

**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

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 cyclopentasiloxane, 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, histopathology

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 córneo-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.

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, conseqüentemente, 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.

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 Corneal 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.; WALLER, 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, Cetaryl Methicone, Cetyl Dimethicone, Dimethoxysilyl Ethylenediaminopropyl Dimethicone, Hexyl Methicone, Hydroxypropyldimethicone, Stearamidopropyl Dimethicone, Stearyl Dimethicone, Stearyl Methicone, and Vinyl dimethicone. **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.