

APLICABILIDADE DOS MÉTODOS ALTERNATIVOS À UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS EM TESTES DE COSMÉTICOS: UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.

Júlia Eduarda Teixeira BARBOSA¹, Mariana Aparecida TAVARES¹, Marília Gabriela Corrêa e SOUSA¹, Willieny Sabrina de JESUS¹; Juliana Martins MACHADO².

- (1) Acadêmico do Curso de Biomedicina do Centro Universitário UNA, Bom Despacho, Minas Gerais, Brasil.
- (2) Docente do Curso de Biomedicina do Centro Universitário UNA, Bom Despacho, Minas Gerais Brazil

Autor correspondente
Juliana Martins Machado
Rodovia BR-262, Km 480, s/n - Zona Rural
Bom Despacho - MG, 35600-000
+55 37 99149-5076
E-mail: juliana.m.machado@prof.una.br

Declaração de conflito de interesse dos autores: Os autores do artigo declaram que não houve nenhuma situação de conflito de interesse, tais como propostas de financiamento, emissão de pareceres, promoções ou participação em comitês consultivos ou diretivos, entre outras, que pudessem influenciar no desenvolvimento do trabalho.

RESUMO

Os maus tratos aos animais durante o desenvolvimento e pesquisa de produtos cosméticos, tem ganhado repercussão na sociedade e nas redes sociais. Diante disso, métodos alternativos têm sido discutidos e avaliados para a substituição do uso dos animais em testes de cosméticos. Com o propósito de acabar com o sofrimento provocado aos animais, têm-se aprimorado metodologias capazes de garantir a segurança dos produtos e o bem estar dos animais. O objetivo deste artigo é discutir, examinar e compreender como são executados os métodos alternativos, com a finalidade de substituir o modelo animal como cobaias em testes de cosméticos. Para este propósito foi realizada uma revisão de artigos científicos, que analisam e discutem tal fator, além de materiais que visam e abordam as legislações de proteção animal. Com este estudo observou-se métodos que avaliam a sensibilização da irritação e corrosão da pele, potencial de irritação e corrosão ocular, fototoxicidade, absorção cutânea, toxicidade aguda, genotoxicidade, toxicidade reprodutiva e métodos *in silico*, já são validados pela OECD e podem ser uma alternativa para a indústria. No entanto, conclui-se que ainda existem métodos que não substituem totalmente os animais, e outros que ainda precisam ser aprimorados, evidenciando a necessidade de mais estudos nesta área.

Palavras-chave: Animais; Pesquisa; Métodos Alternativos; Cosméticos.

ABSTRACT

The mistreatment of animals during the development and research of cosmetic products has gained repercussions in society and social networks. Given this, alternative methods have been discussed and taken to replace the use of animals in cosmetic testing. In order to end the suffering caused to animals, methodologies capable of guaranteeing the safety of products and the well-being of animals have been improved. The purpose of this article is to discuss, examine and understand what alternative methods are, with a resource to replace the animal model as guinea pigs in cosmetic tests. For this purpose, a review of scientific articles was carried out, which analyze and discuss this factor, in addition to materials that aim at and address animal protection legislation. With this study, methods that assess the sensitization of skin irritation and corrosion, potential for eye irritation and corrosion, phototoxicity, skin absorption, acute toxicity, genotoxicity, reproductive toxicity and methods in silica were observed, which are already validated by the OECD and can be an alternative for the industry. However, it is concluded that there are still methods that do not fully replace animals, and others that still need to be improved, highlighting the need for further studies in this area.

Keywords: Animals; Search; Alternative Methods; Cosmetics.

1 Introdução

Com a inovação e modernização das tecnologias, o mundo se encontra em uma nova era. Os testes em animais é uma prática comum na história da medicina, e por muito tempo a utilização de cobaias para testes de produtos foi considerada como uma “mera” questão técnica pela indústria cosmética. Contudo, existem novas técnicas que permitem substituição, redução e até mesmo, a não utilização dos animais, conduzindo ao aperfeiçoamento e melhoria nos produtos para a população.

O uso dos animais na Ciência, de forma ampla, mas em primeiro lugar em estudos farmacológicos, medicinais e de cosméticos, é uma história extensa e de bastante impacto social, sendo uma questão bastante polêmica. Esta prática tem sido impugnada e indagada há muitos anos, no entanto, sabe-se que uma ação que foi praticada a tanto tempo não se erradica com facilidade (BARBOSA, 2019).

De acordo com Clark (1977, p.13-14, *apud* PAIXÃO, 2001, p.23) desde sempre, o homem foi capaz de analisar e utilizar os seus escassos domínios a seu favor para realizar as caças, já distinguindo o coração como um órgão essencial a ser alcançado, para uma caça perfeita. Segundo Paixão (2001), para Aristóteles (384-322 a.C.), os estudos realizados com animais são indispensáveis. Além disso, o mesmo pode ser considerado como fundador da anatomia comparada, tendo dissecado mais de 50 linhagens de animais.

Os experimentos iniciais com animais vivos, foram efetuados na primeira metade do século III a.C., Herófilo principiou a dissecação animal em público em uma Escola de Alexandria, onde também Erasístrato comprovou que as artérias quando cortadas e ainda com vida, contêm sangue, sendo ele o fundador da fisiologia experimental (TOLEDO, 2019, *apud* BARBOSA, 2019, p. 4).

O pensamento cartesiano predominou por um longo período, com uma ideia de que os animais eram máquinas para servir a humanidade e as suas aflições, sofrimentos e tormentos, não careceriam de preocupações e não precisavam ser considerados. (BARBOSA, 2019, p. 4, *apud* TOLEDO, 2019).

Segundo Toledo (2019, *apud* BARBOSA, 2019, p. 4), Bernard desenvolveu uma técnica científica, que é predominante na prática e teoria da Biomedicina, considerando que toda ciência biomédica se manifesta do laboratório e toda tentativa experimental em laboratório biomédico é praticado em animais. Bernard então foi conhecido como o maior

fisiologista da época, usando e repassando o uso dos animais como o mais valioso método.

Nesta mesma época, James Ferguson (1710-1776) era explorador de técnicas alternativas, ele reprovava o sofrimento animal em experiências sobre a respiração. Cientistas começaram a discordar de ideias e pensamento sobre a questão dos animais, e assim se iniciou novos tempos, onde, de um lado o uso desses animais crescia, de outro, surgia na área da ciência uma inquietação com o bem-estar animal (RYDER, 1989, p. 64, *apud* BARBOSA, 2019, p. 4).

Vários países se dedicam a novas investigações que sejam eficientes e apropriadas para métodos de testes em cosméticos. A preocupação por novos métodos alternativos, é compartilhada por muitos cientistas ao redor do mundo e as explicações para contribuir com tal ação são diversas tais como a economia e a ética. Além disso, alterações nos estados emocionais do animal, podem gerar resultados com muitas variações aos testes. (SILVA, 2013).

Silva (2013, p. 9), afirma que “a utilização de qualquer modelo não humano para mimetizar seu organismo, sendo ele um modelo de macaco, roedor ou micro-organismo, se afastará gradualmente do ideal de um modelo perfeito humano” Uma técnica que se assemelha ao organismo humano, está longe de ser criada, entretanto, com as atuais pesquisas e esforços para que tais parâmetros aconteçam em contextos dose-resposta e dose-concentração, métodos alternativos possivelmente podem ser executados *in vitro* e *in sílico*.

Além disso, existe o conceito dos 3R's que é uma estratégia utilizada para minimizar o uso de animais, diminuindo a dor e sofrimento causados aos mesmo durante os experimentos. Ela se baseia na redução, refinamento e substituição, ou seja, **reduzir** o número total de animais utilizados nos testes; quando forem utilizados deve-se planejar e **refinar** os procedimentos para causar o mínimo de dor e sofrimento; e, quando possível devem ser **substituídos** por modelos alternativos (cultura de células) ou organismos inferiores (microrganismos). A substituição pode ser subdividida em: substituição relativa onde os animais utilizados nos testes não são submetidos ao sofrimento durante os testes; e substituição absoluta que não utiliza animais em nenhuma fase do experimento (DOKE, 2015).

Como exemplo de aplicação da estratégia 3R's pode-se citar: a cultura de células *in vitro* como forma de reduzir o uso de animais, em que modelos equivalentes à epiderme possuem em sua composição queratinócitos extraídos de uma pequena biopsia da pele humana e são utilizados como ferramenta em estágios iniciais; refinar e enriquecer o ambiente das gaiolas cuidando dos animais pode reduzir o estresse, dor e angústia dos animais durante os procedimentos; modelos alternativos podem ser utilizados em estágios preliminares dos testes como forma de substituição, ou seja, modelos que podem oferecer informações sobre possíveis resultados em modelos vivos, são eles, tais como a cultura celular, novas técnicas de imagem e modelos computacionais (DOKE, 2015).

Certamente, esse desenvolvimento se fez e se faz necessário, devido há vários fatores bioéticos e de grande valor para a sociedade. Tal metodologia dá-se por causas humanitárias, com o extraordinário processo de evolução que permite uma realidade superior.

Os problemas relacionados ao uso dos animais em validação de cosméticos como cobaias, vão desde aos maus tratos dos animais, danos oculares e dermatológicos, e o manejo inadequado que pode levar até mesmo o animal a morte. Além da questão ética, outras desvantagens estão relacionadas ao uso dos animais, tais como, a dificuldade de mão de obra especializada para a manipulação dos mesmos e o alto custo referente a criação, alojamento e protocolos.

Levando em consideração o atual cenário sobre a utilização de animais em testes de cosméticos, e a crescente repercussão do assunto na sociedade em geral, e principalmente nas redes sociais, que trouxeram à tona a vulnerabilidade dos animais utilizados nos ensaios, e a necessidade de métodos alternativos o objetivo deste artigo é discutir, examinar e compreender como são executados os métodos alternativos, com a finalidade de substituir o modelo animal como cobaias em testes de cosméticos. Para este propósito será estudado artigos científicos que analisam e discutem tal fator, além de materiais que visam e abordam as legislações de proteção animal.

2 Metodologia

Este artigo consiste em uma revisão bibliográfica, em que foram consultadas as seguintes bases de dados: Google Acadêmico, Pubmed e Scielo. Como descritores foram utilizados: animal testing, teste em animais, cosméticos e métodos alternativos todos em

associação ou separados, conforme o site de pesquisa. Como critério de seleção, foram incluídos neste estudo, os publicados no período de 2000 a 2021, redigidos em língua portuguesa e inglesa, disponíveis na íntegra e gratuitamente. Foram excluídos artigos que não reconhecia os métodos alternativos ou que não abordassem o assunto de forma direta.

3 Resultados e Discussão

Após a análise dos dados obtidos, considerando os critérios de inclusão e exclusão estabelecidos, foram selecionados 26 artigos para serem lidos de forma íntegra e discutidos nesta revisão.

3.1 Questão ética e o uso dos animais nas principais nações, incluindo o Brasil

O uso de animais para testes em laboratório é de preocupação mundial, tanto que em 1978, a Declaração Universal dos Direitos dos Animais foi proclamada pela UNESCO (que é responsável pela proteção e bem-estar animal), a mesma estabelece que todo animal tem direito a vida e ao respeito e afirma que nenhum deverá ser submetido a atos cruéis e a maus tratos (UNESCO, 2002).

Nos ensaios experimentais realizados pela indústria, às vezes é necessário utilizar o animal inteiro (considerando órgãos e tecidos), ou de forma isolada, apenas órgãos alvos e tecidos para análises. Para esta finalidade é necessário sacrificá-los através de alguns métodos pré-estabelecidos, o que pode acarretar o sofrimento desses animais. Diante disso e do argumento primordial que os animais por serem seres vivos, não deveriam passar por essa dor, torna-se não ético o seu uso na experimentação, e, portanto, deve ser repudiado (DISNER, 2019).

A experimentação com animais, além de sofrimento físico também causa um sofrimento psíquico ao animal que em grande parte dos experimentos finalizados são abatidos, o que torna o método incompatível com os direitos dos animais. Além disso, o estresse causado durante os testes pode comprometer os resultados finais, gerando falsos-negativos ou falsos-positivos. Portanto, faz-se necessário a elaboração e desenvolvimento de novas técnicas que não utilizem o modelo animal, e que sejam mais eficientes (VASCONCELOS, 2018).

Por ser um tema de preocupação mundial, alguns países já aboliram os testes em animais, que foram substituídos por métodos alternativos mais eficazes. Determinados

produtos não podem ser colocados no mercado caso não haja um método alternativo que comprove a sua segurança toxicológica. Seguindo esta tendência, a União Europeia, em 11 de março de 2013, comunicou a proibição do uso de animais em testes de laboratório. Esse é um gesto de muita importância, devido a influência que pode ser gerada nos outros países, conduzindo a mudanças globais significativas (VASCONCELOS, 2018).

Já no Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que é responsável pela regulação, fiscalização e controle sanitário do mercado consumidor, torna obrigatório os testes de cosméticos em animais. Porém, em janeiro de 2014, uma Lei do Estado de São Paulo nº 15.316, mudou esse cenário, proibindo o uso de animais para testes de cosméticos como resposta às manifestações de ativistas da causa animal (AQUINO, 2016).

A Lei Arouca, nº 11.794 foi sancionada em 08 de outubro de 2008, e que já incluía alguns princípios dos 3R's em certas práticas. Dentre os destaques tem-se os artigos 14 e 15 que discutem acerca do bem-estar animal, propondo a minimização da dor e sofrimento, reduzindo a quantidade de animais utilizados e restringindo os experimentos que envolvem um grau elevado de danos. Porém o artigo 1, destaca que o uso de animais fica restrito a instituições de ensino superior para atividades educacionais de nível médio da área biomédica, ou seja, ao invés de tentar reduzir ou abolir as práticas vivisseccionistas a lei estaria regulamentando o uso dos animais. Atualmente ainda é uma Lei muito questionada, pois tendo em vista o avanço tecnológico e com ele os vários métodos alternativos que estão por vir, não se justifica o uso de práticas cruéis e dolorosas que colocam um fim à vida dos animais (SILVA, 2013).

3.2 Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil

No Brasil, recentemente a Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial (ABDI) publicou algumas diretrizes baseadas nas metodologias da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), indicadas como alternativas aos ensaios com animais, utilizando dos 3R's e uma breve discussão sobre tais metodologias serão abordadas neste estudo.

3.2.1 Testes para avaliação do potencial de sensibilização, de irritação e de corrosão da pele:

3.2.1.1 Método OECD DT 430 - Corrosão cutânea *in vitro* - teste para avaliar a resistência elétrica transcutânea

Quadro 1 - MÉTODO OECD DT 430

Objetivo	Materiais	Resultados
Identificar através de análise <i>in vitro</i> , substâncias corrosivas.	Discos de pele de rato.	Confere a habilidade da substância em causar a perda da integridade do estrato córneo e confere a sua função de barreira.

Fonte: ABDI Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial, 2019.

É um método simples e competente para avaliar a função da barreira pela passagem de íons pela pele, operando um aparelho de ponte de *Wheatstone*. Neste teste é utilizado a pele de rato, e estudos de validação relatam que o método é capaz de identificar se a substância é corrosiva, possuindo uma sensibilidade de 94% e especificidade de 71%. Esta metodologia usa como enfoque os “3Rs”, utilizando apenas o de Reduzir, uma vez que ainda utiliza animais para a sua execução (LARANJEIRA, 2015).

3.2.1.2 Método OECD DT 431 - Corrosão cutânea *in vitro* – Teste da epiderme humana reconstruída

Quadro 2 - MÉTODO OECD DT 431

Objetivo	Materiais	Resultados
Avaliar a corrosão dérmica <i>in vitro</i> .	Modelo 3D de epiderme construída através de queratinócitos epidérmicos de humanos.	As substâncias corrosivas são aptas para entrar no estrato córneo por difusão ou erosão, verificando a citotoxicidade às células das camadas mais profundas.

Fonte: ABDI Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial, 2019.

Comenta-se de forma ampla, que um modelo 3D da pele humana reconstruída é um teste de grande valia, uma vez que, a pele humana é um local tridimensional, manifesta diversos receptores, com a competência de propagação, metabolismo local e a biossíntese da matriz extracelular. Infelizmente ainda existem algumas imperfeições que faz o modelo ser inferior à pele humana, entretanto superior aos modelos de monocamada (ALMEIDA, 2020).

Esses modelos são validados no Brasil, mas produzidos no exterior e são vendidos em kits, impossibilitando o uso em certas pesquisas que compreendem mudanças moleculares ou morfológicas. Assim sendo, a pele humana reconstruída de forma tridimensional, válida no Brasil é de bastante destaque para as indústrias (PEDROSA, 2016, *apud* ALMEIDA, 2020, p. 42).

3.2.1.3 Método OECD DT 435 - Teste de membrana de barreira *in vitro* para corrosão da pele

Quadro 3 - MÉTODO OECD DT 435

Objetivo	Materiais	Resultados
Ter respostas a substâncias corrosivas de forma parecida à pele animal <i>in situ</i> de coelhos.	Membrana artificial.	Identifica prejuízo à membrana depois do uso do composto na membrana artificial.

Fonte: ABDI Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial, 2019.

Este teste usa como substituição aos animais uma membrana artificial com o mesmo mecanismo de corrosão na pele viva. É adequado para testar líquidos, sólidos e emulsões, mas infelizmente não é aplicável a testes para gases e aerossóis. O método foi validado com uma sensibilidade de 86% e uma precisão de 81%. Existindo um resultado negativo é necessário um teste adicional de irritação da pele *in vitro*, para classificar o produto químico da análise (OECD, 2014).

3.2.1.4 Método OECD DT 439 - Irritação cutânea *in vitro* – Teste de reconstrução da epiderme humana

Quadro 4 - MÉTODO OECD DT 439

Objetivo	Materiais	Resultados
Identificar componentes químicos irritantes expressos através de eritema ou edema.	Epiderme humana reconstituída em laboratório.	Resulta vários acontecimentos por causa da penetração do composto através do estrato córneo, rompendo camadas de queratinócitos e diferentes células da pele.

Fonte: ABDI Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial, 2019.

Este método fundamenta-se no uso de teste *in vitro* da epiderme humana reconstruída, que reproduz basicamente a uma original as propriedades e funções fisiológicas e bioquímicas da epiderme. É manuseado queratinócitos não transformados de humanos, para a construção de um modelo epidérmico (MORETTO, STEPHANO, 2019).

Este método exige que os produtos em estudos sejam expostos topicamente a um modelo tridimensional de RhE de 15 a 60 minutos, alterando o tempo de acordo com o material selecionado. Nos testes de irritação de acordo com o protocolo, para que ele seja classificado como irritante, é obrigatório que a sua viabilidade mostre ser inferior a 50%, quando se trata de um estudo de comparação de controle negativo (MINI, 2020).

3.2.1.5 Método OECD DT 429 - Sensibilização cutânea: ensaio do gânglio linfático local

Quadro 5 - MÉTODO OECD DT 429

Objetivo	Materiais	Resultados
Analisar a fase de início da sensibilização alérgica pelo contato da pele.	Camundongos (não excluí o uso de animais, mas utiliza dos 3R, realizando a redução e o refinamento)	Oferece respostas para a avaliação da dose-resposta.

Fonte: ABDI Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial, 2019.

O método requer menos animais, mas ainda não alcançou o R de substituição, consequentemente, o teste é recomendado somente quando necessário. Esta análise oferece uma observação de resposta à dose, o que permite ponderações em relação a potência da substância em teste. É um teste mais rápido levando apenas 6 dias, além disso não promove hipersensibilidade dérmica, reduzindo o sofrimento causado ao animal. Contudo, possui algumas limitações como a apresentação de resultados falsos positivos de substâncias com alto nível de irritação (ROVIDA, 2011).

3.2.1.6 Método OECD DT 442A - Versões não radioativas do Ensaio do Linfonodo Local

Quadro 6 - MÉTODO OECD DT 442A

Objetivo	Materiais	Resultados
Calcular o aumento de linfócitos e verifica a conclusão da sensibilidade.	Timina ou iodo radioisotópico.	Os sensibilizadores influenciam o aumento dos linfócitos nos linfonodos que drenam a área onde a substância que está sendo estudada é utilizada.

Fonte: ABDI Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial, 2019.

O método tem como objetivo estudar a fase de indução a sensibilização da pele, fornecendo informações quantitativa que avaliam se a substância em análise é sensibilizante ou não, possui como vantagem a qualidade para detectar sensibilizadores cutâneos, sem a utilização de marcadores radioativos (LARANJEIRA, 2015).

É fundamentado na medição do teor de adenosina trifosfato (ATP) através da bioluminescência, que indicam o aumento do número dos linfócitos nos linfonodos, o próprio usa a enzima de luciferase com o intuito de catalisar a geração da luz diante ao ATP e luciferina. Acontece uma proliferação através da quantificação por bioluminescência entre o grupo controle e o grupo tratado, essa proliferação deve ser ≥ 1.8 para que a substância que está sendo analisada seja validada como um sensibilizante (LARANJEIRA, 2015).

3.2.1.7 Método OECD DT 442B - Versões não radioativas do Ensaio do Linfonodo Local

Quadro 7 - MÉTODO OECD DT 442B

Objetivo	Materiais	Resultados
Medir a proliferação dos linfócitos.	5-bromo-2-desoxiuridina não radiomarcada (BrdU), se basea no teste ELISA.	Resulta na medição da proliferação dos linfócitos.

Fonte: ABDI Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial, 2019.

Diferente dos demais testes que utilizam cobaias, este método é capaz de reduzir o número de animais utilizados para este mesmo fim, e também promove melhorias no bem-estar e diminui o estresse animal. Embora tantas vantagens, existem alguns quesitos que privilegiam o uso desses animais, como por exemplo testes em algumas composições

químicas, que sejam pouco solúveis ou não solúveis, certos metais que dão como resultados falsos positivos com substâncias altamente irritantes a pele. Contudo deve-se considerar os resultados do teste a ser realizado, conferindo se o mesmo irá originar resultados cientificamente válidos (OECD, 2018).

3.2.1.8 Método OECD DT 442C - Sensibilização cutânea química – teste de ensaio direto de reatividade do peptídeo (DPRA)

Quadro 8 - MÉTODO OECD DT 442C

Objetivo	Técnica	Resultados
Quantificar e detectar a concentração dos peptídeos restantes contendo cisteína ou lisina.	Cromatografia líquida de alta eficiência.	Verifica o início da sensibilização da pele através da reatividade proteica.

Fonte: ABDI Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial, 2019.

Este método quantifica as concentrações de peptídeo contendo a cisteína ou lisina após incubação de 24h com o teste químico, esta concentração é avaliada através da cromatografia líquida de alta performance (HPLC), assim é calculado os valores de cisteína e do peptídeo de lisina e utilizados em um modelo de predição que reconhece o produto químico em teste nas classificações de reatividade que são usadas para adequação em sensibilizadores e não sensibilizadores (OECD, 2015).

3.2.1.9 Método OECD DT 442D - Ensaios de sensibilização cutânea in vitro que abordam o evento AOP chave sobre a ativação do queratinócito

Quadro 9 - MÉTODO OECD DT 442D

Objetivo	Materiais	Resultados
Identificar através do sinal de luciferase a ativação de sensibilizadores dos genes endógenos, dependentes do fator Nrf2.	Linha celular imortalizada aderente, originada de queratinócitos humanos, transportadores estáveis de um gene repórter de luciferase, sob o comando da resposta antioxidante do gene AKR1C2 humano.	Demonstração da citotoxicidade do produto.

Fonte: ABDI Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial, 2019.

Materiais em testes de sensibilização dérmica, são verificados mediante a quantificação dos sinais da luciferase, através da luminescência. Este método é eficaz para a verificação de alergênicos (BEZERRA, 2019).

É apropriado para produtos químicos que englobam diferentes grupos funcionais orgânicos, capacidade de sensibilização da pele, mecanismos de ação e suas propriedades físico-químicas. Outros produtos que não se encaixem a essas condições podem ser testadas em baixas concentrações (OECD, 2018).

3.2.2 Testes para avaliação do potencial de irritação e corrosão ocular:

3.2.2.1 Método OECD DT 437 - Método de Teste de Opacidade e Permeabilidade da Córnea Bovina para Identificação:

- i) Substâncias Químicas Indutoras de Danos Oculares Graves
- ii) Substâncias Químicas que Não Requerem Classificação para Irritação nos Olhos ou para Dano Ocular Grave.

Quadro 10 - MÉTODO OECD DT 437

Objetivos	Materiais	Resultados
Avaliar o potencial risco de uma substância química ao olho e capacidade de induzir opacidade e aumentar a permeabilidade em uma córnea bovina.	Utiliza córneas isoladas dos olhos de gado recém abatido, corante de fluoresceína de sódio, substâncias químicas, espectrofotômetro de luz visível e um opacitômetro.	Intervalos de controles positivos, negativos e de benchmark aceitáveis em relação a dados históricos.

Fonte: ABMI Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial, 2019.

Na sua primeira avaliação, o teste de BCOP foi avaliado pela sua capacidade de identificar substâncias químicas que causam danos oculares graves. Já na sua segunda, avaliação, foi avaliado a competência de identificação de substâncias químicas que não são classificadas como irritação e corrosão ocular grave. A partir desse método conclui-se que pode identificar corretamente essas substâncias que são corrosivos graves ou não ao olho, conforme definido pela ONU. Os animais que são utilizados são bovinos recém abatidos para consumo humano, apenas animais saudáveis são utilizados como fonte de córneas para os testes (MORETTO, STEPHANO, 2019).

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 (Sá, 2017, p. 16, *apud* OECD, 2013).

3.2.2.2 Método OECD DT 438 - Método de teste ocular isolado da galinha, para identificar:

- i) Substâncias químicas que provocam lesões oculares graves.
- ii) Substâncias químicas que não requerem classificação para irritação ocular ou lesões oculares graves.

Quadro 11 - MÉTODO OECD DT 438

Objetivos	Materiais	Resultados
Identificar substâncias químicas que causam danos oculares graves e substâncias químicas que não exijam classificação para irritação ocular ou lesões oculares graves.	Utiliza córneas de frangos recém abatidos, corante de fluoresceína de sódio, substâncias químicas, um opacitômetro, aparelho de superfusão, dispositivo de medição de profundidade no microscópio de lâmpada de fenda.	Aprovado como um teste inicial, e que tem maior eficácia quando aplicado com outros testes alternativos.

Fonte: ABDI Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial, 2019.

Embora não seja um teste válido para total substituição do teste em coelhos *in vivo*, ele é um teste inicial dentro da estratégia de testes, para identificar substâncias que causam danos oculares graves e danos que não exigem classificação de irritação e corrosão (MORETTO, STEPHANO, 2019).

O método de teste ICE é um modelo organotípico que fornece, em curto prazo, a manutenção ocular da galinha *in vitro*. Neste método de teste, o dano pela substância química é avaliado pela determinação do edema da córnea, da opacidade e da retenção de fluoresceína (MORETTO, STEPHANO, 2019, p. 374-375).

3.2.2.3 Método OECD DT 460 - Método de teste de vazamento de fluoresceína para identificação de corrosivos oculares e irritantes severos.

Quadro 12 - MÉTODO OECD DT 460

Objetivos	Materiais	Resultados
Classifica substâncias químicas, como corrosivos oculares e irritantes graves.	Ensaio <i>in vitro</i> realizado na monocamada de células epiteliais tubulares de MDCK (células de rim canino). Solventes contendo cálcio e salina (sem vermelho fenol).	O FL é recomendado como passo inicial para os testes alternativos, já que não é um substituto completo para os testes em animais.

Fonte: ABDI Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial, 2019.

Apesar do teste de fluoresceína não seja considerado um substituto completo para a substituição do teste em olho de coelho *in vivo*, esse teste é recomendado e usado como uma estratégia escalonada para identificar os tipos de rotulagem regulamentar, sendo assim indicado como um teste inicial dentro do top-down (método descendente) para identificar irritantes e corrosivos severos (MORETTO, STEPHANO, 2019, p. 404).

O objetivo desta Diretriz de Teste é descrever os procedimentos usados para avaliar a potencial corrosividade ocular ou de irritação grave de uma substância de teste, medindo sua capacidade de induzir dano a uma monocamada epitelial confluyente impermeável. A integridade da permeabilidade transepitelial é uma função importante de um epitélio como o encontrado na conjuntiva e na córnea. A permeabilidade transepitelial é controlada por várias junções estreitas. O aumento da permeabilidade do epitélio da córnea *in vivo* demonstrou correlacionar-se com o nível de inflamação e danos na superfície observados à medida que a irritação ocular se desenvolve (MORETTO, STEPHANO, 2019, p. 405).

3.2.2.4 Método OECD DT 491 - Método de teste in vitro de exposição a curto prazo para identificação de:

- i) Substâncias químicas que produzem danos graves ao olho.
- ii) Produtos químicos que não requerem classificação para irritação ocular ou dano sério ao olho.

Quadro 13 - MÉTODO OECD DT 491

Objetivos	Materiais	Resultados
Avaliar a capacidade de citotoxicidade em exposição de curto prazo.	Células da córnea do coelho Statens Serum Institut Rabbit Cornea (SIRC) cultivadas <i>in vitro</i> em microplacas. Avaliação da viabilidade pelo ensaio de MTT.	O solvente e o controle positivo demonstram critérios adequados para aceitação do estudo.

Fonte: ABDI Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial, 2019.

O teste STE que utiliza córneas de coelhos é capaz de avaliar a irritação ocular através da citotoxicidade, esse ensaio possui vantagens como o baixo custo, velocidade e simplicidade (TAKAHASHI et al., 2008, *apud* DUCAS, 2015 p. 27).

É um teste validado e recomendado para jaCVAM Japanese Center for the Validation of Alternative Methods) (DRAFT TG, 2014, *apud* DUCAS, 2015 p. 27). Embora o método de teste STE não seja considerado um substituto completo para o teste em olho de coelho *in vivo*, ele é adequado para uso como parte de uma estratégia de teste hierárquico para classificação de regulação (MORETTO, STEPHANO, 2019).

3.2.2.5 Método OECD DT 492 - Método de teste de epitélio humano semelhante à córnea (RhCE) reconstruído para identificar substâncias químicas que não exigem classificação e rotulagem para irritação ocular ou dano ocular grave.

Quadro 14 - MÉTODO OECD DT 492

Objetivos	Materiais	Resultados
Analisar sua capacidade de induzir citotoxicidade no tecido de RhCE.	Epitélio reconstituído de córnea humana e queratinócitos epidérmicos (RhCE), corantes químicos	O teste de RhCE mostram um certo número de resultados de falso negativos e assim será necessário a utilização de outros testes.

Fonte: ABDI Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial, 2019.

Esta Diretriz de Teste é aplicável a substâncias e misturas e também a sólidos, líquidos, semissólidos e ceras. Os líquidos podem ser aquosos ou não aquosos; os sólidos podem ser solúveis ou insolúveis em água. Sempre que possível, os sólidos devem ser moídos até se tornarem um pó fino antes da aplicação; nenhum outro pré-tratamento da amostra é necessário. Gases e aerossóis não foram avaliados em um estudo de validação. Embora seja concebível que possam ser testados usando-se a tecnologia RhCE, a Diretriz de Teste atual não permite testes de gases e aerossóis (MORETTO, STEPHANO, 2019, p. 447).

Antes do laboratório utilizar esse método como teste, ele deve passar por um teste de proficiência, verificando se é possível ou não realizar esse teste com as condições do laboratório em específico (MORETTO, STEPHANO, 2019, p. 454).

3.2.3 Testes para avaliação do potencial de Fototoxicidade:

3.2.3.1 Método OECD DT 432 - Teste de Fototoxicidade in vitro 3T3 NRU.

Quadro 15 - MÉTODO OECD DT 432

Objetivo	Materiais	Resultados
A fototoxicidade é avaliada pela redução da viabilidade celular exposta a determinada substância química, na presença e ausência de luz. A citotoxicidade será identificada na redução da concentração-dependente de corante vital Vermelho Neutro (NR).	Método baseado na comparação de determinada substância química, que é testada pela exposição e não exposição a uma dose sem toxicidade de luz solar.	Nos testes de fototoxicidade não são necessários organismos vivos, uma vez que em raros exemplos faz-se necessário a intervenção da transformação metabólica para ação da fototoxina no químico estudado. É um teste que não justifica a utilização de animais.

Fonte: ABDI Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial, 2019.

A fototoxicidade é uma reação tóxica que ocorre em tecidos expostos a luz solar ou artificial, causada pela aplicação de produtos químicos, de forma tópica ou sistêmica. Dentre estes produtos químicos estão os cosméticos que podem ter efeitos fotoirritantes, fotoalérgicos e fotogenotóxicos nos tecidos. Tais efeitos ocorrem devido a oxidação, modificações químicas ou por ligações covalentes com moléculas endógenas sob a exposição à luz (ONOE et al., 2013).

A Diretiva 2003/15/CE, que estabelece a proibição da comercialização de produtos que fossem testados em animais, tem como objetivo cuidar e proteger o bem-estar animal promovendo formas alternativas com sistemas *in vitro*. Posteriormente, foram realizados novos estudos, conduzidos por Onoue e colaboradores em 2013, que avaliaram a fotosssegurança não animal para cosméticos (ONOE et al., 2013).

Um dos métodos destacados no artigo é o teste de fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU que se baseia na absorção do corante vital Vermelho Neutro (NR) em células de fibroblastos de camundongos Balb/c 3T3. O NR é um corante que se acumula nos lisossomos celulares, mudanças causadas por agentes tóxicos prejudicam a absorção e ligação do NR, sendo possível distinguir as células viáveis, danificadas ou mortas. Este teste foi desenvolvido e validado pelo Centro Europeu para Validação de Métodos Alternativos (ECVAM), podendo ser utilizado para avaliação de vários ensaios de fototoxicidade. Ele é aceito pela Comissão da União Europeia e por Estados membros como método necessário em todos os compostos que mostram absorbância de luz visível e UVA (ONOE et al., 2013).

3.2.4 Testes para avaliação da absorção cutânea:

3.2.4.1 Método OECD DT 428 - Absorção Cutânea método *in vitro*.

Quadro 16 - MÉTODO OECD DT 428

Objetivo	Materiais	Resultados
Os métodos <i>in vitro</i> de absorção cutânea avaliam a propagação de determinadas substâncias químicas e seus efeitos na pele.	Pode utilizar uma pele não viável com a finalidade de medir a difusão dos produtos químicos, ou ainda utilizar pele fresca (metabolicamente ativa).	Método útil como triagem para comparar a distribuição da substância química analisada dentro e através da pele utilizando diferentes formulações.

Fonte: ABDI Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial, 2019.

A pele é o maior órgão do corpo humano, dentre suas funções, a principal seria a de proteção física contra organismos externos. A corrosão da pele é causada pela exposição a agentes tóxicos e é um processo irreversível que pode causar necrose do tecido. Por esses motivos é de extrema importância que todos os produtos que entrem em contato com a pele passem por testes toxicológicos prévios. Por muitos anos, foram utilizados coelhos como modelos para testes de produtos cosméticos, com a justificativa de que eles poderiam mimetizar o metabolismo da pele e a sua interação com os demais órgãos. Porém, o animal não apresenta resultados fiéis ao avançarem para a fase clínica de testes, sendo necessário a utilização de outros modelos mais representativos e confiáveis (DELLAMBRA et al., 2018).

Um ensaio *in vitro* que demonstrou ser reproduzível e aplicável para testes em grupos de diversos materiais é o Episkin, ele é composto por uma cultura reconstruída de queratinócitos humanos, que forma uma epiderme diferenciada em várias camadas. O ensaio é utilizado para avaliar a corrosividade da pele por meio de testes de superfície da epiderme e conseqüentemente analisa a integridade celular (ROBINSON et al., 2001).

3.2.5 Testes para avaliação de toxicidade aguda:

3.2.5.1 Método OECD DT 129 - Documento de orientação sobre o uso de ensaios de citotoxicidade para estimar as doses iniciais para testes de toxicidade sistêmica oral aguda.

Quadro 17 – MÉTODO OECD DT 129

Objetivos	Materiais	Resultados
Teste de citotoxicidade <i>in vivo</i> em humanos usando 50 substâncias de referências podendo diminuir o número de animais para os testes e, para substâncias relativamente tóxicas, também reduzindo o número de mortes ou que precisam de eutanásia, devido à toxidade grave.	O ensaio de citotoxicidade <i>in vivo</i> Neutral Red Unit (NRU) envolve a exposição de células em cultura a uma substância de teste por 48 horas. Onde as células são incubadas com corante vermelho neutro (VN) sendo ele concentrado e eluído das células, então elas são quantificadas espectrofotometricamente. O ensaio NHK NRU procura uma atenção especial para o meio de cultura de células, um procedimento de pré-qualificação.	A linhagem celular de roedor 3T3, e células humanas primárias, NHK, no ensaio NRU. São mostrados nos dois tipos de células que são semelhantes no estudo de validação; porém o ensaio 3T3 NRU é mais eficaz em consideração de tempo e custo do que o ensaio NHK NRU. Possuindo as oitos concentrações de cada substâncias testadas abrangerão a faixa de ausência de efeito até a inibição total da viabilidade celular.

Fonte: ABDI Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial, 2019.

A toxidade possui passos para segurança de substâncias, o primeiro passo é o teste *in vitro*, descartando compostos muito tóxicos. O teste clínico tem a importância de informar o potencial tóxico a seleção de substância com o propósito de possuir doses seguras. (UKELIS et al., *apud* VIEIRA, et al., 2009).

As limitações dos testes *in vitro* são os metabolismos dos compostos originais que acontece nos organismos vivos. Testes *in vitro* são importantes para redução no número de animais utilizados, diminuindo o sofrimento a dor. O afastamento dessas limitações torna os testes *in vitro* mais confiáveis na finalidade do toxicológico no desenvolvimento de busca de novos compostos. (VIEIRA, et al., 2009)

No método 3T3 temos substâncias-testes que foram diluídas por meio de cultura sem soro fetal bovino. Os compostos foram testados em oito concentrações em diluição seriadas. O teste foi realizado em seis valores individuais para cada concentração, sendo

assim o controle negativo duplicado, tendo doze valores individuais. Em seguida da exposição às substância-teste foram analisadas em microscópio para a avaliação da morfologia celular e viabilidade do teste. Verificando a placa como um todo: controle e as oito substâncias. (VIEIRA, et al.,2009)

3.2.5.2 Método OECD DT 420 - Toxicidade oral aguda – procedimento de dose fixa

Quadro 18 - MÉTODO OECD DT 420

Objetivo	Materiais	Resultados
A morte dos animais tinha como finalidade de teste, se apoiavam nas observações de indício claro de toxicidade em níveis de dose fixa. Portanto, os estudos <i>in vivo</i> demonstram que o procedimento usa menos animais, proporcionando menos sofrimento do que os métodos tradicionais e mostrando maneiras semelhantes de outros métodos de teste de toxicidade aguda.	O valor de DL50 por dose expõe pelo peso da substância em teste por unidade de peso do animal do ensaio. É uma dose única de uma substância da qual se espera que cause a morte	O estudo é composto com grupos/etapas. Em cada uma delas tem mortes esperadas por dose. Resultara com substâncias de categoria 5 do Sistema Global de Harmonização (GHS) com resultados B ou C que não levara classificação da substância.

Fonte: ABDI Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial, 2019.

O teste dose letal 50% (DL50) se iniciou em 1927 por Trevan, para analisar substâncias utilizadas por seres humanos como, por exemplo, digitallis e a insulina. Esses testes avaliam toxicidade sistêmica aguda, para classificar e rotular as substâncias pelo seu potencial de mortalidade ou toxicidade como estabelecido pela legislação. Além da mortalidade, alguns parâmetros são examinados em estudos de toxicidade aguda sistêmica para detectar o potencial tóxico em órgãos específicos, verificar a toxicocinética e a relação-dose resposta (VALADERES, et al.,2006).

Com muitos anos de debates e discussões sobre o teste DL50 (dose letal mediana), houve a exclusão das diretrizes que avaliam a toxicidade aguda. Em 1981, a Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (Organization for Economic Cooperation and Development; OECD) englobou o teste da DL50. Contudo, foi aceito a correção estatística juntamente com dados a inclinação da curva dose-resposta, com um

intervalo de confiança da DL50, e sinais tóxicos, não ficariam necessário para proposta de análise de risco (VALADERES, et al., 2006)

3.2.5.3 Método OECD DT 423 - Toxicidade oral aguda – método de classe de toxicidade aguda

Quadro 19 - MÉTODO OECD DT 423

Objetivo	Materiais	Resultados
O princípio do teste é baseado em um procedimento detalhado, com o número menor de animais para cada passo, obtendo informações suficientes para o teste de toxicidade aguda para permitir sua classificação. O método foi validado <i>in vivo</i> contra dados de DL50 alcançado na literatura como nacional e internacionalmente.	A substância é administrada oralmente, por um grupo de cobaias, com doses específica. A substância é usada por um procedimento detalhado: cada etapa usando três animais do mesmo sexo (fêmeas). A substância de teste é o volume constante ao decorrer do intervalo das doses a serem experimentadas, modificando a concentração do preparo da dose. Qualquer uma das etapas, o volume máximo de dose para administração não deve ser aumentado.	O teste é reproduzível, usando poucos animais e possui substâncias de maneiras semelhantes de outros métodos e testes de toxicidade aguda. O método de classe de toxicidade aguda é baseado em avaliações biométricas.

Fonte: ABDI Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial, 2019.

Foram visados possíveis alterações de toxicidade e avaliar a toxicidade aguda do extrato aquoso padronizado de Apeiba tibourbou para testes de dose aguda tóxica em camundongos e ratos. Foram selecionadas dez plantas medicinais e avaliaram seu perfil de toxicidade aguda, por meio de banco de dados, estudando resultados de DL50 em somente cinco plantas, com metodologias variadas e presença de grau toxicidade. Pela falta de dados sobre análise de toxicidade com a carência de estudos semelhantes desta natureza que contribui para o uso seguro desses produtos pela população humana e animais (CUNHA, et al.,2009).

Os resultados dos testes mostraram que não houve sinais clínicos de toxicidade ou neurotoxicidade. Nas etapas, foram realizadas análises comportamentais sistemáticas

para observado alterações como no consumo de ração ou alteração no peso corpóreo (CUNHA, et al.,2009).

Após a eutanásia, ocorreu a análise macroscópica dos órgãos, além de determinar o peso de alguns órgãos e também colher amostras do coração, pulmão, fígado, baço, rim, cérebro, entre outros, dos animais para análise histológica. Com finalidade da análise histopatológica seria para avaliar a integridade tecidual dos órgãos como lesões celulares reversíveis, necrose e apoptose, congestão, infiltração de leucócitos e fibrose (CUNHA, et al.,2009).

Os órgãos analisados tanto nos camundongos como nos ratos fêmeas, apresentaram inalteração macroscopicamente. A necropsia dos animais não confirmou nenhuma alteração macroscópica que explicasse o estudo histopatológico dos órgãos escolhido para análise (CUNHA, et al.,2009).

3.2.5.4 Método OECD DT 425 - Toxicidade oral aguda – protocolo “up-and-down”

Quadro 20 - MÉTODO OECD DT 425

Objetivo	Materiais	Resultados
O método é para a determinação de toxicidade aguda em substâncias químicas. O teste é para diminuir o número de animais necessários para avaliar a toxicidade oral aguda de uma substância química.	Com uma única porção de dose, os animais são dosados um de cada vez em um intervalo mínimo de 48h. O primeiro animal recebera primeiro uma dose abaixo do nível mais alto e estimado da DL50. Se o animal sobreviver, a dose para os próximos é aumentada. Cada animal é observado por 48h antes de decidir a próxima dosagem no animal seguinte.	Espera-se de um padrão dos resultados que se estabilizam, durante a dosagem que é ajustada para cada animal do teste. Para todos os animais os resultados são usados por cálculos de probabilidade para o cálculo da DL50.

Fonte: ABDI Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial, 2019.

Os animais são observados individualmente, depois de dosados, no mínimo uma vez nos primeiros 30 minutos nas primeiras 24 horas. Com atenção nas quatro primeiras horas e diariamente, em seguida pelo menos 14 dias, exceto se eles forem retirados do estudo e eutanasiados por questões de bem-estar animal ou forem encontrados mortos. Cada rodada, os animais são tratados um de cada vez, com o intervalo de tempo de 48 horas. O primeiro animal recebera uma dose um nível abaixo da melhor estimativa da

DL50. A seleção reflete um reajuste a cada tendência de se desviar da DL50 na direção da dose primária na estimativa final. Aguardando que o padrão dos resultados se equilibre, enquanto a dosagem é ajustada a cada animal seguinte (MORETTO, STEPHANO, et al.,2019).

Os períodos onde os sinais de toxicidade aparecem e desaparecem são muito importantes, principalmente se houver tendência de sinais tóxicos. Cada detalhe é anotado com o registro dos animais individualmente (MORETTO, STEPHANO, et al.,2019).

São necessários que os animais continuem mostrando sinais de toxicidade. As observações devem incluir: mudança na pele e no pelo, os olhos e membranas mucosas, circulatórias, alterações respiratórias, no sistema nervoso central e autônomo. Deve ser dada atenção a tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia, sono e coma. Os animais identificados moribundos e demonstrando dor severa ou sinais de angústia severa dessem ser eutanasiados. No momento em que os animais são eutanasiados ou encontrados mortos, deve ser registrado o horário de morte o mais preciso possível (MORETTO, STEPHANO, et al.,2019).

3.2.6 Testes para avaliação de genotoxicidade

3.2.6.1 Método OECD DT 487 - Teste de micronúcleos em células de mamíferos in vitro

Quadro 21 - MÉTODO OECD DT 487

Objetivo	Materiais	Resultados
Teste para detectar a presença de micronúcleos no citoplasma de células na interfase.	O teste micronúcleo <i>in vitro</i> (MNvit) de células de mamífero pode empregar culturas de linhagens celulares ou culturas celulares primárias, de origem humana ou de roedor.	Por ser uma avaliação objetiva, o operador responsável apenas determina o número de micronucleos. Os resultados são pontuados com rapidez e a análise pode ser automatizada.

Fonte: ABDI Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial, 2019.

O teste do micronúcleo *in vitro* (MNvit) é utilizado para detectar a presença de micronúcleos (MN) no citoplasma das células que estão em interfase. MN se originam de fragmentos de cromossomos acrocêntricos ou de cromossomos íntegros que não são capazes de migrar para os polos durante a anáfase. Por esse motivo o MNvit é um teste

que fornece uma base para investigação do potencial danoso de cromossomos *in vitro* (MORETTO et al. 2019).

Além disso, o teste também permite a marcação imunocitoquímica de cinetócoros ou a hibridização com sondas teloméricas que fornecem informações a mais sobre os mecanismos que causaram danos ao cromossomo e consequentemente formaram os micronúcleos (MORETTO et al. 2019).

3.2.7 Testes para avaliação de toxicidade reprodutiva:

3.2.7.1 Método OECD DT 421 - Teste de triagem de reprodução/ desenvolvimento de toxicidade

Quadro 22 - MÉTODO OECD DT 421

Objetivo	Materiais	Resultados
O teste é administrado por doses graduadas a vários grupos de machos e fêmeas possuindo um desempenho reprodutivo geral e de fertilidade.	O teste é feito em uma única espécie de rato. Os testes devem ser caracterizados por espécie, linhagem, sexo, peso e idade. A substância química é administrada por via oral, a não ser que outras vias sejam mais apropriadas. Assim que a via oral é selecionada, a substância química do teste é administrada por sonda estomacal; as substâncias químicas de testes também podem ser administradas através de dieta ou água. São recomendadas assim que possível, escolher uma solução/suspensão aquosa primeiro, seguida de uma solução/emulsão em óleo.	Três grupos de testes e o de controle devem ser usados. As informações podem ser baseadas no teste de toxicidade aguda ou em resultados de estudos de doses repetidas. Exceto com os testes de substâncias químicas, com os animais do grupo de controle que devem ser manipulados como de costume igual aos participantes do grupo teste.

Fonte: ABDI Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial, 2019.

Os testes são analisados pela toxicidade reprodutiva com a exposição de animais sexualmente maduros antes da concepção com a fêmea, durante e no pré-natal e em seguida o nascimento até a maturidade (CAMPÊLO, et al.,2018).

Observou-se que não a toxicidade reprodutiva ou sistêmica importante nas fêmeas no período entre doses de tempo utilizado. No macho teve uma redução na concentração espermática, sem prejudicar a capacidade de fecundação (CAMPÊLO, et al.,2018).

3.2.7.2 Método OECD DT 422 - Estudo combinado de toxicidade de dose repetida com o teste de triagem para reprodução/toxicidade no desenvolvimento

Quadro 23 - MÉTODO OECD DT 422

Objetivo	Materiais	Resultados
O estudo do teste de características tóxicas de uma substância química é determinada por toxicidade por via oral com doses repetidas podendo ser efetuada sobre a toxicidade, alcançada por testes agudos. O estudo informa os possíveis riscos à saúde, pela exposição repetida durante o tempo relativamente limitado, também mostra possíveis efeitos no ato reprodutivo masculino e feminino, como funções gonadais, comportamento de acasalamento, concepção, desenvolvimento do conceito e parto; quer numa fase inicial de análise das propriedades toxicológicas das substâncias químicas de teste, em substâncias químicas de teste preocupantes.	O método de estudo básico de toxicidade de dose pode ser usado para substâncias químicas, onde nos 90 dias de estudo não são seguros ou como um estudo inicial para um estudo de longo prazo. A substância química em estudo é administrada em doses equilibradas a vários grupos de machos e fêmeas. No período de administração, os animais são analisados de perto a cada dia quanto a sinais de toxicidade.	O teste <i>in vivo</i> , fornece dados adversos em pontos de término endócrinos importante. O endócrino pode não ser considerado prova suficiente de que a substância química em teste é desregulada endócrino. O método pode também informar a base dos efeitos imunológicos. A gestação é registrada e calculada a partir do dia 0. A cada ninhada deve ser analisado o mais rápido cedo possível após o parto para definir o número e o sexo dos filhotes, natimortos, nascidos vivos, nanicos. Os animais que morrem ou são eutanasiados durante o teste são necropsiados e, na conclusão do teste, os animais sobreviventes são sacrificados e necropsiados

Fonte: ABDI Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial, 2019.

Com a segurança do estudo de toxicidade aguda e subcrônica, para os testes em ratos Wistar de ambos os sexos que foram tratados por via oral com uma dose única porém correspondente a 20 vezes a dose terapêutica indicada pelo fabricante. Com a exposição à dose repetida ocorreu durante 30 dias sendo doses diárias, relativo à dose indicada pelo fabricante para seres humanos adultos, além de um grupo controle (JACOBUS, et

al.,2006).

Com os estudos relacionados, não houve sinais de toxicidade sistêmica, causando interferência no desenvolvimento dos animais, nos consumos de água e ração, urina e fezes. Também não revelarão ausência de toxicidade sistêmica, nos hematológicas e bioquímicas sanguíneas (JACOBUS, et al.,2006).

Em relação à toxicidade de doses repetidas, não houve mudanças importante no desenvolvimento dos ratos tratados com uma das três dosagens em comparação ao grupo de controle. Não foram identificadas alterações morfológicas nos órgãos internos (JACOBUS, et al.,2006).

3.3 Método *in silico*

Os métodos *in silico*, são utilizados desde 1930, é um método preditivo para realização de testes, ele é baseado em cálculos e simulações computadorizadas sendo capazes de prever características de determinadas moléculas e sua interação com as proteínas conhecidas de determinado produto a ser testado, além de fornecer dados toxicológicos (LUIZ et al. 2018).

O *in silico* tem como princípio a similaridade entre estruturas químicas, ou seja, compostos estruturalmente semelhantes serão toxicologicamente iguais. Tem sido muito utilizado em estágios pré-clínicos de experimentos devido a sua confiabilidade em previsões e apresenta diversas vantagens: (1) podem ser padronizados diferente dos métodos *in vivo* que apresentam muitas variações; (2) evitam manipulação de compostos que podem ser tóxicos; (3) são menos demorados produzindo resultados em minutos; (4) reduz ou substitui o uso de animais nos testes de toxicidade (FORD et al. 2016).

Um exemplo deste método é o Web ProTox, que possui uma interface de fácil uso onde o usuário pode desenhar a estrutura da molécula por meio do editor químico integrado ou utilizar a pesquisa PubChem que encontra estruturas utilizando o nome do composto. *In silico* pode ser utilizado como uma triagem virtual prevendo as toxicidades usadas em compostos que serão futuramente desenvolvidos. Além deste, existem diversos outros programas computacionais para avaliação da toxicidade (DRWAL et al. 2014).

Esse método auxilia na elucidação de possíveis efeitos fisiológicos e adversos que podem ser gerados durante as próximas fases de testes. O sucesso dele dependerá da

infraestrutura químico-informática de dados que poderão ser combinados para compreender melhor as atividades biológicas e fisiológicas dos compostos. É um sistema que se altera com frequência pois novos dados são sempre incorporados na medida que novos conhecimentos são adquiridos tornando-o um excelente aliado nos testes alternativos (PAIVA et al. 2015).

4 Conclusão

Com fundamento nos resultados obtidos neste estudo, conclui-se que os métodos alternativos ao uso dos animais nos testes de cosméticos mesmo que validados, ainda apresentam dificuldades para a substituição total dos métodos *in vivo*, porém, quando tais métodos são utilizados em conjunto podem conquistar o objetivo que é desejado. Contudo, apesar dos interferentes ainda existentes, alguns dos métodos apresentados neste estudo mostram a utilização dos 3R's que realizam a redução, o refinamento e a substituição do uso de animais, quando não há um método totalmente adequado ou padronizado. Sendo assim, novos estudos e pesquisas são essenciais para que haja o aprimoramento dos métodos, considerando os 3R's e a validação de novos métodos que substituam completamente o uso animal na indústria cosmética.

5 Referências

- AGÊNCIA BRASILEIRA DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL. Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil. São Paulo, MORETTO; STEPHANO; LIMAY, 2019. 734 p.
- ALMEIDA, B. D. Modelo de pele humana reconstruída como plataforma para estudos de fotoenvelhecimento. 2020. 75f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Manaus, 2020.
- AQUINO, S.; SPINA, G. A.; & NOVARETTI, M. C. Z. (2016). Proibição do Uso de Animais em Testes Cosméticos no Estado de São Paulo: Impactos e Desafios para o Desenvolvimento da Indústria de Cosméticos e Stakeholders. *Desenvolvimento Em Questão*, 14(34), 155. <https://doi.org/10.21527/2237-6453.2016.34.155-188>
- ARAÚJO, L.; ROCHA, M. F. M. (2018). Testes de animias de laboratórios e a atuação dos movimentos sociais em prol dos animias. *Jamaxi: Revista de História e Humanidades*, 2, 94–106.
- BARBOSA, B.; BARROS, R. B. O. Métodos Alternativos aos testes de cosméticos em animais. 2019. 24 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Direito) - Universidade de Uberaba – Uniube, Uberaba, 2019.
- BEZERRA, S.F. A´licação de métodos inovadores na avaliação do potencial alergênico de nanomateriais. 2019. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Goiás – UFG, Goiânia, 2019.
- CAMPÊLO, JAMILLY E. S. (2018) Avaliação da toxicidade reprodutiva e sistêmica do ácido elástico em Ratos Wistar.
- CUNHA, Luiz C. (2009) Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax.
- DELEMBRA, E.; ODORISIO, T.; DÁRCANGELO, D.; FAILLA, C.M.; & FACCHIANO, A. (2019). Non-animal models in dermatological research. *Altex*, 36(2), 177–202. <https://doi.org/10.14573/altex.1808022>
- DISNER, G. R. (2019). Métodos alternativos à experimentação animal: aspectos éticos, históricos e legais no Brasil. *Evidência*, 19(2), 259–274. <https://doi.org/10.18593/eba.v19i2.20964>
- DOKE, S. K.; & DHAWALE, S. C. (2015). Alternatives to animal testing: A review. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 23(3), 223–229. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2013.11.002>
- DUCAS, R. N. ANÁLISE DE MÉTODO ALTERNATIVO AO USO DE ANIMAI PARA A CLASSIFICAÇÃO DA IRRITAÇÃO OCULAR INDUZIDA POR CORANTE TÊXTEIS.; Goiânia, 2015; p. 26 – 27.
- DRWAL, M. N.; BANERJEE, P.; DUNKEL, M.; WETTIG, M. R., & PREISSNER, R. (2014). ProTox: A web server for the in silico prediction of rodent oral toxicity. *Nucleic Acids Research*, 42(W1), 53–58. <https://doi.org/10.1093/nar/gku401>

Ford, K. A. (2016). Refinement, reduction, and replacement of animal toxicity tests by computational methods. *ILAR Journal*, 57(2), 226–233. <https://doi.org/10.1093/ilar/ilw031>

JACOBUS, D.; MELLO, F. B.; MELLO, J. R. B. (2006) Avaliação da toxicidade oral aguda e em doses repetidas de fitoterápico contendo *Roripa nasturtium* Rusby, *Musa* spp., *Ficus carica* Linné, *Tagetes minuta* Linné e mel (Xarope de Agrião Composto Cibecol®) em ratos Wistar

LARANJEIRA, J. A. V. O uso de métodos alternativos à experimentação animal no desenvolvimento de produtos cosméticos. 2015. 41f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba, 2015.

MINI, C. A. Estabelecimento de um modelo de epiderme 3D proveniente de células imortalizadas a ser utilizado como plataforma de avaliação da toxicidade dérmica induzida por corantes de tinturas capilares. 2020. 45 f. Tese (Doutorado em Toxicologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

ONOE, S.; SUZUKI, G.; KATO, M.; HIROTA, M.; NISHIDA, H.; KITAGAKI, M.; KOUZUKI, H., & YAMADA, S. (2013). Non-animal photosafety assessment approaches for cosmetics based on the photochemical and photobiochemical properties. *Toxicology in Vitro*, 27(8), 2316–2324. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.10.003>

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT - OECD. Essais de sensibilisation cutanée in vitro portant sur l'événement clé 'relatif à l'activation des kératinocytes dans la voie toxicologique impliquée dans les effets indésirables pour la sensibilisation cutanée. 25 juin 2018.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT - OECD. Guidance document on an integrated approach on testing and assessment (IATA) for skin corrosion and irritation. 11 Jul 2014.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT - OECD. In *Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)*. 4 February 2015.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT - OECD. Ligne directrice de L'OECD pour les essais de produits chimiques - Sensibilisation cutanée: essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques: BRDU-ELISA OU FCM. 25 juin 2018.

PAIVA, D. S.; VITALLI, J. R.; MOREIRA, M. A. L.; MORAES, C. A. P. (2015). Análise da utilização de testes alternativos para avaliação de segurança de produtos cosméticos. *Resbcal*, 3, 43–49.

PAIXÃO, R. L. Experimentação animal: razões e emoções para uma ética. 2001. 151 f. Tese (Doutorado em saúde pública) - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2001.

ROBINSON, M. K., COHEN, C., DE FRAISSINETTE, A. D. B., PONEC, M., WHITTLE, E., & FENTEM, J. H. (2002). Non-animal testing strategies for assessment

of the skin corrosion and skin irritation potential of ingredients and finished products. *Food and Chemical Toxicology*, 40(5), 573–592. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(02\)00005-4](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(02)00005-4)

ROVIDA, C. Local Lymph Node Assay: How Testing Laboratories Apply OECD TG 429 for REACH Purposes. 2011. 13 f. University of Konstanz, Germany, 2011.

SÁ, L. D. L. Estratégia para a avaliação do potencial de irritação ocular de ingredientes cosméticos utilizando métodos alternativos à experimentação animal.; Ribeirão Preto, 2017; p – 16.

SILVA, S. J. Novas perspectivas na indústria cosmética com foco na redução do uso de animais e nos métodos alternativos. 2013. 43 f. Trabalho de conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, 2013.

VALADERES, M. C. (2006) Avaliação de toxicidade aguda: Estratégia após a “Era do teste DL50”.

VASCONCELOS, F.; SILVA, T. (2018). A Proteção dos Animais x Experimentação Animal.

VIEIRA, M. S. (2009) Emprego da citotoxicidade basal in vitro na redução do número de animais em ensaios de avaliação da toxicidade oral aguda: a grandisina e seu metabólito majoritário como protótipos.