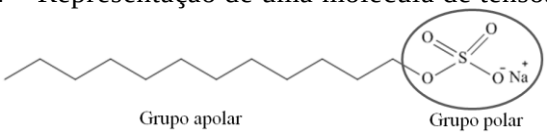
Desta forma, a histopatologia torna-se uma ferramenta bastante útil quando associada ao ensaio de BCOP pelas seguintes razões: para as avaliações de risco, para determinar se as alterações induzidas na córnea, pelo produto teste, são evidentes e, na presença de tais alterações, a profundidade e o grau destas são pertinentes. Além disso, a histopatologia pode elucidar as alterações celulares e estruturais associadas com os aumentos de opacidade e da permeabilidade à fluoresceína, ou, ainda, proporcionar evidências de lesões na córnea que não foram detectadas apenas pelos parâmetros do BCOP (OECD, 2016).

Assim, apesar de não existir um modelo preditivo reconhecido pela OECD para esta avaliação, considera-se importante a utilização dessa técnica para complementar o ensaio de BCOP.

2.5 Tensoativos

Os tensoativos são compostos orgânicos constituídos de um grupo apolar (cauda lipofílica) e outro grupo polar (cabeça hidrofílica) (Figura 4), o que confere a eles solubilidade tanto em solventes orgânicos quanto em água e a habilidade de modificar a interface entre dois líquidos imiscíveis (RIEGER, 2000) e, portanto tem a propriedade de formar micelas, estabilizar emulsões e ainda tem poder de detergência. Os tensoativos são componentes importantes na formulação de produtos cosméticos e de higiene, como shampoos, sabonetes e cremes em geral.

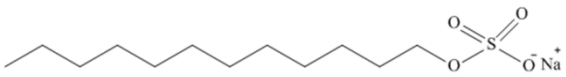
Figura 4 – Representação de uma molécula de tensoativo



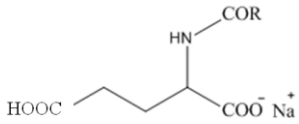
Os tensoativos são classificados de acordo com a carga presente na parte polar/hidrofílica da molécula em quatro grupos: aniônico, catiônico, anfótero e não iônico.

Os tensoativos aniônicos possuem uma carga negativa no seu grupamento polar quando em solução aquosa. Eles têm um alto poder de limpeza, propriedade molhante, espumante, emulsificante, solubilizante e característica desinfetante moderada, e são comumente utilizados como tensoativos primários nos produtos de limpeza (CORAZZA et al., 2010; CORRÊA, 2012). No entanto, esses agentes são considerados potentes irritantes para a pele. No presente trabalho, foram estudados 3 desses tensoativos (Figura 5): o lauril sulfato de sódio ou dodecil sulfato de sódio (SDS), que é bastante conhecido quanto à sua toxicidade cutânea e ocular, porém ainda é utilizado em baixas concentrações (até 1%) em formulações enxaguáveis (CIR, 1983); o lauril éter sulfato de sódio (LESS), um dos tensoativos aniônicos mais usados em shampoos por ser considerado menos agressivo que o SDS, pois apresenta grupos etoxilados em sua estrutura molecular que aumentam a sua afinidade pela água, facilitando, assim, a eliminação do produto após o seu enxágue; e o cocoilglutamato de sódio (CGS), derivado da síntese de aminoácido e óleo de coco, ele é considerado um tensoativo aniônico mais suave por causa menor irritabilidade.

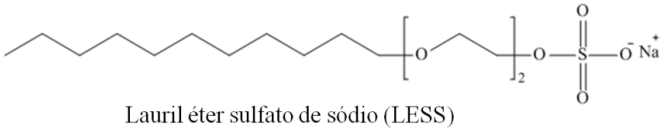
Figura 5 – Estrutura química dos tensoativos aniônicos estudados



Dodecil sulfato de sódio (SDS)



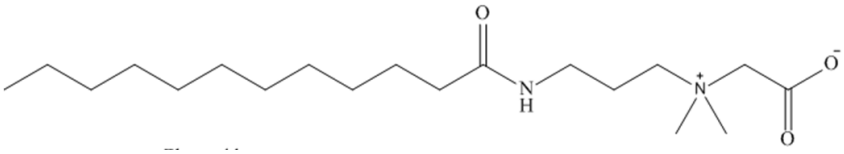
Cocoil glutamato de sódio (CGS)
COR representa o ácido graxo derivado do óleo de coco



Lauril éter sulfato de sódio (LESS)

Os tensoativos anfóteros apresentam tanto características aniônicas quanto catiônicas, de acordo com o pH do meio em que estão solubilizados (CORRÊA, 2012). Os representantes desse grupo são supostamente menos agressivos que os aniônicos e, por isso, são utilizados em combinação para melhorar a suavidade do produto, além de terem um alto poder de limpeza e de espuma, doador de viscosidade, atividade antimicrobiana moderada e compatibilidade com diferentes pHs. Eles são largamente empregados em produtos cosméticos e de higiene, como soluções de limpeza, hidratante corporal com enxágue, gel de banho, shampoos, produtos de barbear, dentre outros (CORAZZA et al., 2010). O representante estudado dessa classe foi a cocoamidopropilbetaína (CAB) (Figura 6), por estar presente em grande parte das formulações cosméticas e ser compatível com as outras classes de tensoativos.

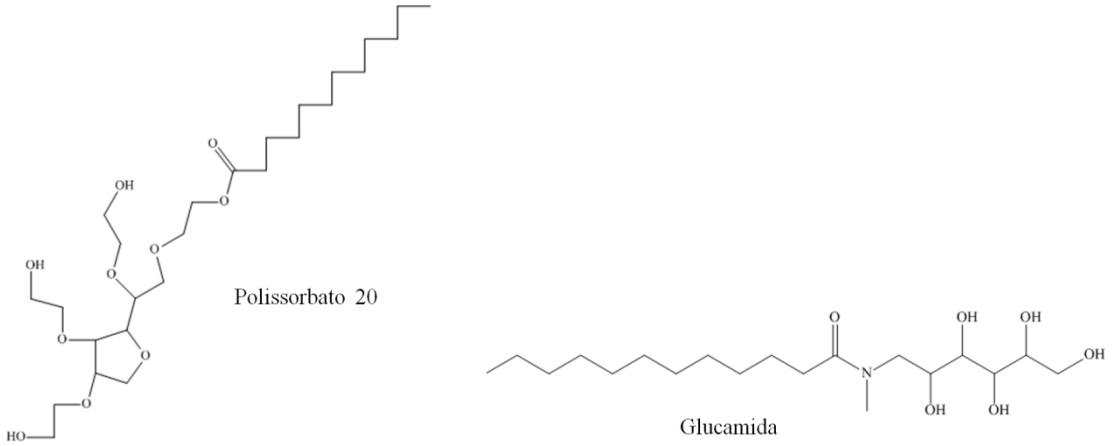
Figura 6 – Estrutura química do tensoativo anfótero cocoamidopropilbetaína (CAB)



Já os tensoativos não iônicos não apresentam carga elétrica no grupamento hidrofílico, tem baixo poder de limpeza e de espuma, além de uma baixa toxicidade e, por isso, são considerados os tensoativos mais suaves. Esses compostos são utilizados como cotensoativos e espessantes em shampoos e como emulsionantes em cremes hidratantes e loções de limpeza facial (CORAZZA et al., 2010; CORRÊA, 2012). Os representantes estudados dessa classe foram o capriloil/caproil metil glucamida (CCMG, GlucoTain Clear®, Clariant) (Figura 7), o qual tem proposta de ser mais suave / menos irritante nas formulações cosméticas e de higiene, e, ainda, o polissorbato 20 (Figura 7), que, apesar de não ser tão empregado nos produtos cosméticos e de higiene quando comparado aos outros tensoativos, ele foi utilizado

como um padrão dessa classe, pois este tensoativo apresenta mais dados de toxicidade ocular descritos na literatura (HAYASHI, 2012; OECD, 2013).

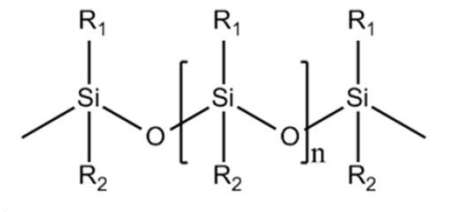
Figura 7 – Estrutura química dos tensoativos não iônicos estudados



2.6 Silicones

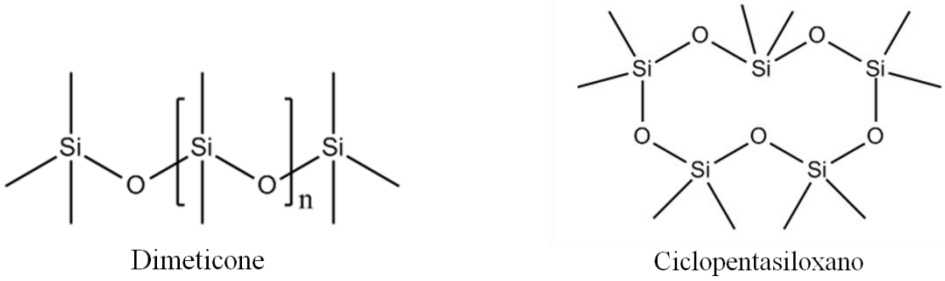
Os silicones são compostos semiorgânicos que apresentam em sua cadeia principal o silício combinado, principalmente, com o oxigênio (Figura 8). Por serem polímeros quimicamente inertes, os silicones permitem combinações com outras substâncias sem perder as suas características. Além disso, esses compostos apresentam alta estabilidade térmica, baixa tensão superficial, compatibilidade biológica e propriedades emolientes, tornando-os alvo de interesse da indústria química, farmacêutica e cosmética (CORRÊA, 2012).

Figura 8 – Estrutura química geral dos silicones



O dimeticone é uma mistura de polímeros lineares de siloxanos metilados e fechados com unidades de trimetilsiloxanos nas extremidades (Figura 9). Esse silicone apresenta propriedade antiespumante, redução da sensação de oleosidade e pegajosidade, boa espalhabilidade e rápida secagem quando aplicado à pele. O dimeticone é utilizado em diversos cosméticos como cremes, shampoos, condicionadores e pó compacto para maquiagem (CORRÊA, 2012).

Figura 9 – Estrutura química dos silicones estudados: dimeticone e ciclopentasiloxano



O ciclopentasiloxano é um silicone volátil composto por 5 grupos dimetilsiloxano em seu ciclo (Figura 9). Esse silicone apresenta as seguintes características: bom efeito condicionador para os cabelos e ação emoliente para a pele, baixa pegajosidade, toque seco e pouco efeito residual sob o local de aplicação. O ciclopentasiloxano está presente em formulações cosméticas como, por exemplo, cremes, demaquilantes, máscara para cílios e condicionadores (JOHNSON et al., 2011).

Tanto o dimeticone quanto o ciclopentasiloxano são considerados com baixo potencial irritante em estudos *in vivo*, porém não há dados relacionados com estudos utilizando métodos alternativos. Dessa forma, eles foram selecionados para serem avaliados pelos métodos propostos no presente trabalho para compor a estratégia de avaliação do potencial de irritação ocular.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Propor uma estratégia para a avaliação do potencial de irritação ocular de alguns tensoativos e silicones utilizados na fabricação de produtos cosméticos para o cabelo (shampoos), área dos olhos e rosto (demaquilantes e cremes), utilizando métodos alternativos à experimentação animal.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliação do potencial de irritação ocular, por meio dos ensaios de HET-CAM e BCOP, dos tensoativos dodecil sulfato de sódio (SDS), lauril éter sulfato de sódio (LESS), polissorbato 20, cocoilglutamato de sódio (CGS), cocoamidopropilbetaína (CAB) e capriloil/caproil metil glucamida (CCMG) e dos silicones dimeticone e ciclopentasiloxano;
- Avaliação histopatológica das córneas utilizadas no ensaio de BCOP;
- Classificação das substâncias teste quanto à toxicologia ocular;
- Proposição de uma estratégia que contemple diferentes métodos para a avaliação do potencial de irritação ocular.

4. Material e Métodos

4.1 Material

4.1.1 Ingredientes cosméticos

- Capriloil/Caproil Metil Glucamida (CCMG, INCI name: *Capryloyl / Caproyl Methyl Glucamide*), GlucoTain® Clear, Clariant, Alemanha (de pureza: 50%)
- Ciclopentasiloxano (INCI name: *Ciclopentasiloxane*), Xiameter® PMX-245, Dow Corning, Reino Unido (pureza: 90-100%)
- Cocoamidopropilbetaína (CAB, INCI name: *Cocamidopropyl Betaine*), Genagen® CAB-CM, Clariant, Brasil (pureza: 29-31%)
- Cocoilglutamato de sódio (CGS, INCI name: *Sodium Cocoyl Glutamate*), Hostapon® CCG, Clariant, Brasil (pureza: 33%)
- Dimeticone (INCI name: *Dimethicone*), Xiameter® PMX-200 Silicone Fluido 50 CST, Dow Corning, EUA (pureza: 100%)
- Lauril éter sulfato de sódio (LESS, INCI name: *Sodium Laureth Sulfate*), Synth, Brasil (pureza: 26-28%)
- Lauril sulfato de sódio ou dodecil sulfato de sódio (SDS, INCI name: *Sodium Lauryl Sulfate*), Synth, Brasil (pureza: 90%)
- Polissorbato 20 (INCI name: *Polysorbate 20*), Tween 20®, USB Corporation, EUA (pureza 100%)

Tabela 2 – Descrição dos ingredientes cosméticos relacionando o seu tipo, a sua classificação GHS para irritação ocular e o seu valor de pH

Ingrediente cosmético	**Tipo**	**Classificação GHS***	**pH***
SDS	Tensoativo aniônico	Categoria 1	7 - 10
LESS	Tensoativo aniônico	Categoria 2A	7 – 9
CGS	Tensoativo aniônico	Categoria 2B	5,5 – 7
CAB	Tensoativo anfótero	Categoria 1	4 – 5
CCMG	Tensoativo não iônico	Categoria 1	8 – 9,5
Polissorbato 20	Tensoativo não iônico	Sem categoria	6 – 8
Dimeticone	Silicone não volátil	Sem categoria	-
Ciclopentasiloxano	Silicone volátil	Sem categoria	-

*Basead0 na Ficha de Segurança do Produto Químico (FISPQ)
- Sem informação

4.1.2 Reagentes

- Água deionizada
- Álcool absoluto, Merck, Alemanha
- Álcool etílico, PA, Synth, Brasil
- Cloreto de sódio, Synth, Brasil
- Eosina
- Fluoresceína de sódio
- Formaldeído, Merck, Alemanha
- Hematoxilina de Harris
- Meio de cultura *Eagle's Minimum Essential Medium*
- Meio de montagem, Tissue Mount - Tissue Tek®, Sakura Finetek, EUA
- Parafina, Merck, Alemanha
- Solução tampão fosfato de sódio
- Solução tampão *Hanks' Balanced Salt Solution*
- Xilol, Merck, Alemanha

4.1.3 Equipamentos e acessórios

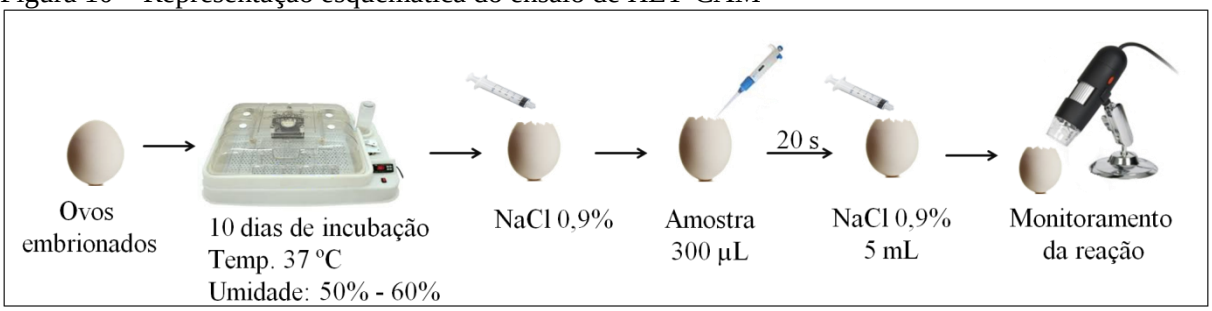
- Balança analítica PA214CP, Ohaus Corporation, EUA
- Balança eletrônica BL3200H, Marte, Brasil
- Banho-maria SL-150, Solab, Brasil
- Chapa de aquecimento modelo V.V., Olidef CZ, Brasil
- Chocadeira automática digital, Golden, Brasil
- Espectrofotômetro UV/VIS SpectraMax M5, Molecular Devices, EUA
- Estufa ECB 1.2 digital, Odontobras, Brasil
- Inclusor de parafina EG1160, Leica, Alemanha
- Micrótomo RM 2065, Leica, Alemanha
- Microscópio DM 5000 B acoplado à câmera DFC 295, Leica, Alemanha, e software LAS 4.0
- Microscópio USB digital DigiMicro 2.0 Scale, Alemanha, e software Debut Video Capture
- Opacitômetro OP-KIT, Electro Design, França
-

4.2 Métodos

4.2.1 Avaliação do potencial de irritação ocular pelo ensaio de HET-CAM

O estudo foi realizado em ovos embrionados de galinha da raça Leghorn no décimo dia de incubação, segundo o protocolo proposto por Luepke (1985) e Luepke e Kemper (1986), conforme mostrado na Figura 10.

Figura 10 – Representação esquemática do ensaio de HET-CAM



Fonte: Autoria própria.

Os ovos foram mantidos em chocadeira a 37ºC, umidade relativa de 50-60%, com ventilação interna e sistema automático de viragem de ovos com movimentos rotativos a cada 30 minutos para assegurar que o embrião não ficasse aderido à parede do ovo. Para a realização do ensaio, inicialmente parte da casca do ovo foi removida e, a seguir, a membrana externa foi umidificada com uma solução de NaCl 0,9% e foi cuidadosamente removida de forma que a membrana cório-alantóide (CAM) ficasse exposta. Em seguida, foram aplicados 300 µL de cada substância sem diluição ou diluída em água deionizada, conforme apresentado a seguir:

- SDS 1%
- LESS 27%, 10%, 7% e 1%
- CGS 3% e 1,5%
- CAB 3% e 1,5%
- Polissorbato 20 a 100% e 10%
- CCMG 3% e 1,5%
- Dimeticone 100%
- Ciclopentasiloxano 100%

Após 20 segundos, a CAM foi lavada com 5 mL de solução de NaCl 0,9% e as possíveis reações foram monitoradas durante 5 minutos com o auxílio de um microscópio USB e um software de gravação das imagens para análise posterior.

Todos os sinais de hiperemia (Hip), hemorragia (Hem) e coagulação (Coag) foram registrados, caso ocorressem. Cada amostra foi analisada em quadruplicada em, no mínimo, dois ensaios independentes. O tempo de cada evento vascular foi registrado em segundos, conforme Tabela 3 e para o cálculo do escore de irritação (*mean score* - MSc) foi utilizada a equação 1, onde os números subscritos indicam a replicata avaliada:

$$MSc = \frac{(Hip_1+Hem_1+Coag_1) + (Hip_2+Hem_2+Coag_2) + (Hip_3+Hem_3+Coag_3) + (Hip_4+Hem_4+Coag_4)}{4} \quad (1)$$

A seguir, os escores de irritação obtidos foram analisados e classificados segundo o potencial de irritação ocular oferecido por cada amostra, que corresponde à gravidade das reações adversas observadas na CAM do ovo embrionado, segundo a Tabela 4. Os escores de irritação obtidos foram ainda comparados com o controle positivo e com o controle negativo. Como controle negativo foi utilizada uma solução de NaCl 0,9% e como controle positivo uma solução de SDS 1%.

As concentrações utilizadas das substâncias teste foram baseadas nas recomendações do ensaio proposto por Luepke e Kemper (1986) e nas concentrações encontradas em produtos cosméticos. Já o dimeticone e ciclopentasiloxano foram testados sem diluição para observar o que eles causariam na CAM nesta forma e caso ocasionassem alguma reação, eles seriam diluídos.

Tabela 3 - Tempo em segundos relacionado com cada fenômeno vascular

Fenômeno	**Tempo**		
	t ≤ 30 s	**30 s < t ≤ 2**	**2 min < t ≤ 5 min**
Hiperemia	5	3	1
Hemorragia	7	5	3
Coagulação	9	7	5

Fonte: Adaptado de Luepke e Kemper, 1986.

Tabela 4 - Escore de irritação (MSc) e sua respectiva classificação de irritação no HET-CAM

Escore de Irritação (MSc)	**Classificação de irritação**
MSc < 1	Não irritante
1 ≤ MSc < 5	Irritante leve
5 ≤ MSc < 9	Irritante moderado
MSc ≥ 9	Irritante severo

Fonte: Adaptado de Luepke e Kemper, 1986.

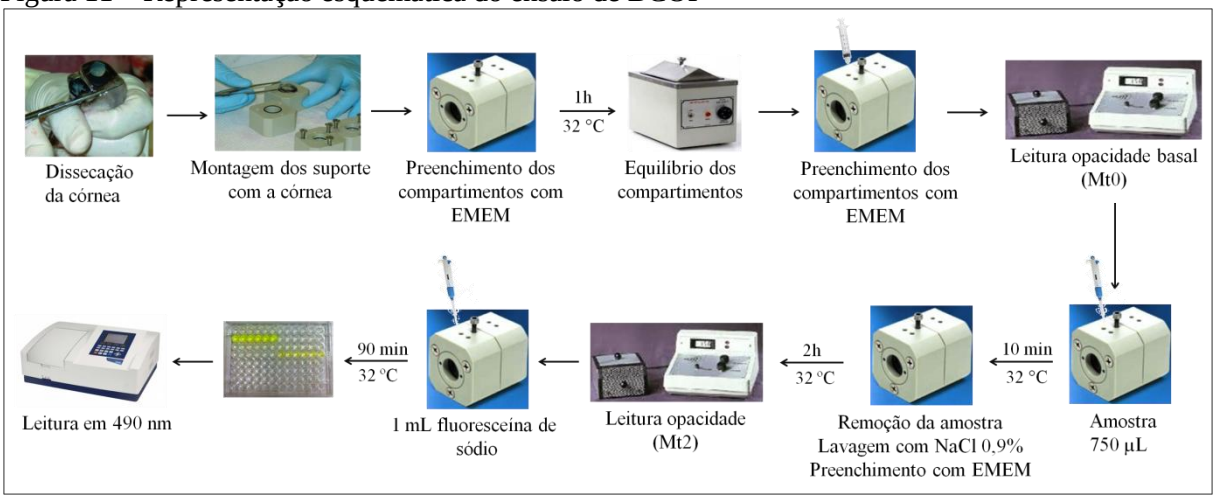
4.2.2 Avaliação do potencial de irritação ocular pelo ensaio de BCOP

O ensaio de BCOP foi realizado nas instalações do Instituto de Pesquisa Invitrocell, grupo Investiga, Paulínia - SP, Brasil, de acordo com o protocolo OECD TG 437 (OECD, 2013), esquematizado na Figura 11. As substâncias teste foram diluídas em solução fisiológica (NaCl 0,9%) ou aplicadas sem diluição:

- SDS 10% e 1%
- LESS 10% e 7%
- CGS 3% e 1,5%
- CAB 3% e 1,5%
- Polissorbato 20 a 10%
- CCMG 3% e 1,5%
- Dimeticone 100%
- Ciclopentasiloxano 100%

As concentrações utilizadas das substâncias teste foram baseadas em concentrações encontradas em produtos cosméticos e/ou recomendadas pelo fabricante das matérias-primas, sendo que, para a classe dos tensoativos, a concentração máxima permitida no presente ensaio é de 10%. Já o dimeticone e ciclopentasiloxano foram testados sem diluição para observar o que eles causariam na córnea nesta forma e caso provocassem alguma alteração, eles seriam diluídos.

Figura 11 – Representação esquemática do ensaio de BCOP



Fonte: Autoria própria.

4.2.2.1 Preparo dos olhos

Os olhos foram recolhidos no Frigorífico Cow Pig, Boituva – SP, Brasil, lavados em solução salina de NaCl 0,9%, imersos e transportados em solução de *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS) gelada, com penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 µg/mL). Após análise visual, as córneas, livres de defeitos, foram dissecadas e foi deixada uma área de cerca de 2-3 mm de esclera para facilitar o manuseio. A córnea isolada foi montada em um suporte que consiste em dois compartimentos (superior e inferior), com o epitélio e o endotélio voltados, respectivamente, para os compartimentos superior e inferior. Ambos os compartimentos foram preenchidos com *Eagle's Minimum Essential Medium* (EMEM), pré-aquecido, de maneira que não houvesse formação de bolhas. Em seguida, a temperatura do dispositivo foi equilibrada a 32°C em banho-maria durante uma hora. Após este período, novo EMEM pré-aquecido foi adicionado em ambos os compartimentos e foi realizada a leitura da opacidade basal (Mt0) para cada córnea em um opacitômetro. As córneas com opacidade basal maior que 7 foram descartadas. Para verificar a integridade do sistema de ensaio foi incluído simultaneamente em cada experimento, um controle negativo (NaCl 0,9%) e um positivo (etanol 100%).

4.2.2.2 Aplicação da substância teste e determinação da opacidade e permeabilidade

No compartimento superior foram aplicados 750 µL de substância teste para cobrir o lado epitelial da córnea, a qual ficou exposta à mesma durante 10 minutos a 32°C. Em seguida, a substância teste foi removida e a córnea foi lavada com NaCl 0,9% pelo menos duas vezes. Posteriormente, o compartimento superior foi preenchido com EMEM e as córneas foram incubadas a 32 ºC por mais 2 horas. Ao final deste período, a opacidade foi medida novamente (Mt2). O valor de opacidade final corrigido (Mopt) de cada substância testada foi calculado segundo a equação 2:

$$Mopt = (Mt2 - Mt0) - Mopt\ \text{média do controle negativo} \qquad (2)$$

Posteriormente, para a medida da permeabilidade, 1 mL de solução de fluoresceína de sódio (4 mg/mL) foi adicionada ao compartimento superior do suporte (lado epitelial da córnea), enquanto que o compartimento inferior (lado endotelial da córnea) foi preenchido com novo EMEM. Em seguida, o suporte com a córnea foi incubado a 32 °C durante 90 minutos. Posteriormente, o meio presente no compartimento inferior, contendo fluoresceína que atravessou a córnea, foi recolhido e distribuído em placa de 96 poços (360µL/poço). A

absorbância das soluções presentes nessas placas foi lida em espectrofotômetro UV/VIS no comprimento de onda de 490 nm, sendo registrados os valores de densidade óptica (DO 490). A permeabilidade final corrigida ($P_{(DO490)}$) de cada substância testada foi calculada de acordo com a equação 3:

$$P_{(DO\ 490)} = (\text{média do tratamento} - \text{média do branco}) - \text{média do controle negativo} \quad (3)$$

As medidas de opacidade e permeabilidade da córnea foram utilizadas para o cálculo do escore de irritação *in vitro (in vitro irritance score – IVIS)* utilizando a equação 4:

$$\text{IVIS} = \text{valor médio de opacidade} + (15\text{x valor médio de permeabilidade DO490}) \quad (4)$$

Os IVIS obtidos foram analisados e classificados segundo o potencial de irritação ocular oferecido por cada amostra (Tabela 4).

Tabela 5 - Escore de irritação *in vitro* (IVIS) com sua respectiva categoria de irritação no BCOP

IVIS	**Categoria de irritação pelo sistema UN GHS***
≤ 3	Sem categoria
> 3; ≤ 55	Nenhuma predição pode ser feita ou Sem predição
> 55	Categoria 1

Fonte: Adaptado de OECD, 2013.
*United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (UN, 2015)

4.2.3 Análise estatística

Os valores de escore final do ensaio de HET-CAM, opacidade e permeabilidade do ensaio de BCOP apresentaram distribuição normal no Teste de Normalidade de Anderson-Darling e, por isso, foram submetidos a tratamento estatístico pelo teste de Análise de Variância (ANOVA) e teste complementar de Tukey. Os valores de $p<0,05$ foram considerados significativos. Todos os cálculos foram realizados usando o software estatístico Minitab 17.

4.2.4 Confecção das lâminas histológicas

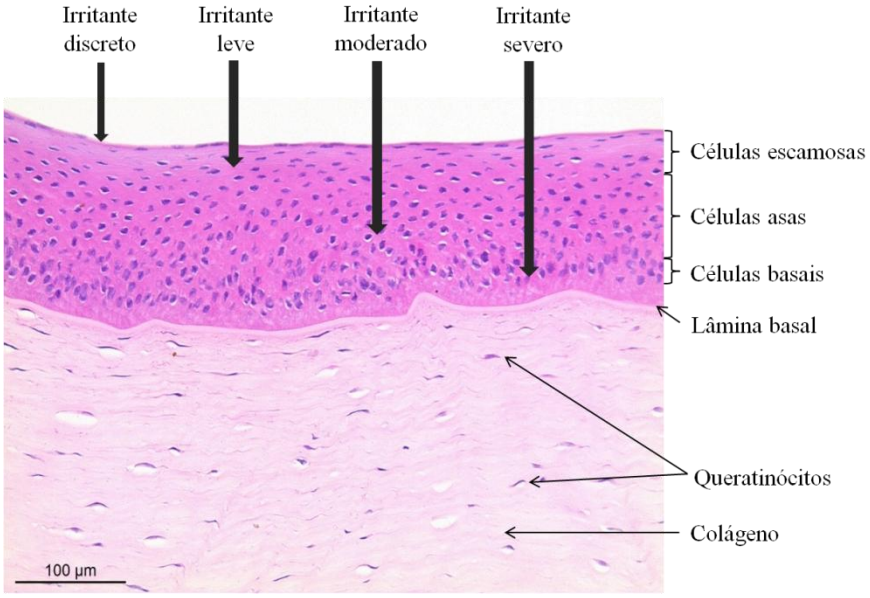
Após a finalização do ensaio de BCOP, as córneas foram imersas em solução de formalina 10% por, pelo menos, 8h. Em seguida, as córneas foram cortadas ao meio, transferidas para uma solução de etanol 70% e, posteriormente, desidratadas gradualmente em etanol 80%, 90%, 95% e etanol absoluto, clarificadas em xilol e incorporadas em parafina. As

duas metades de cada córnea foram emblocadas em um único bloco de parafina. Em seguida, com o micrótomo, as córneas foram seccionadas a 5 µm, transversalmente, a partir da área central do tecido, os cortes foram colocados sobre lâminas contendo albumina de Mayer (clara de ovo + glicerina + timol) e, depois, transferidas para estufa à 70°C para retirar o excesso de parafina. Em seguida, as lâminas com os cortes passaram pelos banhos de desparafinização e hidratação em xilol, etanol absoluto, etanol 95%, 90%, 80%, 70% e 50%. Posteriormente, elas foram coradas com hematoxilina e eosina, lavadas em etanol 95% acetificado 1% e imersas em banhos de desidratação em etanol 95%, etanol absoluto e xilol. As lâminas com os cortes foram, então, montadas utilizando o meio de montagem Tissue mount - Tissue Tek® para fixar a lâmina à lamínula e, depois de secas, elas foram limpas com clorofórmio.

4.2.5 Avaliação histopatológica

As imagens dos cortes histológicos foram obtidas em microscópio e utilizando o software LAS 4.0 para obtenção das imagens. Todas as imagens foram analisadas quanto à ausência ou presença de alterações histopatológicas no epitélio, no estroma e no endotélio (Figura 12).

Figura 12 – Esquema representativo do potencial de irritação ocular de uma substância química aplicada na córnea bovina de acordo com a localização da lesão no epitélio



Fonte: Autoria própria.

Em vista disso, o potencial de irritação de cada substância teste foi classificado de acordo com a localização das lesões provocadas no epitélio (Tabela 6), bem como as lesões

provocadas no estroma com base na extensão de feixes de colágeno soltos e inchaço dos queratinócitos (Tabela 7) (FURUKAWA et al., 2015).

Tabela 6 – Classificação do potencial de irritação de uma substância química de acordo com a profundidade das lesões encontradas no epitélio da córnea bovina

Classificação de irritação	**Localização das lesões no epitélio**
Não irritante	Ausente
Irritante discreto	Células escamosas
Irritante leve	Entre as células escamosas e as células asas superiores
Irritante moderado	Entre as células escamosas e as células asas inferiores
Irritante severo	Células basais

Fonte: Adaptado de FURUKAWA et al., 2015.

Tabela 7 – Classificação do potencial de irritação de uma substância química de acordo com a profundidade das lesões encontradas no estroma da córnea bovina

Classificação de irritação	**Localização das lesões no estroma**
Irritante leve	Matriz de colágeno que se estende até 1/3 superior do estroma
Irritante moderado	Matriz de colágeno que se estende até 2/3 do estroma
Irritante severo	Matriz de colágeno que se estende até 1/3 inferior do estroma e/ou danos nas células endoteliais

Fonte: Adaptado de FURUKAWA et al., 2015.

5. Resultados e Discussão

5.1 Avaliação do potencial de irritação ocular pelo ensaio HET-CAM

Inicialmente foi realizada a observação de cada um dos eventos ocorridos na CAM, por análise dos efeitos do controle negativo (Figura 13) e positivo (Figura 14), para posterior comparação dos efeitos induzidos pelas substâncias teste. Levando em consideração que o SDS apresenta elevada irritabilidade (GHS categoria 1) e que o seu uso em produtos cosméticos limita-se a no máximo 1% (CIR, 1983), optou-se por utilizar essa porcentagem no estudo, coincidindo com a solução usada como controle positivo. A solução de SDS 1% ocasionou na CAM mais de uma reação (hiperemia e hemorragia), porém a mais evidenciada foi a hemorragia, caracterizada por pequenos sangramentos (Figura 14). No ensaio de HET-CAM, o SDS 1% apresentou MSc igual a 12,00, sendo classificado como irritante severo (Tabela 8), o que está de acordo com o descrito na literatura (ICCVAM, 2006b).

Após a aplicação do lauril éter sulfato de sódio (LESS) nas concentrações de 27%, 10% e 7% sobre a CAM foram observados os fenômenos hiperemia, hemorragia e coagulação, sendo os dois últimos mais notados (Figura 15A, B e C respectivamente), obtendo-se MSc igual a 17,85; 15,25 e 15,50, respectivamente, sendo assim considerado irritante severo nestas três concentrações. Após a aplicação de LESS 1%, a CAM apresentou apenas sinais de hiperemia e hemorragia (Figura 15D) e MSc de 9,00, sendo, assim, também considerado irritante severo, porém com valor estatisticamente diferente ($p<0,05$) das concentrações maiores (27%, 10% e 7%) (Tabela 8). Mehling e colaboradores (2007) quando avaliaram o LESS a 3% no HET-CAM, também concluíram que essa substância era irritante severo nessa condição.

Apesar de o LESS ser classificado como irritante nas diferentes concentrações, nota-se a diferença de intensidade das reações vasculares, qualitativamente, por meio das imagens (Figura 15), ou seja, o LESS 7% apresentou coagulação mais leve do que quando aplicado a 10%, apesar de apresentarem o mesmo MSc. Quando se analisa somente o escore de coagulação, observa-se que o LESS 27% provocou um escore maior (escore médio de coagulação: 7) que o LESS 10% e 7% (escore médio de coagulação: 5) (Figura 22) (Apêndice A). Já em relação ao LESS 1%, observa-se que o seu MSc igual a 9,00, foi estatisticamente diferente ($p<0,05$) das demais concentrações avaliadas (27%: 17,85; 10%: 15,25 e 7%: 15,50) (Tabela 8), e ele não provocou coagulação que é um evento mais grave que os demais, mas ainda assim ele foi classificado como irritante severo. O modelo de predição proposto por Luepke (1985) não os classifica em diferentes categorias de irritação, pois se considera irritante um composto com MSc $\geq$ 9,00. Porém, foi possível observar, por meio das imagens,

a diferença nos eventos vasculares bem como a intensidade dos mesmos nas diferentes concentrações de LESS, demonstrando, com isso, a sensibilidade do ensaio de HET-CAM.

Em 2010, a *Cosmetic Ingredient Review* fez uma revisão dos estudos contemplando o LESS e publicou um artigo mostrando que, em estudos realizados com animais e humanos, foi observado que a irritação ocular pode ocorrer em consequência da utilização de formulações cosméticas contendo LESS, e que a gravidade da irritação parece aumentar conforme se aumenta a concentração de LESS na formulação; no entanto, este tensoativo é considerado seguro para uso em cosméticos (ROBINSON et al., 2010).

O cocoilglutamato de sódio (CGS) quando aplicado nas concentrações de 3% e 1,5% provocou na CAM reações de hiperemia e hemorragia, sendo esta última mais pronunciada, porém com intensidade diferente entre as diferentes concentrações (Figura 16A e B respectivamente), ou seja, a hemorragia foi mais intensa na concentração de 3% do que na concentração de 1,5%. O CGS foi classificado como irritante severo nessas concentrações (MSc = 12,00). Esta mesma classificação foi relatada pela *Cosmetic Ingredient Review* (CIR, 2014) quando o CGS foi testado a 5% no ensaio do HET-CAM, onde se obteve MSc = 13.

A aplicação de polissorbato 20 não diluído (100%) sobre a CAM resultou em sinais de hemorragia moderada (Figura 17A) e, em apenas duas replicadas, houve sinais de coagulação leve (Figura 22) (Apêndice A), sendo classificado como irritante severo (MSc = 9,71) (Tabela 8). Essa classificação também foi obtida por Hayashi e colaboradores (2012) no ensaio de HET-CAM para o polissorbato 100%. No entanto, no presente estudo, quando o polissorbato 20 foi diluído a 10%, a CAM apresentou apenas sinais leves de hemorragia (Figura 17B), sendo, assim, classificado como irritante moderado com MSc igual a 5,62, o qual foi estatisticamente diferente ($p<0,05$) do polissorbato 20 a 100% (Tabela 8). Dados da literatura mostram que, quando aplicado em olho de coelho, o polissorbato 20 a 10% foi considerado não irritante (OKAMOTO et al., 1999).

A diferença na classificação de irritabilidade entre a substância concentrada (100%) e diluída (10%) pode ser devido, também, a elevada viscosidade do polissorbato 20, que quando aplicado, não diluído, adere-se à CAM dificultando a sua remoção após a lavagem da mesma, o que faz com que o mesmo fique aderido à membrana por um tempo maior do que o estabelecido no teste, ocasionando, assim, a ruptura de vasos sanguíneos e, ainda, a geração de sinais mais intensos de hemorragia (VINARDELL; MACIÁN, 1994). Essa dificuldade na remoção do polissorbato 20 da CAM pode ter levado à ocorrência de coagulação em algumas replicatas (Apêndice A) e, ainda, à alta variação dos resultados obtidos para esse fenômeno (Figura 22).

Quanto à irritação provocada pelo CCMG, ambas as concentrações aplicadas, 3% e 1,5%, ocasionaram na CAM sinais de hiperemia e, notadamente, hemorragia (Figura 18A e B respectivamente) com uma intensidade bem maior na concentração de 3%. Mesmo com intensidades diferentes entre as duas concentrações, o CCMG foi classificado como irritante severo (MSc = 12,00), pois os tempos de aparecimento dos eventos vasculares, nos dois casos, foram nos primeiros 30s de observação após a aplicação das amostras (Apêndice A). Por se tratar de um tensoativo novo no mercado, não há artigos publicados relacionados à toxicidade ocular desse agente, no entanto, há a FISPQ (Ficha de Informações de Segurança do Produto Químico), informando que se trata de um produto GHS categoria 1 (irritante severo), o que foi demonstrado no presente ensaio, onde foi possível observar o seu potencial efeito irritante sobre a CAM e, de maneira qualitativa, a intensidade desse efeito mesmo em pequenas concentrações (Figura 22).

Após a aplicação de CAB 3% sobre a CAM, houve o aparecimento de hemorragia e coagulação (Figura 19A), enquanto que o CAB 1,5% provocou o aparecimento de hemorragia e sinais discretos de coagulação (Figura 19B). Quando se analisa somente o escore de coagulação (Figura 22), observa-se que o CAB 3% provocou coagulação mais intensa (escore médio de coagulação: 7) que o CAB 1,5% (escore médio de coagulação: 4,25) (Apêndice A), sendo essa diferença estatisticamente diferente ($p<0,05$) entre si (Figura 22). O MSc do CAB foi de 19,00 (CAB 3%) e de 15,62 (CAB 1,5%), valores considerados estatisticamente diferentes ($p<0,05$) entre si (Tabela 8), entretanto ambas as concentrações avaliadas foram classificadas na mesma categoria, ou seja, irritante severo. Estudos em animais demonstraram que o CAB, em diferentes concentrações, inclusive a 3%, provoca alterações principalmente na conjuntiva, podendo afetar a córnea também. Por isso, ele é considerado um potente irritante ocular (BURNETT et al., 2012).

Já o dimeticone não causou nenhum evento vascular na CAM (Figura 20), sendo, por isso, classificado como não irritante (Tabela 8). Embora nenhum fenômeno tenha sido observado *in vitro*, na revisão publicada pela *Cosmetic Ingredient Review* em 2003, o dimeticone foi testado *in vivo* em diferentes concentrações e estudos, em olho de coelho, sendo que a irritação na conjuntiva foi a reação mais comum na maioria dos estudos e esse tipo de evento desapareceu após 24h. Consequentemente, o dimeticone foi considerado um irritante leve (NAIR et. al, 2003).

O ciclopentasiloxano também não ocasionou nenhum evento vascular na CAM (Figura 21). O Comitê Científico de Segurança ao Consumidor (*Scientific Committee on Consumer Safety*, SCCS) da Comunidade Europeia emitiu um documento a respeito do uso de

ciclopentasiloxano em produtos cosméticos, no qual há relatos de alguns estudos *in vivo*, que aplicaram essa substância pura em olhos de coelhos e verificaram que ela ocasionou um dano transitório mínimo na conjuntiva ocular dos mesmos. Com isso, o SCCS considerou que ciclopentasiloxano é uma substância com baixo potencial de irritação ocular (SCCS, 2015).

Essa diferença de resultados *in vitro* e *in vivo* pode ser porque o teste de Draize pode gerar resultados falsos positivos (WILHELMUS, 2001) e a classificação GHS é baseada neste teste (UN, 2015). Além disso, Hayashi e colaboradores (2012) demonstraram que o ensaio de HET-CAM possui baixa porcentagem de falsos negativos (4-6%) e em outros estudos essa porcentagem foi de zero (ICCVAM, 2006b), ou seja, alta sensibilidade.

Assim, com base na literatura e nos resultados obtidos, o HET-CAM demonstrou ser um método sensível e adequado para a avaliação do potencial de irritação ocular de ingredientes cosméticos, uma vez que a membrana cório-alantóide apresenta alta sensibilidade quando em contato com a substância teste, o que é altamente recomendado para ensaios de produtos cosméticos, os quais não podem causar reações adversas ao consumidor. Adicionalmente, este ensaio se mostrou apto para uma análise de dose-resposta, como demonstrado na avaliação do LESS.

Dessa forma, apesar de possuir baixa especificidade, ou seja, alta porcentagem de falsos positivos (34-62%) (HAYASHI et al., 2012), o HET-CAM pode ser considerado um ensaio adequado como primeiro passo de uma estratégia para a avaliação da segurança de um ingrediente ou produto cosmético. Além disso, em alguns casos, o ensaio de HET-CAM permitiu distinguir, qualitativamente, quanto à intensidade dos eventos vasculares ocorridos na CAM quando foram aplicadas diferentes concentrações de uma mesma substância. Em outros casos, o escore individual de cada evento forneceu informações importantes para diferenciar o grau de irritação das substâncias avaliadas em diferentes concentrações.

Figura 13 - Membrana cório-alantóide antes (0s) e 30s, 2 min. e 5 min. após a aplicação de NaCl 0,9%

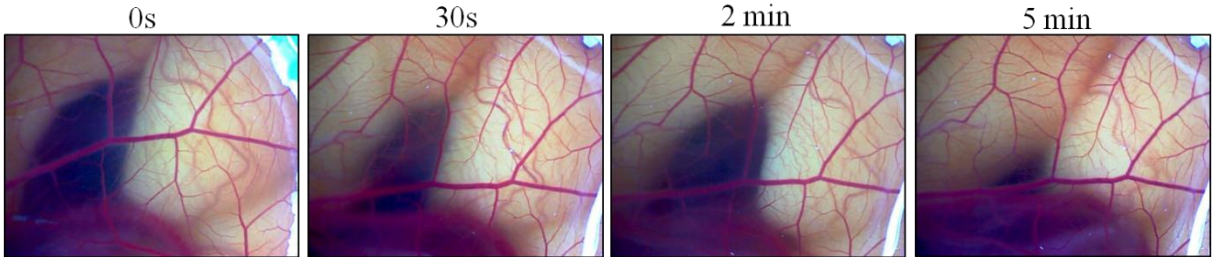


Figura 14 - Membrana cório-alantóide antes (0s) e 30s, 2 min. e 5 min. após a aplicação de SDS 1%, demonstrando os sinais de hemorragia (↑)

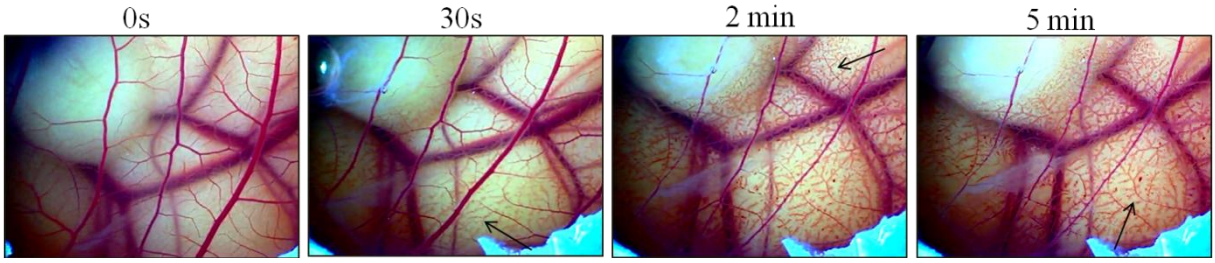
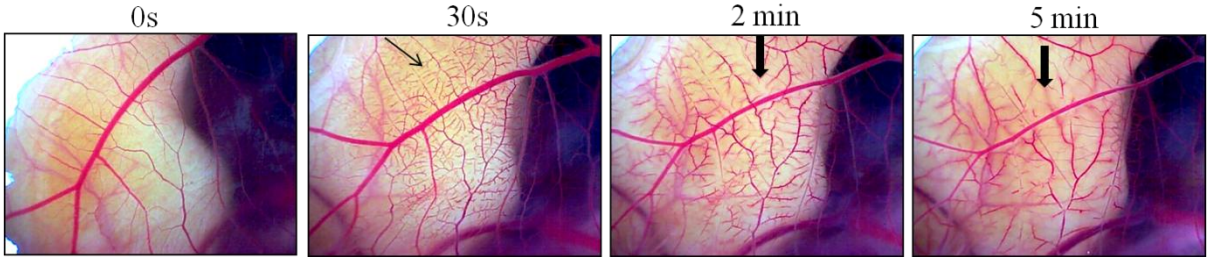
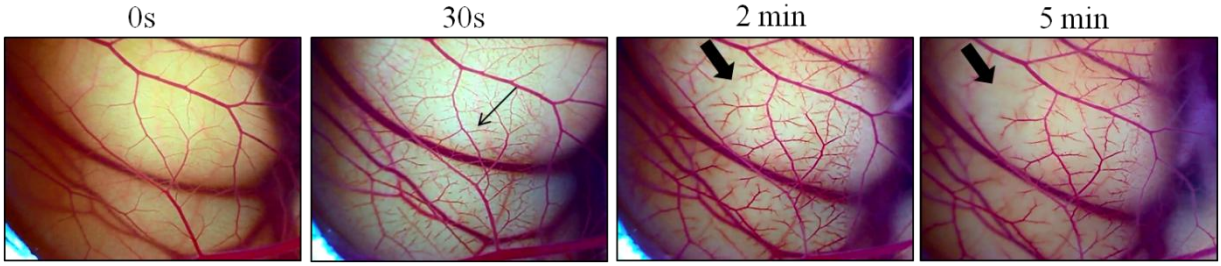


Figura 15 - Membrana cório-alantóide antes (0s) e 30s, 2 min. e 5 min. após a aplicação de LESS a 27% (A), 10% (B), 7% (C) e 1% (D), demonstrando os sinais de hemorragia (↑) e coagulação (🡅)

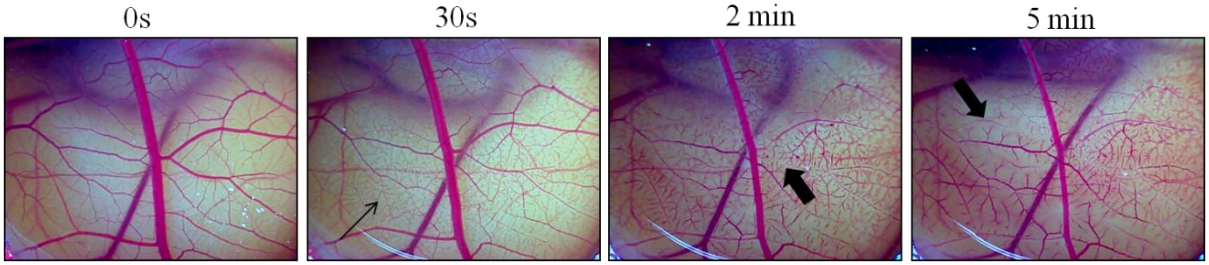
A) LESS 27%



B) LESS 10%



C) LESS 7%



D) LESS 1%

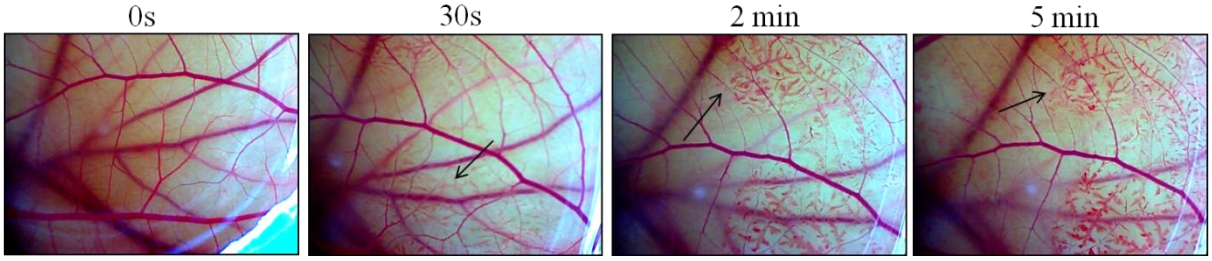
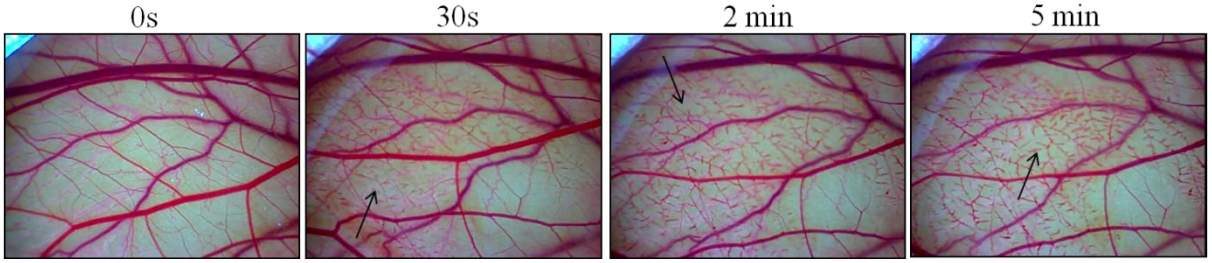


Figura 16 - Membrana cório-alantóide antes (0s) e 30s, 2 min. e 5 min. após a aplicação de CGS a 3% (A) e a 1,5% (B), demonstrando os sinais de hemorragia (↑)

A) CGS 3%



B) CGS 1,5%

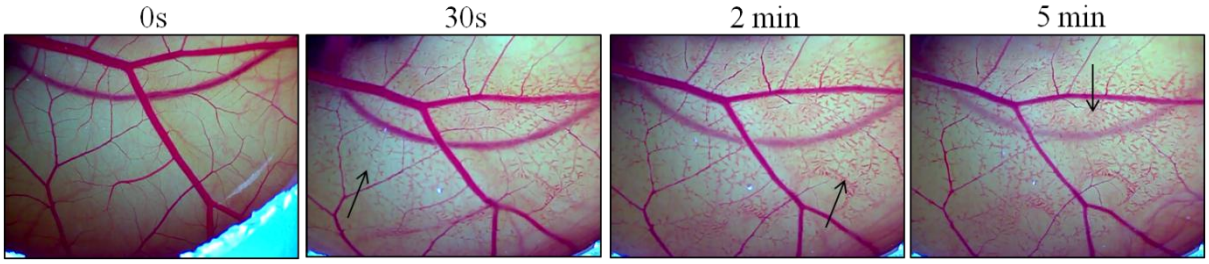
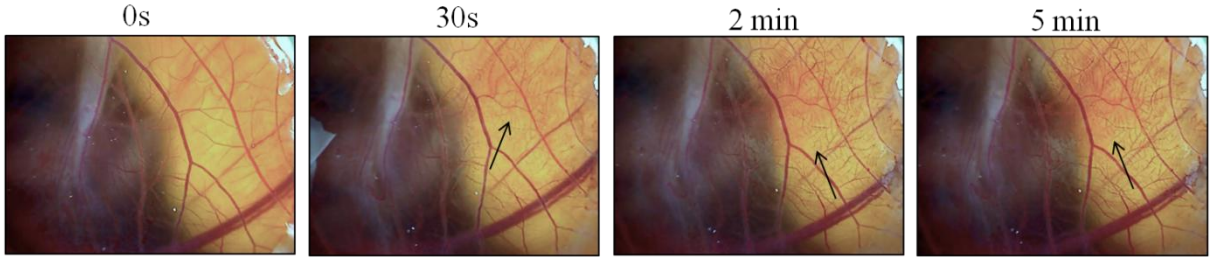


Figura 17 - Membrana cório-alantóide antes (0s) e 30s, 2 min. e 5 min. após a aplicação de polissorbato 20 a 100% (A) e 10% (B), demonstrando os sinais de hemorragia (↑)

A) Polissorbato 20 (100%)



B) Polissorbato 20 (10%)

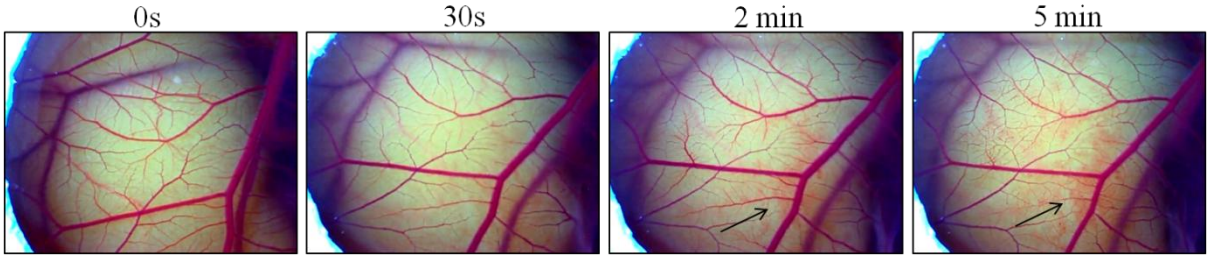
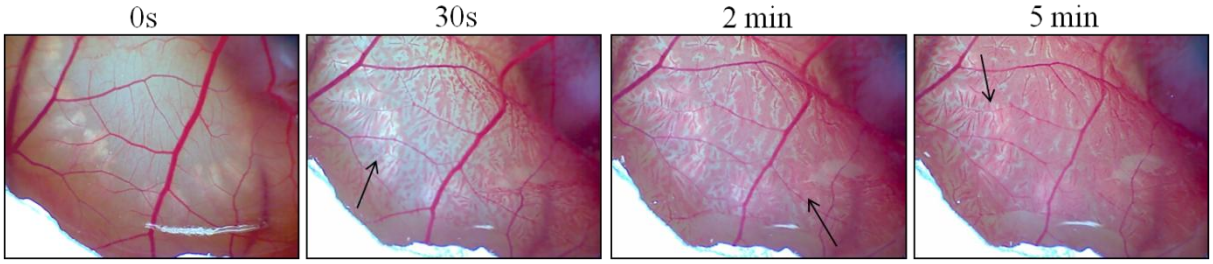


Figura 18 - Membrana cório-alantóide antes (0s) e 30s, 2 min. e 5 min. após a aplicação de CCMG a 3% (A) e a 1,5% (B), demonstrando os sinais de hemorragia (↑)

A) CCMG 3%



B) CCMG 1,5%

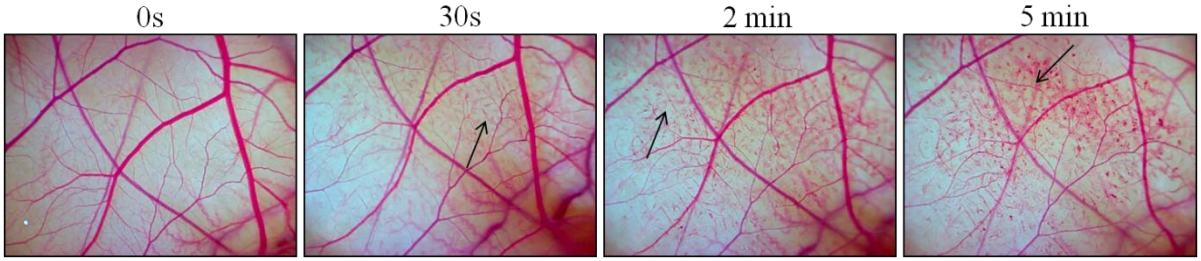
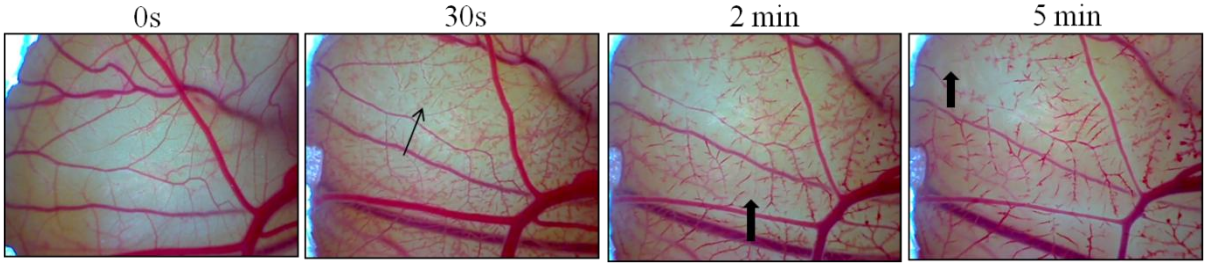


Figura 19 - Membrana cório-alantóide antes (0s) e 30s, 2 min. e 5 min. após a aplicação de CAB a 3% (A) e a 1,5% (B), demonstrando os sinais de hemorragia (↑) e coagulação (🡅)

A) CAB 3%



CAB 1,5%

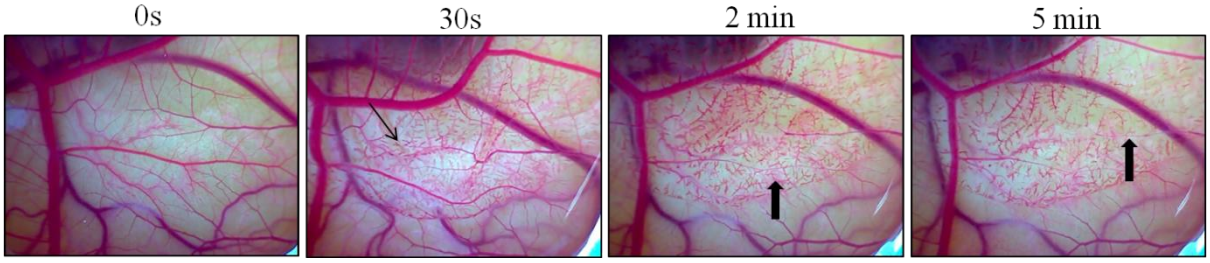


Figura 20 - Membrana cório-alantóide antes (0s) e 30s, 2 min. e 5 min. após a aplicação de dimeticone

Figura 21 - Membrana cório-alantóide antes (0s) e 30s, 2 min. e 5 min. após a aplicação de ciclopentasiloxano

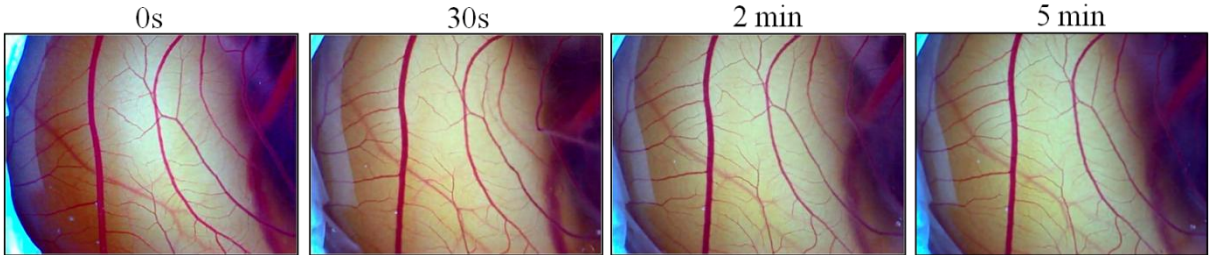
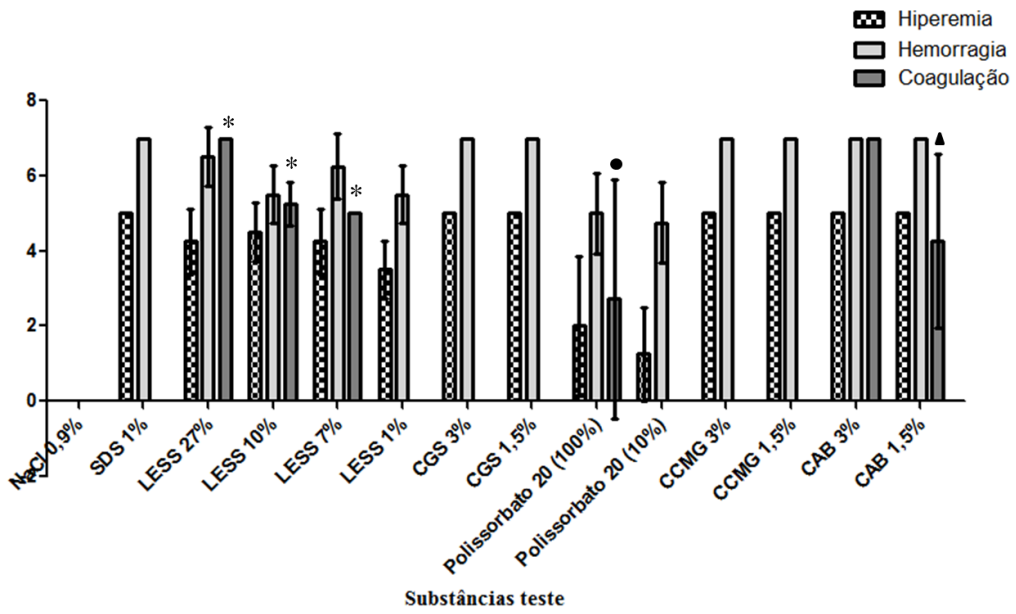


Tabela 8 – Média e desvio padrão dos valores de escore de irritação (MSc) e classificação das substâncias estudadas. N=8

Substâncias teste	Média do escore de irritação (MSc) ± Desvio padrão	Classificação de irritação
NaCl	0,00 ± 0,00	Não irritante*
SDS 1%	12,00 ± 0,00	Irritante severo***
LESS 27%	17,85 ± 1,95	Irritante severo***
LESS 10%	15,25 ± 1,28	Irritante severo***
LESS 7%	15,50 ± 2,07	Irritante severo***
LESS 1%	9,00 ± 1,85#	Irritante severo***
CGS 3%	12,00 ± 0,00	Irritante severo***
CGS 1,5%	12,00 ± 0,00	Irritante severo***
Polissorbato 20 (100%)	9,71 ± 2,43	Irritante severo***
Polissorbato 20 (10%)	5,62 ± 2,26##	Irritante moderado**
CCMG 3%	12,00 ± 0,00	Irritante severo***
CCMG 1,5%	12,00 ± 0,00	Irritante severo***
CAB 3%	19,00 ± 0,00	Irritante severo***
CAB 1,5%	15,62 ± 3,11###	Irritante severo***
Dimeticone 100%	0,00 ± 0,00	Não irritante*
Ciclopentasiloxano 100%	0,00 ± 0,00	Não irritante*

* Substâncias com MSc < 1
** Substâncias com 5 ≤ MSc < 9
*** Substâncias com MSc ≥ 9
# Estatisticamente diferente (p<0,05) do LESS 27%, 10% e 7%
Estatisticamente diferente (p<0,05) do Polissorbato 20 (100%)
Estatisticamente diferente (p<0,05) do CAB 3%

Figura 22 – Gráfico relacionando os diferentes eventos vasculares, hiperemia, hemorragia e coagulação, de acordo com a substância analisada no ensaio de HET-CAM. Barras: média ± IC 95%



* Estatisticamente diferente do LESS 1%
● Estatisticamente diferente do Polissorbato 20 (10%)
▲ Estatisticamente diferente do CAB 3%

5.2 Avaliação do potencial de irritação ocular pelo ensaio de BCOP

As córneas expostas à solução de NaCl 0,9% (controle negativo) não sofreram nenhuma alteração em sua opacidade (0,444) e permeabilidade (0,003), como já era esperado (IVIS = 0,489). Já a aplicação de etanol 100% (controle positivo) gerou alterações na opacidade (30,590) e na permeabilidade (2,103) das córneas expostas a essa substância (IVIS = 62,135), as quais estão dentro da faixa aceitável do ensaio (IVIS = 39,9 – 65,4) (ICCVAM, 2006a), sendo assim, classificado como categoria 1 ou irritante severo (IVIS > 55).

Quanto ao SDS 1%, ele provocou pequenas alterações na opacidade (3,250) e na permeabilidade (0,750) das córneas, as quais não foram estatisticamente diferentes ($p<0,05$) do controle negativo. O seu IVIS foi de 14,500, classificado, portanto, como sem predição (Tabela 9). Já o SDS a 10% produziu um aumento da opacidade (9,500) significativamente diferente ($p<0,05$) do controle negativo (0,444). Além disso, nessa concentração de 10%, o SDS provocou aumento da permeabilidade (2,250) estatisticamente diferente ($p<0,05$) em do controle negativo (0,003) e do SDS 1% (0,750) (Figura 23), obtendo IVIS igual a 43,250, e categoria de irritação sem predição nesse ensaio (Tabela 9). Apesar de o SDS ter sua classificação GHS categoria 1 (irritante severo), no presente ensaio nenhuma predição pode ser feita, uma vez que os valores de IVIS ficaram compreendidos na faixa, determinada pelo guia OECD TG 437, como sem predição (> 3 e ≤ 55). Essa diferença de classificação pode ser devido à destruição da camada epitelial da córnea pelo SDS, ocasionando valores baixos de opacidade, mas permitindo que a substância penetre nas camadas mais profundas da córnea (GAUTHERON et al., 1992), o que foi observado no estudo histopatológico apresentado no item 5.3.

Em relação ao LESS, tanto na concentração de 10% quanto de 7%, ele não foi capaz de causar alteração significativa na opacidade das córneas (0,750 e 3,750, respectivamente), porém ele causou alteração significativa ($p<0,05$) na permeabilidade (1,736 e 1,071, respectivamente) das mesmas, quando comparadas ao controle negativo (0,003) (Figura 23). Os IVIS dessa substância foram de 26,794 (LESS 10%) e de 19,815 (LESS 7%) (Tabela 9). O LESS, cuja classificação GHS é categoria 2, também foi classificado como sem predição no ensaio de BCOP (equivalente à GHS categoria 2, porém não incluso no modelo de predição devido às limitações do teste). Como este ensaio por si só não possui a sensibilidade necessária para distinguir entre substâncias que são pouco ou moderadamente irritantes (OECD, 2013), uma análise mais apurada foi realizada por meio do estudo histopatológico para determinar qual o grau e a profundidade da lesão ocasionada na córnea por essa substância para, então, ser classificada mais especificamente.

Já as córneas expostas ao CGS 3% e 1,5%, outro tensoativo aniônico, não sofreram alterações significativas na opacidade (ambas 0,500) nem na permeabilidade (0,407 e 0,181, respectivamente), quando comparadas ao controle negativo, contudo foram classificadas como sem predição, uma vez que o seu IVIS foi de 6,605 (CGS 3%) e de 3,215 (CGS 1,5%) (Tabela 9). O cocoilglutamato de sódio tem classificação GHS categoria 2B, ou seja, ele é classificado como um irritante leve ou moderado, que não consegue ser detectado dessa forma pelo ensaio de BCOP por si só, o que é uma limitação do teste, sendo necessária a avaliação histopatológica.

Com relação às córneas expostas ao CAB 3% e 1,5%, elas não sofreram alteração de opacidade significativa (3,000 e 2,000, respectivamente) em relação ao controle negativo. Porém, a quantidade de corante fluoresceína de sódio que penetrou nessas córneas caracterizou um aumento da permeabilidade (2,334 e 1,485, respectivamente) estatisticamente diferente ($p<0,05$) do controle negativo (Figura 23), resultando em IVIS igual a 38,010 (CAB 3%) e 24,275 (CAB 1,5%), sendo, por isso, classificado como sem predição (Tabela 9). Entretanto, esse tensoativo anfótero tem classificação GHS categoria 1. Alguns estudos indicam que a irritação causada pelo CAB ocorre principalmente pelo dano na conjuntiva, podendo afetar a córnea (BURNETT et al., 2012), ou seja, apenas o BCOP não prediz corretamente o potencial irritante dessa substância, por se tratar de um modelo que avalia apenas a córnea. Além disso, o CAB, assim como outros tensoativos, pode provocar destruição da camada epitelial da córnea, assim como discutido anteriormente para o SDS, ocasionando baixos valores de opacidade e, consequentemente, baixo escore de irritação (IVIS), mas permitindo que a substância penetre nas camadas mais profundas da córnea. Também já é conhecido que uma das limitações do BCOP, e de outros métodos *in vitro*, é a impossibilidade de avaliar a persistência dos danos causados na córnea, o que, em ensaios *in vivo*, classifica uma substância como categoria 1 (ICCVAM, 2006a).

Quanto ao CCMG 1,5%, ele não foi capaz de provocar nenhuma alteração significativa na opacidade (0,250) e na permeabilidade (0,109) das córneas expostas a essa substância, sendo assim, classificado como não irritante ou sem categoria (IVIS = 1,885) (Tabela 9). Já na concentração de 3%, o CCMG provocou alterações significativas ($p<0,05$) na opacidade das córneas (9,750) e conseguiu penetrar (1,324) mais profundamente pelas camadas das mesmas, quando comparadas ao controle negativo (opacidade: 0,444; permeabilidade: 0,003) e ao próprio CCMG 1,5% (opacidade: 0,250; permeabilidade: 0,109) (Figura 23). Consequentemente, o seu IVIS aumentou para 29,610, sendo, com isso, classificado como sem predição (Tabela 9), ou seja, poderia ser considerado categoria 2, mas

devido à limitação do ensaio, o BCOP não consegue detectar essa categoria com precisão. Diferentemente dos outros tensoativos analisados, o CCMG apresentou-se em diferentes categorias quando a sua concentração foi alterada no ensaio de BCOP. Pode-se inferir, com isso, que quanto menor a concentração desse tensoativo, menor é o dano provocado na córnea. Além disso, os tensoativos não iônicos são considerados menos irritantes que as outras classes de tensoativos, tanto em ensaios de citotoxicidade quanto em ensaios de irritação cutânea (CORAZZA et al., 2010).

Em relação ao polissorbato 20 a 10%, ele não ocasionou sinais de alteração da opacidade (0,083) e da permeabilidade (0,020) das córneas quando comparado ao controle negativo, sendo, assim, classificado como sem categoria, ou seja, não irritante (Tabela 9). A classificação do polissorbato 20 como sem categoria está de acordo com sua classificação GHS e também com dados encontrados na literatura quando testado em córnea bovina (ICCVAM, 2006a), demonstrando que essa substância não é capaz de causar alterações na opacidade e na permeabilidade da córnea.

Igualmente, o dimeticone (opacidade: 0,417; permeabilidade: 0,003) e o ciclopentasiloxano (opacidade: 0,167; permeabilidade: 0,013), não causaram alterações na opacidade e na permeabilidade das córneas quando comparados ao controle negativo, obtendo IVIS igual a 0,462 e 0,362, respectivamente (Tabela 9). Assim, esses dois silicones foram classificados como sem categoria, ou seja, não irritantes. Como discutido anteriormente no item 5.1, esses silicones, quando avaliados *in vivo*, produziram sinais transitórios leves na conjuntiva ocular, não provocando nenhuma alteração nas córneas dos coelhos (NAIR et. al, 2003; SCCS, 2015), assim como nos resultados apresentados pelo ensaio de BCOP.

Diante dos resultados obtidos, observamos que a maioria dos tensoativos não provocou alteração na opacidade das córneas (Figura 23A), porém a maioria deles alterou a permeabilidade das mesmas (Figura 23B). A opacidade é alterada quando a matriz de colágeno sofre alguma modificação. Apesar da maioria dos tensoativos ter penetrado mais nas camadas das córneas, pode-se inferir que eles não tenham atingido o estroma ou se o atingiram, eles não se complexaram com as fibras de colágeno.

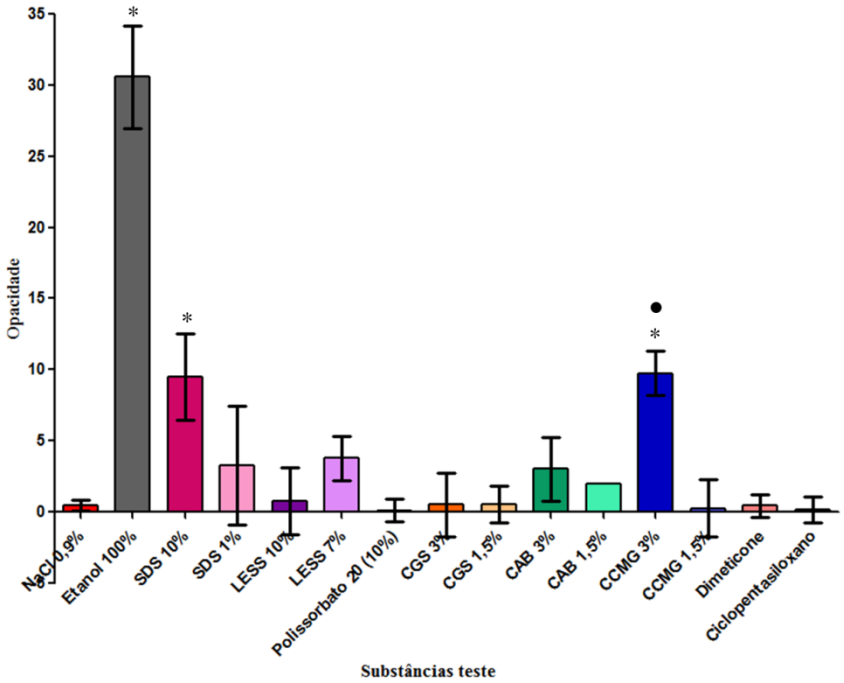
Tabela 9 – Valores de opacidade e permeabilidade com seus desvios padrão e escore de irritação *in vitro* (IVIS) e categoria de irritação das substâncias estudadas. N = 4

Substância teste	Opacidade	Permeabilidade	IVIS	Categoria de Irritação
NaCl 0,9%	0,444 ± 0,784	0,003 ± 0,003	0,489	Sem categoria*
Etanol 100%	30,590 ± 7,000#	2,103 ± 0,793#	62,135	Categoria 1***
SDS 10%	9,500 ± 1,915#	2,250 ± 0,648#	43,250	Sem predição**
SDS 1%	3,250 ± 2,630	0,750 ± 0,412	14,500	Sem predição**
LESS 10%	0,750 ± 1,500	1,736 ± 0,262#	26,794	Sem predição**
LESS 7%	3,750 ± 0,957	1,071 ± 0,437#	19,815	Sem predição**
CGS 3%	0,500 ± 1,414	0,407 ± 0,124	6,605	Sem predição**
CGS 1,5%	0,500 ± 0,816	0,181 ± 0,093	3,215	Sem predição**
Polissorbato 20 (10%)	0,083 ± 0,500	0,020 ± 0,019	0,383	Sem categoria*
CCMG 3%	9,750 ± 0,957#	1,324 ± 0,542#	29,610	Sem predição**
CCMG 1,5%	0,250 ± 1,258	0,109 ± 0,043	1,885	Sem categoria*
CAB 3%	3,00 ± 1,414	2,334 ± 0,482#	38,010	Sem predição**
CAB 1,5%	2,000 ± 0,000	1,485 ± 0,496#	24,275	Sem predição**
Dimeticone	0,417 ± 0,500	0,003 ± 0,001	0,462	Sem categoria*
Ciclopentasiloxano	0,167 ± 0,577	0,013 ± 0,017	0,362	Sem categoria*

* Substâncias com IVIS ≤ 3 de acordo com OECD TG 437
** Substâncias com 3 < IVIS ≤ 55 de acordo com OECD TG 437
*** Substâncias com IVIS ≥ 55 de acordo com OECD TG 437
# Estatisticamente diferente ($p<0,05$) do controle negativo (NaCl 0,9%)

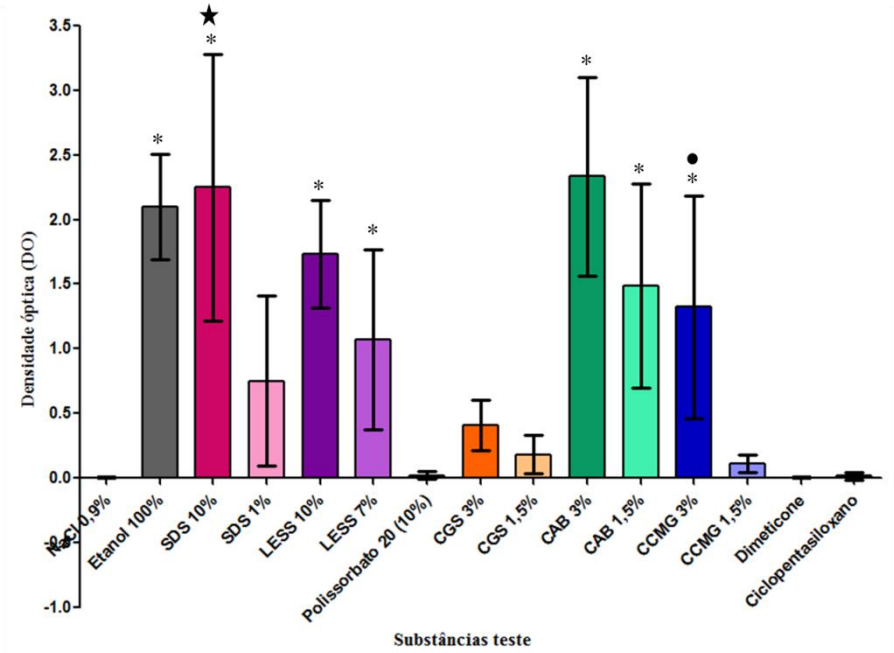
Figura 23 – Gráficos relacionando a opacidade (A) e permeabilidade (B) de cada substância avaliada no ensaio de BCOP. Barras: média ± desvio padrão

A) Opacidade



* Estatisticamente diferente (p<0,05) do controle negativo (NaCl 0,9%)
● Estatisticamente diferente (p<0,05) do CCMG 1,5%

B) Permeabilidade



* Estatisticamente diferente (p<0,05) do controle negativo (NaCl 0,9%)
● Estatisticamente diferente (p<0,05) do CCMG 1,5%
★ Estatisticamente diferente (p<0,05) do SDS 1%

5.3 Avaliação histopatológica

As córneas expostas ao NaCl 0,9% (controle negativo) não sofreram alterações em suas camadas de células epiteliais nem na matriz de colágeno do estroma (Figura 24A), ao contrário das córneas expostas ao etanol 100% (controle positivo) que apresentaram perda de algumas células superficiais do epitélio, coagulação das células da camada escamosa, vacuolização do núcleo e do citoplasma das células asas e basais (Figura 24B). Além disso, os queratinócitos do primeiro terço superior do estroma apresentaram morfologia alterada. Assim, o etanol 100% foi classificado como irritante severo.

O contato das córneas com o SDS 1% provocou apenas a perda de células epiteliais da camada escamosa e parte da camada superior de células asas (Figura 25A). Assim, nessa concentração de 1%, o SDS apresentou potencial irritante leve. Já o SDS 10% provocou a perda / descamação de células desde as camadas mais superficiais até a camada de células basais do epitélio da córnea, sendo possível também observar os núcleos picnóticos nessa região (Figura 25B), o que pode estar relacionado à irreversibilidade dos danos e o que caracteriza o SDS 10% como categoria 1, ou seja, um irritante severo.

Enquanto no ensaio de BCOP o SDS tinha sido classificado como sem predição, na análise histopatológica, o SDS 10% foi classificado como um irritante severo por causar danos mais profundos no epitélio da córnea, enquanto que a 1%, ele foi considerado um irritante leve por causar apenas danos superficiais no epitélio, o que pode justificar o seu uso em menor concentração em produtos cosméticos (CIR, 1983).

Em relação às córneas submetidas ao LESS 7% e 10%, elas apresentaram uma descamação celular desde a camada de células escamosas até a camada de células asas (Figura 26A e B, respectivamente), caracterizando danos moderados às córneas. Assim, o LESS pôde ser mais bem definido quanto ao seu potencial ocular irritante, ou seja, enquanto no ensaio de BCOP ele foi classificado como sem predição, na análise histopatológica, ele foi classificado como irritante moderado em ambas as concentrações, concordando com a sua classificação GHS categoria 2B (irritantes leves ou moderados).

O CGS 1,5% não provocou alteração significativa nas diferentes camadas das córneas (Figura 27A) e, por isso, nessa concentração o CGS foi classificado como não irritante. Já o CGS 3% causou diminuição da espessura da camada epitelial de algumas córneas em relação ao controle negativo, levando essa substância a ser classificada como levemente irritante (Figura 27B). O CGS, também classificado como sem predição no ensaio de BCOP, foi classificado mais precisamente pela histopatologia. A classificação GHS desse tensoativo é categoria 2B (irritantes leves ou moderados), o que pôde ser observado na histopatologia das

córneas submetidas ao CGS 3%. Pode-se afirmar, ainda, que quando esse tensoativo foi diluído, os seus efeitos sobre o tecido da córnea também foram reduzidos ou anulados. Dessa forma, os resultados da análise histopatológica corroboram com os resultados do BCOP, pois o IVIS do CGS (1,5%: 3; 3%: 6) foi menor que o IVIS dos outros tensoativos aniônicos (SDS 1%: 14; SDS 10%: 43 e LESS 7%: 19; LESS 10%: 26).

O CAB 1,5% foi capaz de destruir o epitélio da córnea desde a camada de células escamosas até a camada de células asas e, em algumas regiões, atingindo as células basais, além de haver um leve edema no terço superior do estroma (Figura 28A). Consequentemente, o CAB 1,5% foi considerado um potente irritante ocular. Em maior concentração, o CAB 3% provocou destruição do epitélio das córneas atingindo desde a camada escamosa até a basal, podendo ser observado, ainda, edema das células restantes e no terço superior do estroma (Figura 28B), características estas de uma possível irreversibilidade, já que atingiu a camada basal, demonstrando ser um irritante severo. Esse tensoativo tem sua classificação GHS como categoria 1 (irritante severo) e, mesmo em baixas concentrações, ele ainda demonstrou ser um potente irritante ocular, o que pode ser devido à sua capacidade de penetrar mais profundamente nas diferentes camadas da córnea.

O polissorbato 20 (10%), mesmo sendo considerado não irritante no ensaio de BCOP e a sua classificação GHS ser sem categoria (não irritante), após a avaliação histopatológica das córneas submetidas a essa substância, foi possível observar a descamação de uma fileira superficial de células escamosas (Figura 29), sendo, por isso, classificado como irritante discreto. Esse tipo de resultado também foi relatado no trabalho de Cooper e colaboradores (2001) e no trabalho de Furukawa e colaboradores (2015), nos quais eles avaliaram shampoos e demaquilantes que obtiveram classificação de não irritantes no ensaio de BCOP, porém na avaliação histopatológica, esses produtos provocaram alteração na camada escamosa do epitélio da córnea, caracterizando, com isso, um irritante discreto.

De maneira semelhante, as córneas expostas ao CCMG 1,5% apenas apresentaram descamação celular da camada escamosa (Figura 30A), sendo, assim, classificado como um irritante discreto, ao contrário do resultado obtido no ensaio de BCOP, no qual essa amostra não ocasionou sinais de irritação. Já as córneas expostas ao CCMG 3% apresentaram descamação epitelial a partir das células da camada escamosa até a camada de células asas, além de apresentarem edema nas células restantes do epitélio e vacúolos na camada basal (Figura 30B), caracterizando danos severos às córneas. Pode-se afirmar, ainda, que, assim como demonstrado no ensaio de BCOP, quanto maior a concentração desse tensoativo, maior foi o dano provocado por ele na córnea.

Por fim, os silicones, dimeticone e ciclopentasiloxano, não foram capazes de provocar alterações nas diferentes camadas das córneas (Figura 31A e 31B, respectivamente), consequentemente ambos foram considerados não irritantes, corroborando com os resultados dos ensaios anteriores.

Em vista dos resultados apresentados acima, a avaliação histopatológica foi extremamente importante como uma ferramenta complementar ao ensaio de BCOP para a classificação da maioria dos tensoativos estudados, os quais foram classificados como sem predição (IVIS >3 e ≤55) no BCOP, classificação esta relativa às substâncias GHS categoria 2, mas que na avaliação histopatológica foram classificados mais especificamente. Os resultados da histopatologia corroboraram com os resultados do ensaio de BCOP, pois a maioria deles não alterou a opacidade das córneas e, portanto, não houve deformação da matriz de colágeno, porém houve alteração (descamação) das camadas celulares do epitélio, o que, provavelmente, levou a uma maior permeabilidade da córnea à fluoresceína.

Além disso, o estudo histopatológico foi de grande importância para a avaliação do polissorbato 20 (10%) e do CCMG 1,5%, os quais foram classificados como irritantes severos no ensaio de HET-CAM, mas como não irritantes (GHS sem categoria) no BCOP. Na histopatologia, foi possível verificar um pequeno dano no epitélio da córnea, concluindo que essas duas amostras, polissorbato 20 (10%) e CCMG 1,5%, foram irritantes discretos para a córnea, apesar de não alterarem significativamente a opacidade e a permeabilidade da mesma.

Dessa forma, a avaliação histopatológica foi um potente aliado do ensaio de BCOP, pois permitiu verificar a profundidade dos danos causados pelas diferentes concentrações dos tensoativos, contribuindo para a avaliação do potencial de irritação ocular de produtos cosméticos que contenham esses ingredientes.

Figura 24 – Fotomicrografias das córneas bovinas submetidas ao controle negativo NaCl 0,9% (A – IVIS: 0,5; classificação: não irritante) e ao controle positivo etanol 100% (B – IVIS: 62, classificação: irritante severo). A seta indica os vacúolos nas células asas e basais. Coloração HE. Aumento de 20x

A) NaCl 0,9%

B) Etanol 100%

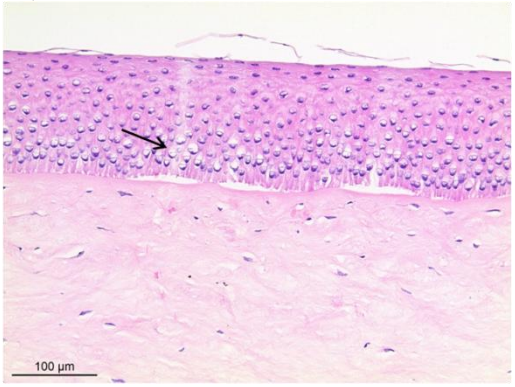
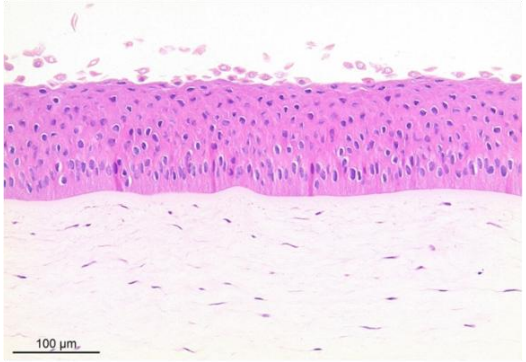


Figura 25 – Fotomicrografias das córneas bovinas submetidas ao SDS 1% (A – IVIS: 14, classificação: irritante leve), SDS 10% (B – IVIS: 43, classificação: irritante severo). A seta indica os núcleos picnóticos. Coloração HE. Aumento de 20x

A) SDS 1%



B) SDS 10%

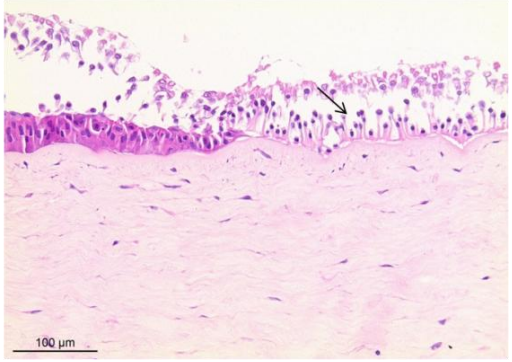
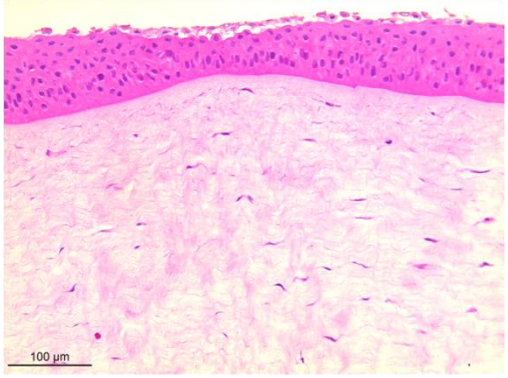


Figura 26 – Fotomicrografias das córneas bovinas submetidas ao LESS 7% (A – IVIS: 20, classificação: irritante moderado), LESS 10% (B – IVIS: 27, classificação: irritante moderado). Coloração HE. Aumento de 20x

A) LESS 7%



B) LESS 10%

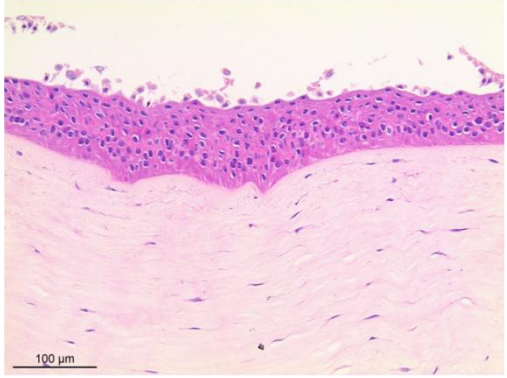
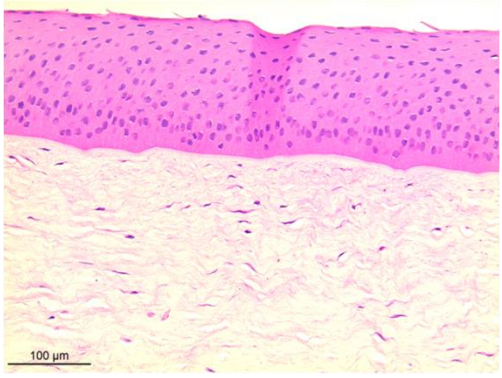


Figura 27 – Fotomicrografias das córneas bovinas submetidas ao CGS 1,5% (A – IVIS: 3,2, classificação: não irritante), CGS 3% (B – IVIS: 6,6, classificação: irritante leve). Coloração HE. Aumento de 20x

A) CGS 1,5%



B) CGS 3%

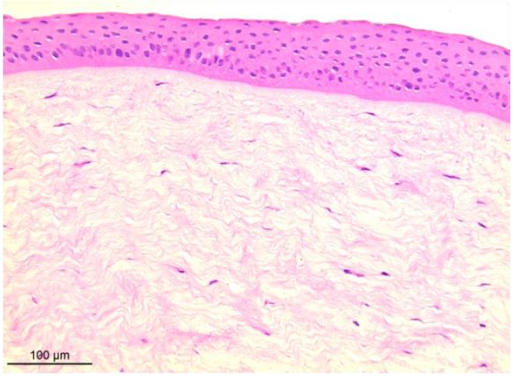
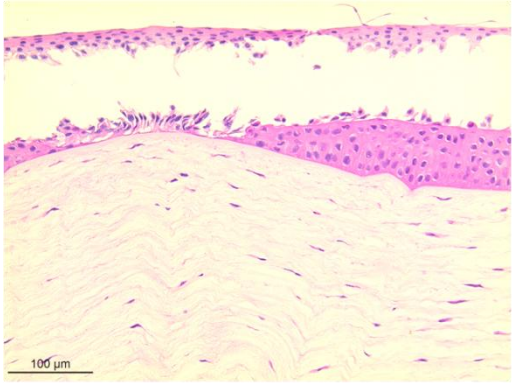


Figura 28 – Fotomicrografias das córneas bovinas submetidas ao CAB 1,5% (A – IVIS: 24, classificação: irritante severo), CAB 3% (B – IVIS: 38, classificação: irritante severo). Coloração HE. Aumento de 20x

A) CAB 1,5%



B) CAB 3%

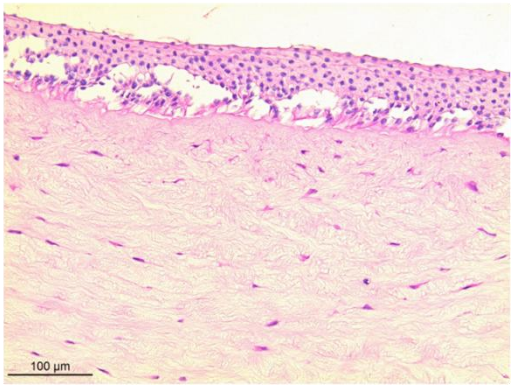
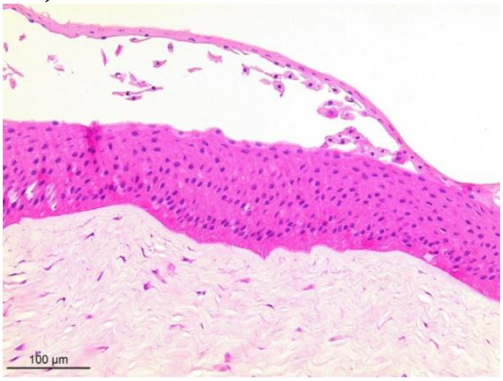


Figura 29 – Fotomicrografia da córnea bovina submetida ao Polissorbato 20 (10%) (IVIS: 0,4, classificação: irritante discreto). Coloração HE. Aumento de 20x

Figura 30 – Fotomicrografias das córneas bovinas submetidas ao CCMG 1,5% (A – IVIS: 2, classificação: não irritante), CCMG 3% (B – IVIS: 29,6, classificação: irritante severo). As setas indicam os vacúolos na camada de células basais. Coloração HE. Aumento de 20x

A) CCMG 1,5%



B) CCMG 3%

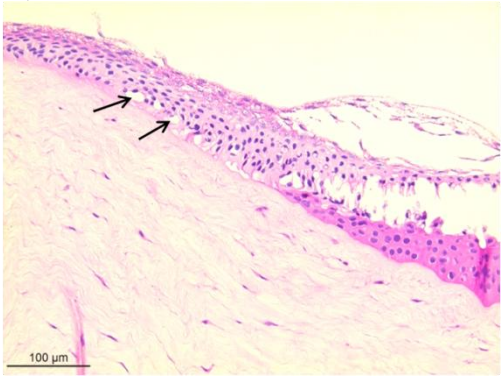
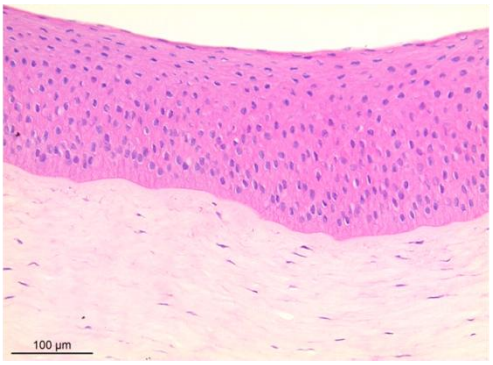


Figura 31 – Fotomicrografias das córneas bovinas submetidas ao Dimeticone (A – IVIS: 0,5, classificação: não irritante) e Ciclopentasiloxano (B – IVIS: 0,4, classificação: não irritante). Coloração HE. Aumento de 20x

A) Dimeticone



B) Ciclopentasiloxano

5.4 Resumo dos resultados da avaliação do potencial de irritação ocular

Na Tabela 10, estão sintetizados os resultados do ensaio de HET-CAM, BCOP e da avaliação histopatológica, bem como a classificação final obtida no presente trabalho. A maioria das substâncias teste foi classificada como irritante severo pelo ensaio de HET-CAM, devido à alta sensibilidade da membrana cório-alantóide, já que esta mimetiza a conjuntiva ocular, uma região bastante vascularizada e sensível. Já quando o potencial irritante das substâncias teste foi avaliado na córnea bovina, a maioria delas foi classificada como sem predição, devido à limitação do ensaio de BCOP em não distinguir as substâncias com um potencial irritante intermediário das demais, ou seja, as categorias 2A e 2B. Além disso, a limitação do BCOP se dá, nesse caso, pela própria característica dos tensoativos de destruírem

a camada epitelial da córnea, permitindo que eles penetrem de maneira significativa por suas camadas, mas não causem alterações significativas na opacidade, resultando em valores de IVIS não suficientes para classificá-los precisamente. Por fim, a avaliação histopatológica foi determinante para avaliar os danos reais sobre o tecido das córneas e classificar cada amostra de acordo com o seu potencial irritante.

A classificação final obtida nesse estudo foi baseada nos ensaios realizados. O HET-CAM foi importante como o primeiro passo na avaliação do potencial de irritação ocular, porque ele permitiu a execução de uma triagem para demonstrar o grau de irritação das substâncias teste. Em seguida, o ensaio de BCOP e, principalmente, a avaliação histopatológica foram determinantes para a classificação exata de cada amostra. Destaca-se que a classificação obtida neste estudo para algumas substâncias foi diferente da sua classificação GHS fornecida pela FISPQ, pois esta última é referente à substância concentrada, enquanto que a desse estudo refere-se às amostras diluídas a baixas concentrações, as quais são comumente utilizadas em produtos cosméticos. Desta forma, também foi possível demonstrar que os ensaios são sensíveis a pequenas variações nas concentrações de uso e tem grande utilidade para avaliar a toxicidade de soluções diluídas e assim, servir como ponto de partida para a predição de sua toxicidade no produto final.

Tabela 10 – Classificação do potencial de irritação ocular das substâncias estudadas de acordo com o ensaio realizado e a sua classificação GHS

Substâncias teste	HET-CAM	BCOP	Histopatologia	Classificação final obtida no estudo	GHS*
SDS 10%	-	Sem predição	Irritante severo	Irritante severo	Categoria 1
SDS 1%	Irritante severo	Sem predição	Irritante leve	Irritante leve	Categoria 1
LESS 27%	Irritante severo	-	-	Irritante severo	Categoria 2
LESS 10%	Irritante severo	Sem predição	Irritante moderado	Irritante moderado	Categoria 2A
LESS 7%	Irritante severo	Sem predição	Irritante moderado	Irritante moderado	Categoria 2A
LESS 1%	Irritante severo	-	-	-	Categoria 2A
CGS 3%	Irritante severo	Sem predição	Irritante leve	Irritante leve	Categoria 2B
CGS 1,5%	Irritante severo	Sem predição	Não irritante	Não irritante	Categoria 2B
CAB 3%	Irritante severo	Sem predição	Irritante severo	Irritante severo	Categoria 1
CAB 1,5%	Irritante severo	Sem predição	Irritante severo	Irritante severo	Categoria 1
Polissorbato 20 (100%)	Irritante severo	-	-	-	Sem Categoria
Polissorbato 20 (10%)	Irritante moderado	Sem categoria	Irritante discreto	Irritante discreto	Sem Categoria
CCMG 3%	Irritante severo	Sem predição	Irritante severo	Irritante severo	Categoria 1
CCMG 1,5%	Irritante severo	Sem categoria	Irritante discreto	Irritante discreto	Categoria 1
Dimeticone (100%)	Não irritante	Sem categoria	Não irritante	Não irritante	Sem categoria
Ciclopentasiloxano (100%)	Não irritante	Sem categoria	Não irritante	Não irritante	Sem categoria

- Amostras não avaliadas
* Baseado na Ficha de Segurança do Produto Químico (FISPQ) segundo a classificação GHS:
Categoria 1: irritante severo
Categoria 2A: irritante
Categoria 2B: irritante leve
Sem categoria: não irritante

5.5 Proposta de estratégia para a avaliação do potencial de irritação ocular

Diante dos resultados obtidos no presente trabalho, a seguinte estratégia foi proposta para a avaliação do potencial de irritação ocular de ingredientes cosméticos, os quais possuem ausência presumida de risco nas concentrações utilizadas em produtos cosméticos (Figura 32): em um primeiro nível de avaliação, deve-se utilizar o ensaio de HET-CAM, o qual avalia os eventos vasculares de hiperemia, hemorragia e coagulação que possam ocorrer na CAM após a exposição do ingrediente, mimetizando, assim, a conjuntiva ocular. Em seguida, no 2º nível de avaliação, todos os ingredientes em estudo devem ser avaliados pelo ensaio de BCOP, o qual avalia seus efeitos sobre a córnea, ou seja, se ele é capaz de alterar a opacidade e a permeabilidade da mesma. Ao término dessa etapa, a seguinte análise deve ser feita:

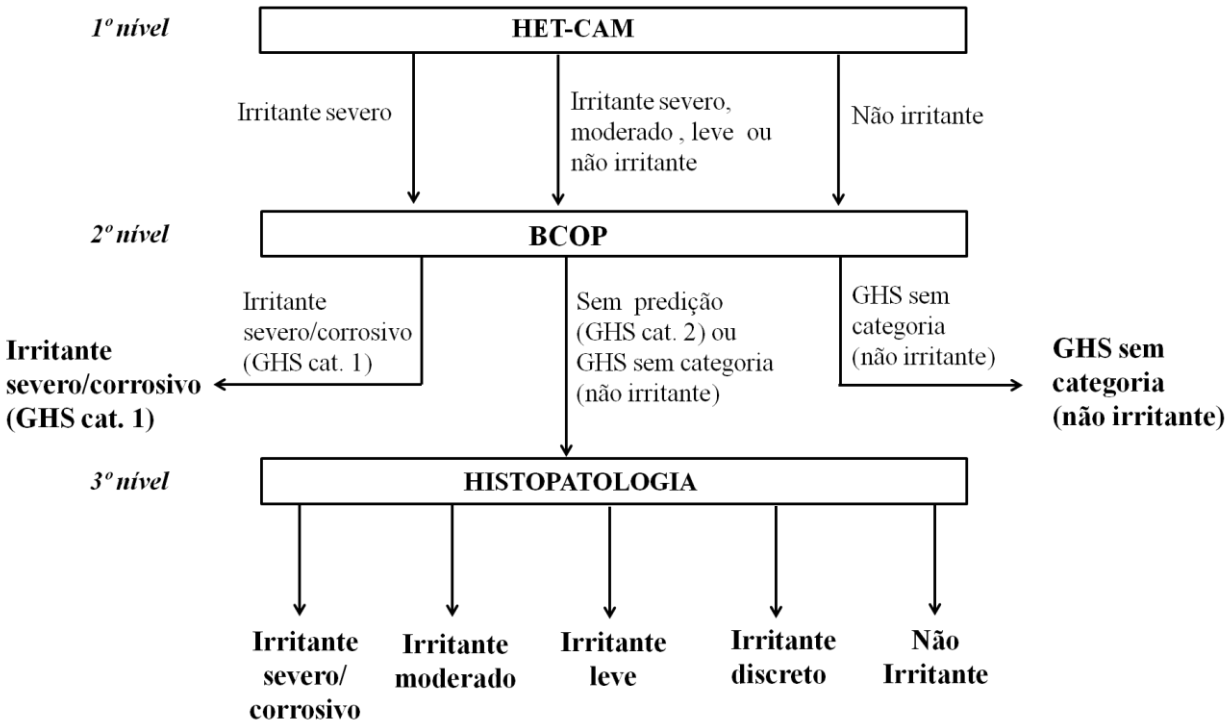
- se o ingrediente for classificado como irritante severo nos ensaios de HET-CAM e de BCOP, a avaliação desse ingrediente termina nessa etapa, sendo classificado como GHS categoria 1 ou irritante severo/corrosivo;
- se o ingrediente for classificado como não irritante nos ensaios de HET-CAM e de BCOP, a avaliação desse ingrediente também termina nessa etapa, sendo classificado como GHS sem categoria ou não irritante;
- se o ingrediente apresentar potencial irritante (severo, moderado ou leve) no ensaio de HET-CAM e, no ensaio de BCOP, ele for classificado como sem predição ou GHS sem categoria (não irritante), esse produto deve avançar para a próxima etapa, a avaliação histopatológica.

Nesse 3º nível de avaliação, o ingrediente é avaliado pela histopatologia quanto ao grau e a profundidade da lesão que ele provocou na córnea bovina, possibilitando, até mesmo, inferir sobre a reversibilidade da lesão. Isso é possível porque o epitélio da córnea responde rapidamente à lesão provocada pelo produto químico, por isso ele requer uma renovação constante das suas células. As células basais, as únicas que sofrem mitose, migram da camada inferior do epitélio para as camadas superiores, diferenciando-se em células asas e escamosas. Consequentemente a superfície do epitélio é renovada continuamente ou reparada no caso de algum dano (FURUKAWA et al., 2015). Em seres humanos, a renovação epitelial ocorre aproximadamente de 7-10 dias (DANIELS et al., 2001). Assim, quanto mais profunda a lesão menor é chance de ocorrer reversibilidade dos danos. Portanto, o produto químico estudado nessa etapa da avaliação poderá ser classificado como não irritante ou irritante discreto, leve, moderado ou severo.

É importante ressaltar que o produto químico deve passar, obrigatoriamente, pelos dois primeiros níveis de avaliação do potencial de irritação ocular porque cada um deles

avalia diferentes estruturas oculares e diferentes mecanismos de toxicidade, ou seja, no HET-CAM, há a simulação da conjuntiva ocular e avaliação dos eventos vasculares, enquanto no BCOP é avaliada a córnea quanto às alterações na sua opacidade e na sua permeabilidade.

Figura 32 – Esquema representativo da proposta de estratégia de avaliação do potencial de irritação ocular de ingredientes cosméticos



6. Conclusão

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se afirmar que os objetivos propostos foram cumpridos, ou seja, foi avaliado o potencial de irritação ocular dos tensoativos e dos silicones pelos métodos propostos, HET-CAM e BCOP, e como ferramenta complementar foi feita a avaliação histopatológica das córneas.

No ensaio de HET-CAM, todos os tensoativos apresentaram potencial de irritação ocular, enquanto os silicones não foram irritantes. Assim, esse método mostrou-se bastante sensível e adequado para a avaliação do potencial de irritação ocular de ingredientes cosméticos na conjuntiva.

Já no ensaio de BCOP foi possível verificar que a maioria dos tensoativos não provocou grandes alterações de opacidade e, sim, de permeabilidade, resultando em escore de irritação intermediário e, consequentemente, eles foram classificados como sem predição. Os silicones não provocaram irritação na córnea, sendo classificados como não irritantes nesse ensaio também.

A avaliação histopatológica foi capaz de distinguir o potencial de irritação ocular dos tensoativos classificados como sem predição no ensaio de BCOP e daqueles (polissorbato 20 a 10% e CCMG 1,5%) que foram considerados não irritantes no BCOP e irritantes severos no HET-CAM. Os silicones não provocaram alterações histopatológicas na córnea. Dessa forma, a avaliação histopatológica foi muito importante para a predição da toxicidade ocular dos ingredientes cosméticos estudados.

Baseado nos ensaios realizados foi obtido a classificação final do potencial de irritação ocular de cada substância teste nas diferentes concentrações. Com isso, foi possível, ainda, demonstrar que os ensaios foram sensíveis a pequenas variações nas concentrações de uso e tem grande utilidade para avaliar a toxicidade de soluções diluídas e assim, servir como ponto de partida para a predição de sua toxicidade no produto final.

Por fim, a estratégia proposta para a avaliação do potencial de irritação ocular é bastante promissora para avaliar ingredientes e produtos cosméticos, pois é possível avaliar os eventuais danos que eles podem causar na conjuntiva ocular e na córnea por diferentes mecanismos toxicológicos, predizendo, assim, a toxicidade ocular desses produtos.

7. Referências Bibliográficas

ADRIAENS, E.; BARROSO, J.; ESKES, C.; HOFFMANN, S.; McNAME, P.; ALÉPÉE, N.; BESSOU-TOUYA, S.; DE SMEDT, A.; DE WEVER, B.; PFANNENBECKER, U.; TAILHARDAT, M.; ZUANG, V. Retrospective analysis of the Draize test for serious eye damage/eye irritation: importance of understanding the in vivo endpoints under UN GHS/EU CLP for the development and evaluation of in vitro test methods. **Archives of Toxicology,** v. 88, n. 3, p. 701-723, 2014.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2012. **Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos**, 2 ed. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/04707f804e1c33cea541b7c09d49251b/Guia_cosmeticos_grafica_final.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 11 mai. 2016.

AVMA, Guidelines on Euthanasia, American Veterinary Medical Association. 2013. Disponível em < https://www.avma.org/KB/Policies/Documents/euthanasia.pdf>. Acesso em: 05 mar. 2017.

BARROSO, J.; PFANNENBECKER, U.; ADRIAENS, E.; ALÉPÉE, N.; CLUZEL, M.; SMEDT, A.; HIBATALLAH, J.; KLARIC, M.; MEWES, K.; MILLET, M.; TEMPLIER, M.; McNAMEE, P. Cosmetics Europe compilation of historical serious eye damage/eye irritation in vivo data analysed by drivers of classification to support the selection of chemicals for development and evaluation of alternative methods/strategies: the Draize eye test Reference Database (DRD). **Archives Toxicology**, v. 91, n. 2, p. 421-547, 2016.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. CONCEA. Resolução Normativa nº 17 de 3 de julho de 2014. Dispõe sobre o reconhecimento de métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 04 de julho de 2014. Seção 1, p.51.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. CONCEA. Resolução Normativa nº 31 de 18 de agosto de 2016. Reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil. **Diário Oficial da União**, Brasília, 19 de agosto de 2016. Seção 1, p.4.

BURNETT, C. L.; BERGFELD, W. F.; BELSITO, D. V.; HILL, R. A.; SNYDER, P. W.; ANDERSEN, F. A. Final report of the Cosmetic Ingredient Review Expert Panel on the safety assessment of cocamidopropyl betaine (CAPB). **International Journal of Toxicology**, v. 31, Suppl. 1, p. 77-111, 2012.

CATER, K. C., HARBELL, J. W. Prediction of eye irritation potential of surfactant based rinse-off personal care formulations by the Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) assay. **Cutaneous and Ocular Toxicology**, v. 25, n. 3, p. 217–233, 2006.

CATER, K. C.; HARBELL, J. W. Prediction of eye irritation potential of liquid and granular laundry detergent formulas using the bovine corneal opacity and permeability (BCOP) assay. **Cutaneous and Ocular Toxicology**, v. 32, n. 3, p. 210–221, 2013.

CHAMBERLAIN, M.; GAD, S. C.; GAUTHERON, P.; PRINSEN, M. K. Organotypic models for the assessment/prediction of ocular irritation. **Food and Chemical Toxicology**, v. 35, n. 1, p. 23-37, 1997.

CIR publication. Final report on the safety assessment of sodium lauryl sulfate and ammonium lauryl sulfate. **Journal of the American College of Toxicology**, v. 2, n.7, p. 127-181, 1983.

CIR publication. Safety assessment of amino acid alkyl amides as used in cosmetics, 2014. Disponível em <http://www.cir-safety.org/supplementaldoc/safety-assessment-amino-acid-alkyl-amides-used-cosmetics-0>. Acesso em: 08 mar. 2017.

COOPER, K. J.; EARL, L. K.; HARBELL, J.; RAABE, H. Prediction of ocular irritancy of prototype shampoo formulations by the isolated rabbit eye (IRE) test and bovine corneal opacity and permeability (BCOP) assay. **Toxicology in Vitro**, v. 15, n. 2, p. 95–103, 2001.

CORAZZA, M.; LAURIOLA, M. M.; ZAPPATERRA, M.; BIANCHI, A.; VIRGILI, A. Surfactants, skin cleansing protagonists. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 24, n. 1, p. 1-6, 2010.

CORRÊA, M. A. Cosmetologia: Ciência e Técnica. São Paulo: Medfarma, 2012.

DANIELS, J. T.; DART, J. K.; TUFT, S. J.; KHAW, P. T. Corneal stem cells in review. **Wound Repair and Regeneration**, v. 9, n. 6, p. 483-494, 2001.

DARIO, M. F.; OLIVEIRA, C. A.; CORDEIRO, L. R. G.; ROSADO, C.; MARIZ, I. F. A.; MAÇÔAS, E.; SANTOS, M. S. C. S.; PIEDADE, M. E. M.; BABY, A.; VELASCO, M. V. R. Stability and safety of quercetin-loaded cationic nanoemulsion:In vitro and in vivo assessments. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 506, p. 591-599, 2016.

DONAHUE, D. A.; KAUFMAN, L. E.; AVALOS, J.; SIMION, F. A.; CERVEN, D. R. Survey of ocular irritation predictive capacity using Chorioallantoic Membrane Vascular Assay (CAMVA) and Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) test historical data for 319 personal care products over fourteen years. **Toxicology in Vitro**, v. 25, n. 2, p. 563–572, 2011.

DRAIZE, J. H., WOODARD, G., CALVERY, H. O. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics,** v.82, n. 3, p.377–390, 1944.

EC (1976). Council Directive of 27 July 1976 on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products, OJ L 262, 27.9.1976, p. 169.

EC (2003). Directive 2003/15/EC of the European Parliament and of the Council of 27 February 2003 amending Council Directive 76/768/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products. Official Journal of the European Union L66, 26–35.

EC (2013). Communication from the Commission to the European Parliament and the Council on the animal testing and marketing ban and on the state of play in relation to alternative methods in the field of cosmetics. Brussels, 11.3.2013, COM(2013) 135 final.

EFFENDY, I.; MAIBACH, H. I. Detergent and skin irritation. **Clinics in Dermatology**, v. 14, n. 1, p. 15–21, 1996.

ESKES, C.; BESSOU, S.; BRUNER, L.; CURREN, R.; HARBELL, J.; JONES, P.; KREILING, R.; LIEBSCH, M.; MCNAMEE, P.; PAPE, W.; PRINSEN, M. K.; SEIDLE, T.; VANPARYS, P.; WORTH, A.; ZUANG, V. Eye irritation. **Alternative Laboratory Animal,** n. 33, p. 47–81, 2005.

FURUKAWA, M.; SAKAKIBARA, T.; ITOH, K.; KAWAMURA, K.; SASAKI, S.; MASAO, M. Histopathological evaluation of the ocular-irritation potential of shampoos, make-up removers and cleansing foams in the bovine corneal opacity and permeability assay, **Journal of Toxicologic Pathology,** v. 28, n. 4, p. 243–248, 2015.

GAUTHERON, P.; DUKIC, M.; ALIX, D.; SINA, J. F. Bovine Cornea1 Opacity and Permeability Test: An *in Vitro* Assay of Ocular Irritancy, **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 18, p. 442-449, 1992.

HAYASHI, K.; MORI, T.; ABO, T.; , OOSHIMA, K; HAYASHI, T.; KOMANO, T.; TAKAHASHI, Y.; SAKAGUCHI, H.; TAKATSU, A.; NISHIYAMA, N. Two-stage bottom-up tiered approach combining several alternatives for identification of eye irritation potential of chemicals including insoluble or volatile substances. **Toxicology in Vitro**, v. 26, p.1199–1208, 2012.

ICCVAM. Background Review Document: current status of in vitro test methods for identifying ocular corrosives and severe irritants: bovine corneal opacity and permeability test method. NIH publications No. 06-4512. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, 2006a. Disponível em: <https://ntp.niehs.nih.gov/pubhealth/evalatm/test-method-evaluations/ocular/in-vitro/brd/index.html>. Acesso em: 09 mai. 2016.

ICCVAM. Background Review Document: current status of in vitro test methods for identifying ocular corrosives and severe irritants: hen's egg test-choriallantoic membrane test method. NIH publications No. 06-4515. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, 2006b.Disponível em: <https://ntp.niehs.nih.gov/pubhealth/evalatm/test-method-evaluations/ocular/in-vitro/brd/index.html>. Acesso em: 09 mai. 2016.

JOHNSON, W. Jr.; BERGFELD, W. F.; BELSITO, D. V.; HILL, R. A.; KLAASSEN, C. D.; LIEBLER, D. C.; MARKS, J. G. Jr.; SHANK, R. C.; SLAGA, T. J.; SNYDER, P. W.; ANDERSEN, F. A. Safety assessment of cyclomethicone, cyclotetrasiloxane, cyclopentasiloxane, cyclohexasiloxane, and cycloheptasiloxane. **International Journal of Toxicology**, v. 30, Supl. 6, p. 149-227, 2011.

KOLLE, S. N.; SAUER, U. G.; MORENO, M. C. R.; TEUBNER, W.; WOHLLEBEN, W.; LANDSIEDE, R. Eye irritation testing of nanomaterials using the EpiOcular™ eye irritation test and the bovine corneal opacity and permeability assay. **Particle and Fibre of Toxicology**, v. 13, n. 18, p. 1-25, 2016.

JESTER, J. V.; LI, H. F.; PETROLL, W.M.; PARKER, R.D.; CAVANAUGH, H. D.; CARR, G.J.; SMITH, B.; MAURER, J. K. Area and depth of surfactant-induced corneal injury correlates with cell death. **Investigative Ophthalmology & Visual Science,** v. 39, n. 6, p.922-936, 1998.

JESTER, J. V. Extent of corneal injury as a biomarker for hazard assessment and the development of alternative models to the Draize rabbit eye test. **Cutaneous and Ocular Toxicology,** v. *25*, n. 1, p. 41-54, 2006.

LOTZ, C.; SCHMID, F. F.; ROSSI, A.; KURDYN, S.; KAMPIK, D.; DE WEVER, B.; WALLES, H.; GROEBER, F. K. Alternative methods for the replacement of eye irritation testing. **ALTEX-Alternatives to Animal Experimentation**, v. 33, n. 1, p. 55-67, 2016.

LUEPKE, N. P. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. **Food and Chemical Toxicology**, v. 23, n. 2, p. 287-291, 1985.

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

MAURER, J. K.; PARKER, R. D.; JESTER, J. V. Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. Regulatory Toxicology and Pharmacology, v. 36, n. 1, p. 106-117, 2002.

MEEK, K. M; BOOTE, C. The organization of collagen in the corneal stroma. **Experimental Eye Research**, v. 78, n. 3, p. 503-512, 2004.

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

McNAMEE, P.; HIBATALLAH, J.; COSTABEL-FARKAS, M.; GOEBEL, C.; ARAKI, D.; DUFOUR, E.; HEWITT, N. J.; JONES, P.; KIRST, A.; LeVARLET, B.; MACFARLANE, M.; MARREC-FAIRLEY, M.; ROWLAND, J; SCHELLAUF, F.; SCHEEL, J. A tiered approach to the use of alternatives to animal testing for the safety assessment of cosmetics: Eye irritation. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 54, n. 2, p. 197−209, 2009.

NAIR, B.; ELMORE, A. R. Final report on the safety assessment of Stearoxy Dimethicone, Dimethicone, Methicone, Amino Bispropyl Dimethicone, Aminopropyl Dimethicone, Amodimethicone, Amodimethicone Hydroxystearate, Behenoxy Dimethicone, C24-28 Alkyl Methicone, C30-45 Alkyl Methicone, C30-45 Alkyl Dimethicone, Cetearyl Methicone, Cetyl Dimethicone, Dimethoxysilyl Ethylenediaminopropyl Dimethicone, Hexyl Methicone, Hydroxypropyldimethicone, Stearamidopropyl Dimethicone, Stearyl Dimethicone, Stearyl Methicone, and Vinyldimethicone. **International Journal of Toxicology**, v. 22, Supl. 2, p. 11-35, 2003.

OECD, Guideline for Testing of Chemicals No. 405: Acute Eye Irritation/Corrosion. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 2012. Disponível em: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>. Acesso em: 06 jun. 2016.

OECD, Guidelines for Testing of Chemicals No. 437: Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method for Identifying Chemicals Inducing Serious Eye Damage and Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 2013. Disponível em: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>. Acesso em: 26 mai. 2016.

OECD, Draft Revised Guidance Document No. 160: Bovine corneal opacity and permeability (BCOP) and isolated chicken eye (ICE) test methods: collection of tissues for histological evaluation and collection of data on non-severe irritants. Organisation for Economic Cooperation and Development, 2016. Disponível em: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/draft-guidance-review-documents-monographs.htm>. Acesso em: 08 mar. 2017.

OECD, Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye Irritation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Disponível em <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/draft-guidance-review-documents-monographs.htm>. Acesso em: 08 mar. 2017.

OKAMOTO, Y.; OHKOSHI, K.; ITAGAKI, H.; TSUDA, T.; KAKISHIMA, H.; OGAWA, T.; KASAI, Y.; OHUCHI, J.; KOJIMA, H.; KURISHITA, A.; KANEKO, T.; MATSUSHIMA, Y.; IWABUCHI, Y.; OHNO, Y. Interlaboratory validation of the in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients. (3) Evaluation of the hemolysis test. **Toxicology In Vitro,** v. 13, n. 1, p. 115-124, 1999.

OLIVEIRA, G. A. R.; DUCAS, R. N.; TEIXEIRA, A. C. B.; OLIVEIRA, D. P.; VALADARES, M. C. Short Time Exposure (STE) test in conjunction with Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) assay including histopathology to evaluate correspondence with the Globally Harmonized System (GHS) eye irritation classification of textile dyes. **Toxicology in Vitro,** v. 29, p. 1283-1288, 2015.

PARISH, W. Ability of in vitro (corneal injury-eye organ-and chorioallantoic membrane) tests to represent histopathological features of acute eye inflammation. **Food and Chemical Toxicology**, v. 23, n. 2, p. 215-227, 1985.

PESCINA, S.; CARRA, F.; PADULA, C.; SANTI, P.; NICOLI, S. Effect of pH and penetration enhancers on cysteamine stability and trans-corneal transport. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 107, p. 171-179, 2016.

RIEGER, M. M. Harry's Cosmeticology, 8 ed. New York: Chemical Publishing.Co.Inc., 2000.

ROBINSON, V. C.; BERGFELD, W. F.; BELSITO, D. V.; HILL, R. A.; KLAASSEN, C. D; MARKS, J. G.; SHANK, R. C. ; SLAGA, T. J. ; SNYDER, P. W.; ANDERSEN, F. A. Final Report of the Amended Safety Assessment of Sodium Laureth Sulfate and Related Salts of Sulfated Ethoxylated Alcohols. **International Journal of Toxicology**, v. 29, supl. 4, p. 151-161, 2010.

RUSSELL, W. M. S.; BURCH, R. L. **The Principles of Humane Experimental Technique**, London: Universities Federation for Animal Welfare (UFAW), 1992. ISBN:0900767782.

Special Edition. Disponível em: < http://altweb.jhsph.edu/pubs/books/humane_exp/het-toc>. Acesso em: 02 dez. 2016.

SCHEEL, J.; KLEBER, M.; KREUTZ, J.; LEHRINGER, E.; MEHLING, A.; REISINGER, K.; STEILING, W. Eye irritation potential: Usefulness of the HET-CAM under the Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (GHS). **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 59, n. 3, p. 471–492, 2011.

SCOTT, L., ESKES, C., HOFFMANN, S., ADRIAENS, E., ALÉPÉE, N., BUFO, M., CLOTHIER, R., FACCHINI, D., FALLER, C., GUEST, R., HARBELL, J., HARTUNG, T., KAMP, H., LE VARLET, B., MELONI, M., MCNAMEE, P., OSBORNE, R., PAPE, W., PFANNENBECKER, U., PRINSEN, M., SEAMAN, C., SPIELMAN, H., STOKES, W., TROUBA, K., VAN DEN BERGHE, C., VAN GOETHEM, F., VASSALLO, M., VINARDELL, P., AND ZUANG, V. A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace in vivo studies using Bottom-Up and Top-Down approaches. **Toxicology in Vitro**, v. 24, n. 1, p. 1-9, 2010.

SCCS, Opinion on decamethylcyclopentasiloxane (cyclopentasiloxane, D5) in cosmetic products, Scientific Committee on Consumer Safety. 2015. Disponível em: < https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_174.pdf>. Acesso em: 20 mar. 2017.

UN. United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), ST/SG/AC.10/30 Rev 6, New York and Geneva: United Nations, 2015. Disponível em: <http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/06files_e.html>. Acesso em: 15 fev. 2017.

VAN De GRAAFF, K. M. Anatomia Humana. 6 ed. São Paulo: Manole, 2003.

VINARDELL, M. P.; MACIÁN, M. Comparative study of the Het-Cam test and the Draize eye test for assessment of irritancy potential. **Toxicology in Vitro**, v. 8, n. 3, p. 467-470, 1994.

WILHELMUS, K. R. The Draize Eye Test. **Survey of Ophthalmology**, v. 45, n. 6, 2001.

Apêndice

APÊNDICE A - Escore de hiperemia, hemorragia e coagulação e escore de irritação (MSc) com o desvio padrão de cada substância estudada estudadas (SDS 1%, LESS 27%, 10%, 7% e 1%, CGS 3% e 1,5%, polissorbato 20 a 100% e 10%, CAB 3% e 1,5) no ensaio de HET-CAM

Substância / concentração (%)/ nº replicata		**Hiperemia**	**Hemorragia**	**Coagulação**	**Escore de irritação (MSc)**
SDS 1% (1)	tempo de início	oculta	14 s	X	----------
	intensidade	X	severa	X	----------
	escore	5	7	X	12
SDS 1% (2)	tempo de início	oculta	16 s	X	----------
	intensidade	X	severa	X	----------
	escore	5	7		12
SDS 1% (3)	tempo de início	oculta	14 s	X	----------
	intensidade	X	severa	X	----------
	escore	5	7	X	12
SDS 1% (4)	tempo de início	oculta	27 s	X	----------
	intensidade	X	severa	X	----------
	escore	5	7	X	12
SDS 1% (5)	tempo de início	oculta	26 s	X	----------
	intensidade	X	severa	X	----------
	escore	5	7	X	12
SDS 1% (6)	tempo de início	oculta	17 s	X	----------
	intensidade	X	severa	X	----------
	escore	5	7	X	12
SDS 1% (7)	tempo de início	oculta	20 s	X	----------
	intensidade	X	severa	X	----------
	escore	5	7	X	12
SDS 1% (8)	tempo de início	oculta	18 s	X	----------
	intensidade	X	severa	X	----------
	escore	5	7	X	12
				Média ± DP	**12,00 ± 0,00**
LESS 27% (1)	tempo de início	oculta	35 s	46 s	----------
	intensidade	X	moderada	severa	----------
	escore	3	5	7	15
LESS 27% (2)	tempo de início	oculta	33 s	54 s	----------
	intensidade	X	moderada	severa	----------
	escore	3	5	7	15

continua

continuação

Substância / concentração (%)/ nº replicata		Hiperemia	Hemorragia	Coagulação	Escore de irritação (MSc)
LESS 27% (3)	tempo de início	oculta	20 s	45 s	----------
	intensidade	X	leve	leve	----------
	escore	5	7	7	19
LESS 27% (4)	tempo de início	oculta	14 s	1min17s	----------
	intensidade	X	moderada	severa	----------
	escore	5	7	7	19
LESS 27% (5)	tempo de início	oculta	11 s	53s	----------
	intensidade	X	moderada	severa	----------
	escore	5	7	7	19
LESS 27% (6)	tempo de início	oculta	8 s	1min44s	----------
	intensidade	X	moderada	severa	----------
	escore	5	7	7	19
LESS 27% (7)	tempo de início	oculta	25 s	1min26s	----------
	intensidade	X	leve	severa	----------
	escore	5	7	7	19
LESS 27% (8)	tempo de início	oculta	16 s	1min28s	----------
	intensidade	X	leve	severa	----------
	escore	3	7	7	17
				Média ± DP	**17,85 ± 1,95**
LESS 10% (1)	tempo de início	10 s	26 s	1min14s	----------
	intensidade	leve	leve	moderada	----------
	escore	5	7	5	17
LESS 10% (2)	tempo de início	4 s	34 s	1min26s	----------
	intensidade	leve	leve	moderada	----------
	escore	5	5	5	15
LESS 10% (3)	tempo de início	5 s	23 s	55 s	----------
	intensidade	leve	leve	moderada	----------
	escore	5	7	5	17
LESS 10% (4)	tempo de início	11 s	35 s	> 3 min	----------
	intensidade	leve	moderada	leve	----------
	escore	5	5	5	15
LESS 10% (5)	tempo de início	8 s	33 s	3min34s	----------
	intensidade	leve	moderada	leve	----------
	escore	5	5	5	15
LESS 10% (6)	tempo de início	oculta	35 s	53 s	----------
	intensidade	X	moderada	moderada	----------
	escore	3	5	7	15

continua

continuação

Substância / concentração (%)/ nº replicata		Hiperemia	Hemorragia	Coagulação	Escore de irritação (MSc)
LESS 10% (7)	tempo de início	33 s	59 s	> 3 min	----------
	intensidade	leve	moderada	leve	----------
	escore	3	5	5	13
LESS 10% (8)	tempo de início	15 s	35 s	> 2 min	----------
	intensidade	leve	moderada	leve	----------
	escore	5	5	5	15
				Média ± DP	**15,25 ± 1,28**
LESS 7% (1)	tempo de início	oculta	34 s	> 2 min	----------
	intensidade	X	severa	leve	----------
	escore	3	5	5	13
LESS 7% (2)	tempo de início	oculta	31 s	> 2 min	----------
	intensidade	X	severa	leve	----------
	escore	3	5	5	13
LESS 7% (3)	tempo de início	oculta	17 s	> 2 min	----------
	intensidade	X	severa	leve	----------
	escore	5	7	5	17
LESS 7% (4)	tempo de início	oculta	33 s	> 2 min	----------
	intensidade	X	severa	leve	----------
	escore	3	5	5	13
LESS 7% (5)	tempo de início	oculta	11 s	> 2 min	----------
	intensidade	X	severa	leve	----------
	escore	5	7	5	17
LESS 7% (6)	tempo de início	oculta	17 s	> 2 min	----------
	intensidade	X	severa	leve	----------
	escore	5	7	5	17
LESS 7% (7)	tempo de início	oculta	17 s	> 2 min	----------
	intensidade	X	severa	leve	----------
	escore	5	7	5	17
LESS 7% (8)	tempo de início	oculta	16 s	> 2 min	----------
	intensidade	X	severa	leve	----------
	escore	5	7	5	17
				Média ± DP	**15,50 ± 2,07**
LESS 1% (1)	tempo de início	oculta	39 s	X	----------
	intensidade	X	severa	X	----------
	escore	3	5	X	8

continua

continuação

Substância / concentração (%)/ nº replicata		Hiperemia	Hemorragia	Coagulação	Escore de irritação (MSc)
LESS 1% (2)	tempo de início	oculta	33 s	X	----------
	intensidade	X	severa	X	----------
	escore	3	5	X	8
LESS 1% (3)	tempo de início	oculta	20 s	X	----------
	intensidade	X	severa	X	----------
	escore	5	7	X	12
LESS 1% (4)	tempo de início	oculta	31 s	X	----------
	intensidade	X	severa	X	----------
	escore	3	5	X	8
LESS 1% (5)	tempo de início	oculta	41 s	X	----------
	intensidade	X	severa	X	----------
	escore	3	5	X	8
LESS 1% (6)	tempo de início	oculta	29 s	X	----------
	intensidade	X	severa	X	----------
	escore	5	7	X	12
LESS 1% (7)	tempo de início	oculta	34 s	X	----------
	intensidade	X	severa	X	----------
	escore	3	5	X	8
LESS 1% (8)	tempo de início	oculta	38 s	X	----------
	intensidade	X	severa	X	----------
	escore	3	5	X	8
				Média ± DP	**9,00 ± 1,85**
CGS 3% (1)	tempo de início	oculta	26 s	X	----------
	intensidade	X	moderada	X	----------
	escore	5	7	X	12
CGS 3% (2)	tempo de início	oculta	16 s	X	----------
	intensidade	X	severa	X	----------
	escore	5	7	X	12
CGS 3% (3)	tempo de início	oculta	16 s	X	----------
	intensidade	X	severa	X	----------
	escore	5	7	X	12
CGS 3% (4)	tempo de início	oculta	16 s	X	----------
	intensidade	X	severa	X	----------
	escore	5	7	X	12
CGS 3% (5)	tempo de início	oculta	15 s	X	----------
	intensidade	X	severa	X	----------
	escore	5	7	X	12

continua

continuação

Substância / concentração (%)/ nº replicata		Hiperemia	Hemorragia	Coagulação	Escore de irritação (MSc)
CGS 3% (6)	tempo de início	oculta	25 s	X	----------
	intensidade	X	severa	X	----------
	escore	5	7	X	12
CGS 3% (7)	tempo de início	oculta	25 s	X	----------
	intensidade	X	moderada	X	----------
	escore	5	7	X	12
CGS 3% (8)	tempo de início	oculta	16 s	X	----------
	intensidade	X	severa	X	----------
	escore	5	7	X	12
				Média ± DP	**12,00 ± 0,00**
CGS 1,5% (1)	tempo de início	oculta	24 s	X	----------
	intensidade	X	leve	X	----------
	escore	5	7	X	12
CGS 1,5% (2)	tempo de início	oculta	30 s	X	----------
	intensidade	X	leve	X	----------
	escore	5	7	X	12
CGS 1,5% (3)	tempo de início	oculta	17 s	X	----------
	intensidade	X	severa	X	----------
	escore	5	7	X	12
CGS 1,5% (4)	tempo de início	oculta	29 s	X	----------
	intensidade	X	leve	X	----------
	escore	5	7	X	12
CGS 1,5% (5)	tempo de início	oculta	25 s	X	----------
	intensidade	X	leve	X	----------
	escore	5	7	X	12
CGS 1,5% (6)	tempo de início	oculta	26 s	X	----------
	intensidade	X	moderado	X	----------
	escore	5	7	X	12
CGS 1,5% (7)	tempo de início	oculta	15 s	X	----------
	intensidade	X	severa	X	----------
	escore	5	7	X	12
CGS 1,5% (8)	tempo de início	oculta	29 s	X	----------
	intensidade	X	moderada	X	----------
	escore	5	7	X	12
				Média ± DP	**12,00 ± 0,00**

continua

continuação

Substância / concentração (%)/ nº replicata		Hiperemia	Hemorragia	Coagulação	Escore de irritação (MSc)
Polissorbato 20 100% (1)	tempo de início	X	49 s	1mim51s	----------
	intensidade	X	leve	leve	----------
	escore	X	5	7	12
Polissorbato 20 100% (2)	tempo de início	X	38 s	1mim13s	----------
	intensidade	X	moderada	moderada	----------
	escore	X	5	7	12
Polissorbato 20 100% (3)	tempo de início	X	1mim08s	2mim07s	----------
	intensidade	X	leve	leve	----------
	escore	X	5	5	10
Polissorbato 20 100% (4)	tempo de início	32 s	58 s	X	----------
	intensidade	leve	leve	X	----------
	escore	3	5	X	8
Polissorbato 20 100% (5)	tempo de início	oculta	23 s	X	----------
	intensidade	X	moderada	X	----------
	escore	5	7	X	12
Polissorbato 20 100% (6)	tempo de início	32 s	2mim12s	X	----------
	intensidade	leve	leve	X	----------
	escore	3	3	X	6
Polissorbato 20 100% (7)	tempo de início	36 s	1mim14s	X	----------
	intensidade	leve	leve	X	----------
	escore	3	5	X	8
				Média ± DP	**9,71 ± 2,43**
Polissorbato 20 10% (1)	tempo de início	39 s	1mim58s	X	----------
	intensidade	leve	leve	X	----------
	escore	3	5	X	8
Polissorbato 20 10% (2)	tempo de início	X	30 s	X	----------
	intensidade	X	leve	X	----------
	escore	X	7	X	7

continua

continuação

Substância / concentração (%)/ nº replicata		Hiperemia	Hemorragia	Coagulação	Escore de irritação (MSc)
Polissorbato 20 10% (3)	tempo de início	X	48 s	X	----------
	intensidade	X	leve	X	----------
	escore	X	5	X	5
Polissorbato 20 10% (4)	tempo de início	X	1mim01s	X	----------
	intensidade	X	leve	X	----------
	escore	X	5	X	5
Polissorbato 20 10% (5)	tempo de início	43 s	2 mim	X	----------
	intensidade	leve	leve	X	----------
	escore	3	3	X	6
Polissorbato 20 10% (6)	tempo de início	> 2 mim	2 mim	X	----------
	intensidade	leve	leve	X	----------
	escore	1	3	X	1
Polissorbato 20 10% (7)	tempo de início	X	1mim38s	X	----------
	intensidade	X	leve	X	----------
	escore	X	5	X	5
Polissorbato 20 10% (8)	tempo de início	33 s	41 s	X	----------
	intensidade	leve	leve	X	----------
	escore	3	5	X	8
				Média ± DP	**5,62 ± 2,26**
CCMG 3% (1)	tempo de início	oculta	16 s	X	----------
	intensidade	X	severa	X	----------
	escore	5	7	X	12
CCMG 3% (2)	tempo de início	oculta	16 s	X	----------
	intensidade	X	severa	X	----------
	escore	5	7	X	12
CCMG 3% (3)	tempo de início	oculta	12 s	X	----------
	intensidade	X	severa	X	----------
	escore	5	7	X	12
CCMG 3% (4)	tempo de início	oculta	14 s	X	----------
	intensidade	X	severa	X	----------
	escore	5	7	X	12

continua

continuação

CCMG 3% (5)	tempo de início	oculta	27 s	X	----------
	intensidade	X	severa	X	----------
	escore	5	7	X	12
CCMG 3% (6)	tempo de início	oculta	18 s	X	----------
	intensidade	X	severa	X	----------
	escore	5	7	X	12
CCMG 3% (7)	tempo de início	oculta	11 s	X	----------
	intensidade	X	severa	X	----------
	escore	5	7	X	12
CCMG 3% (8)	tempo de início	oculta	14 s	X	----------
	intensidade	X	severa	X	----------
	escore	5	7	X	12
				Média ± DP	**12,00 ± 0,00**
CCMG 1,5% (1)	tempo de início	oculta	20 s	X	----------
	intensidade	X	moderada	X	----------
	escore	5	7	X	12
CCMG 1,5% (2)	tempo de início	oculta	29 s	X	----------
	intensidade	X	moderada	X	----------
	escore	5	7	X	12
CCMG 1,5% (3)	tempo de início	oculta	28 s	X	----------
	intensidade	X	moderada	X	----------
	escore	5	7	X	12
CCMG 1,5% (4)	tempo de início	oculta	27 s	X	----------
	intensidade	X	moderada	X	----------
	escore	5	7	X	12
CCMG 1,5% (5)	tempo de início	oculta	18 s	X	----------
	intensidade	X	leve	X	----------
	escore	5	7	X	12
CCMG 1,5% (6)	tempo de início	oculta	19 s	X	----------
	intensidade	X	leve	X	----------
	escore	5	7	X	12
CCMG 1,5% (7)	tempo de início	oculta	27 s	X	----------
	intensidade	X	moderada	X	----------
	escore	5	7	X	12
CCMG 1,5% (8)	tempo de início	oculta	25 s	X	----------
	intensidade	X	moderada	X	----------
	escore	5	7	X	12
				Média ± DP	**12,00 ± 0,00**

continua

continuação

Substância / concentração (%)/ nº replicata		Hiperemia	Hemorragia	Coagulação	Escore de irritação (MSc)
CAB 3% (1)	tempo de início	oculta	9 s	36 s	----------
	intensidade	X	severa	moderada	----------
	escore	5	7	7	19
CAB 3% (2)	tempo de início	oculta	10 s	1mim28s	----------
	intensidade	X	severa	moderada	----------
	escore	5	7	7	19
CAB 3% (3)	tempo de início	oculta	12 s	58 s	----------
	intensidade	X	severa	moderada	----------
	escore	5	7	7	19
CAB 3% (4)	tempo de início	oculta	11 s	31 s	----------
	intensidade	X	severa	moderada	----------
	escore	5	7	7	19
CAB 3% (5)	tempo de início	oculta	14 s	1mim41s	----------
	intensidade	X	severa	leve	----------
	escore	5	7	7	19
CAB 3% (6)	tempo de início	oculta	10 s	1mim53s	----------
	intensidade	X	severa	leve	----------
	escore	5	7	7	19
CAB 3% (7)	tempo de início	oculta	9 s	1mim23s	----------
	intensidade	X	severa	leve	----------
	escore	5	7	7	19
CAB 3% (8)	tempo de início	oculta	11 s	1mim20s	----------
	intensidade	X	severa	leve	----------
	escore	5	7	7	19
				Média ± DP	**19,00 ± 0,00**
CAB 1,5% (1)	tempo de início	oculta	15 s	> 2 mim	----------
	intensidade	X	severa	leve	----------
	escore	5	7	5	17
CAB 1,5% (2)	tempo de início	oculta	15 s	> 2 mim	----------
	intensidade	X	severa	leve	----------
	escore	5	7	5	17
CAB 1,5% (3)	tempo de início	oculta	14 s	> 2 mim	----------
	intensidade	X	severa	leve	----------
	escore	5	7	5	17

continua

continuação

Substância / concentração (%)/ nº replicata		Hiperemia	Hemorragia	Coagulação	Escore de irritação (MSc)
CAB 1,5% (4)	tempo de início	oculta	17 s	> 2 mim	----------
	intensidade	X	severa	leve	----------
	escore	5	7	5	17
CAB 1,5% (5)	tempo de início	oculta	15 s	X	----------
	intensidade	X	severa	X	----------
	escore	5	7	X	12
CAB 1,5% (6)	tempo de início	oculta	17 s	1mim04s	----------
	intensidade	X	severa	moderada	----------
	escore	5	7	7	19
CAB 1,5% (7)	tempo de início	oculta	12 s	X	----------
	intensidade	X	severa	X	----------
	escore	5	7	X	12
CAB 1,5% (8)	tempo de início	oculta	10 s	48 s	----------
	intensidade	X	severa	moderada	----------
	escore	5	7	7	19
				Média ± DP	**15,62 ± 3,11**

conclusão