Métodos Alternativos para Avaliação de Segurança de Produtos no Brasil

S Eberlin, PhD; MS da Silva, PhD; G Facchini, PhD; GH da Silva, BSc; ALTA Pinheiro, MD; A da Silva Pinheiro, BSc

Grupo Kosmoscience Ciência e Tecnologia Cosmética Ltda., Campinas SP, Brasil

O entendimento do estado da arte de ensaios alternativos para substituir, refinar e reduzir o uso de animais em pesquisa é mandatório para o desenvolvimento científico e tecnológico do país. Este artigo descreve o panorama brasileiro da incorporação de abordagens alternativas para segurança de produtos destinados ao uso humano.

Comprender el estado del arte de las pruebas alternativas para reemplazar, refinar y reducir el uso de animales en la investigación es obligatorio para el desarrollo científico y tecnológico del país. Este artículo describe el panorama brasileño al incorporar enfoques alternativos a la seguridad de los productos para uso humano.

The overview of alternative testing to replace, refine and reduce the use of animals in research is mandatory for scientific and technological development of the country. This article describes the Brazilian context in the incorporation of alternative approaches to safety assessments of products intended for human use

O princípio dos 3Rs (substituição, redução e refinamento, do inglês *replacement, reduction and refinement*)[1] foi desenvolvido há mais de 50 anos como um marco para a pesquisa animal, sendo gradativamente incorporado à legislação mundial que regulamenta o uso de animais em procedimentos científicos. Atualmente, esse princípio é considerado uma base para a realização de ciência de alta qualidade nos setores acadêmico e industrial com foco no desenvolvimento de abordagens alternativas que evitem o uso de animais, incluindo a necessidade de desenvolvimento de modelos e ferramentas que reflitam mais de perto a biologia humana e predigam com maior precisão a segurança e a eficácia de novos produtos.

No centro dessa questão regulatória está a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, sigla em inglês para Organisation for Economic Co-operation and Development), organização intergovernamental que representa mais de 30 países. Da mesma maneira que a Comissão Europeia (EC, sigla em inglês para European Commission), a OECD tem como prerrogativas: coordenar e harmonizar políticas, discutir questões de preocupação mútua e trabalhar juntos para atender e responder problemas internacionais. Entre as áreas de atuação da OECD, está a Divisão de Meio Ambiente, Saúde e Segurança (EHS, sigla em inglês para Environment, Health and Safety), responsável pela publicação das diretrizes para a realização dos ensaios de segurança. Essas diretrizes estão disponíveis integralmente no website da organização.[2]

Nesse contexto, o Brasil assumiu o compromisso com a validação de métodos alternativos e está caminhando em direção ao reconhecimento dos métodos internacionalmente validados, à harmonização e à capacitação dos laboratórios comprometidos com os 3Rs e ao desenvolvimento de um sistema próprio de validação. Esse direcionamento resultou na criação, em julho de 2012, da Rede Nacional de Métodos Alternativos (Renama), pelo Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (MCTIC). Em setembro daquele ano, foi criado o Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos (BraCVAM), uma parceria entre o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Essas foram as primeiras parcerias estabelecidas na América Latina para validar e coordenar uma substituição de estudos, uma redução, ou um refinamento do uso de animais em testes laboratoriais para avaliação da segurança e eficácia de cosméticos, medicamentos e outras categorias de produtos às quais esses ensaios se aplicam.

Em 2014, o BraCVAM recomendou o uso de 24 métodos alternativos validados e publicados pela OCDE,[3-4] que foram reconhecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Concea) e resultaram na publicação das resoluções normativas (RNs) n.º 17 (de 7/7/2014),[5] n.º 18 (de 24/9/2014)[6] e n.º 31 (de 18/8/2016)[7]. O reconhecimento desses métodos pela Anvisa foi deliberado pela resolução da diretoria colegiada (RDC) n.º 35 (de 10/8/2015).[8] As resoluções normativas estabeleceram o prazo limite de 5 (cinco) anos para a substituição obrigatória dos métodos originais pelos alternativos. Dessa forma, em 2019, entraram em vigor os 17 métodos contemplados na RN n.º 18 e, em 2021, passarão a vigorar os 7 métodos citados na RN n.º 31 (Tabelas 1 e 2).

Em 2015, o Brasil apresentou um projeto na 52ª Reunião Especializada de Ciência e Tecnologia (RECyT), do Mercosul, com os objetivos de inserir o tema métodos alternativos e promover a criação de uma infraestrutura laboratorial e de recursos humanos especializados, ca-

Figura 1. Linha do tempo da implantação dos métodos alternativos no Brasil

Tabela 1. Métodos alternativos aceitos pelo Concea, conforme RN n.º 18, que entraram em vigor em setembro de 2019

Desfecho	Método original	Métodos alternativos
Irritação e corrosão da pele	OECD TG 404[11]	OECD TG 430[12] OECD TG 431[13] OECD TG 435[14] OECD TG 439[15]
Irritação e corrosão ocular	OECD TG 405[16]	OECD TG 437[17] OECD TG 438[18] OECD TG 460[19]
Fototoxicidade	Não se aplica	OECD TG 432[20]
Permeação cutânea	OECD TG 427[21]	OECD TG 428[22]
Sensibilização cutânea	OECD TG 406[23]	OECD TG 429[24] OECD TG 442A[25] OECD TG 442B[26]
Toxicidade aguda	OECD TG 401[27]	OECD TG 129[28] OECD TG 420[29] OECD TG 423[30] OECD TG 425[31]
Genotoxicidade	OECD TG 474[32]	OECD TG 487[33]

Tabela 2. Métodos alternativos aceitos pelo Concea, conforme RN n.º 31, que entrarão em vigor em setembro de 2021

Desfecho	Método original	Métodos alternativos
Irritação e corrosão ocular	OECD TG 405[16]	OECD TG 491[34] OECD TG 492[35]
Sensibilização cutânea	OECD TG 406[23]	OECD TG 442C[36] OECD TG 442D[37]
Toxicidade reprodutiva	Não se aplica	OECD TG 421[38] OECD TG 422[39]
Contaminação pirogênica	Não se aplica	Teste de endotoxina bacteriana[40]

pazes de implantar métodos alternativos ao uso de animais.[9] Esse projeto foi aprovado e, desde então, a Plataforma Regional de Métodos Alternativos ao Uso de Animais de Experimentação do Mercosul (PReMASUL) promove cursos de capacitação e treinamento de recursos humanos, buscando difundir essas metodologias pelos países do bloco. Esses cursos podem ser total ou parcialmente subsidiados e ocorrem tanto nos laboratórios centrais da Renama – INCQS-Fiocruz, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro) e Laboratório Nacional de Biosciências (LNBio/CNPEM) – como nos laboratório associados, ligados a universidades.

Em consonância com o advento dos métodos alternativos no Brasil, em março de 2019, a Academia de Ciências Farmacêuticas do Brasil (ACFB), a Academia Nacional de Farmácia (ANF) e a Associação Brasileira de Desenvolvimento Industrial (ABDI) lançaram o compêndio "Métodos alternativos ao uso de animais em pesquisa reconhecidos no Brasil."[10] A publicação é um guia, em língua portuguesa, com o objetivo de disseminar, entre os pesquisadores da academia e o setor privado, os métodos alternativos incorporados pelo território nacional.

A Figura 1 ilustra a linha do tempo da evolução das políticas públicas brasileiras que estão em consonância com a implantação dos métodos alternativos no Brasil.

Panorama Brasileiro para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos

A trajetória do mercado cosmético brasileiro é considerada dinâmica e promissora no cenário internacional, tendo como referência o contexto econômico no qual se encontra. O Brasil ocupa o quarto lugar no ranking mundial de consumo de produtos cosméticos, movimentando aproximadamente US$ 30 bilhões por ano, sendo que 15% desse total são destinados à pesquisa, ao desenvolvimento, à comunicação e ao lançamento de novos produtos.[41] Dessa maneira, o entendimento do estado da arte de ensaios alternativos para substituir, refinar e reduzir o uso de animais em pesquisa é mandatório para o desenvolvimento científico e tecnológico do país, proporcionando a disponibilização de ingredientes e produtos cujos usos são cada vez mais seguros.

A Anvisa disponibiliza atualmente, em seu site, o "Guia para avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos."[42] Esse guia descreve critérios para a avaliação de segurança desses produtos, incluindo os riscos cosméticos e os desfechos que devem ser abordados. Essa publicação tem caráter apenas orientativo, permitindo às empresas que apresentem alternativas para a avaliação de segurança, contando que declarem ter dados comprobatórios que atestem a segurança desses produtos. Esse guia, publicado em 2012, está desatualizado em relação ao contexto atual de métodos alternativos do Brasil. O guia, por exemplo, descreve ensaios em animais para os quais existem ensaios alternativos, segundo as RNs n.º 18[6] e 31,[7] e que, portanto, devem ser totalmente abolidos da prática de desenvolvimento de cosméticos. A publicação reforça que a validação e a aceitação regulatória de novos métodos é um processo dinâmico, sendo imperativa a consulta periódica aos órgãos de referência, como a OECD e a

Tabela 3. Legislações estaduais brasileiras sobre a proibição do uso de animais em pesquisa de produtos cosméticos e artigos de higiene

Estado	Legislação
São Paulo	Lei Estadual n.º 15.316, de 23 de janeiro de 2014
Mato Grosso do Sul	Lei Estadual n.º 4.538, de 3 de junho de 2014
Paraná	Lei Estadual n.º 18.668, de 22 de dezembro de 2015
Pará	Lei Estadual n.º 8.361, de 11 de maio de 2016
Rio de Janeiro	Lei Estadual n.º 7.814, de 15 de dezembro de 2017
Minas Gerais	Lei Estadual n.º 23.050, de 25 de julho de 2018
Amazonas	Lei Estadual n.º 289, de 3 de dezembro de 2015

Food and Drug Administration (FDA), os quais têm o mesmo status diante da Anvisa. De qualquer forma, esperamos que, a curto prazo, uma versão atualizada do guia seja publicada.

Embora a proibição do uso de animais em pesquisas de produtos cosméticos não seja obrigatória em todo o Brasil, alguns estados, por meio de suas assembleias legislativas, já firmaram essa política. São Paulo foi o primeiro estado brasileiro a adotar a proibição de testes em animais para a realização de pesquisas de produtos cosméticos, em janeiro de 2014, seguido de outros estados, como Mato Grosso do Sul, Paraná, Pará, Rio de Janeiro e Amazonas (Tabela 3).[43-49] Adicionalmente, o projeto de lei n.º 70[50] está em trâmite no Senado Federal desde 2014 e, no caso de sua aprovação, a lei proibirá os testes em animais para ingredientes e produtos cosméticos, e a venda de perfumes, cosméticos e itens de higiene pessoal cujas empresas utilizaram essa prática para fabricá-los, mesmo, em outros países. Além disso, a lei incentivará o desenvolvimento de técnicas alternativas para testes de segurança.

Outros Setores Impactados pela Política dos 3Rs

Além da indústria cosmética, outros setores estão sendo influenciados pela política dos 3Rs, devendo incorporar, à sua esfera regulatória, as diretrizes estabelecidas pelo Concea, como as RNs n.º 18[6] e 31.[7]

Empresas dos ramos farmacêutico, alimentício, de produtos para a saúde, agroquímico e de saneantes deverão adequar-se às novas regulações, quanto ao refinamento, à redução e à substituição do uso de animais em pesquisa, para a execução e a apresentação dos testes de segurança em seus registros. É importante reforçar que os dados da literatura disponíveis atualmente para outros produtos além dos cosméticos ainda são escassos. Para que ocorra a completa substituição pelos métodos alternativos é necessário que sejam feitas parcerias entre o setor público e o privado, para o desenvolvimento de novas pesquisas que avaliem a confiabilidade dos dados que forem obtidos nas avaliações realizadas por métodos alternativos.

Esta discussão é fundamental principalmente no que tange produtos agroquímicos, pois já foi relatado na literatura que, para alguns desfechos, como corrosão e irritação ocular, os métodos alternativos não predizem a resposta in vivo.[51] Com o propósito de aperfeiçoar o registro desses produtos no Brasil, a Anvisa publicou a RDC Nº 294 (29/7/2019)[52] que dispõe sobre os critérios para avaliação e classificação toxicológica de produtos agroquímicos, orientando no preparo do dossiê, utilizando informações já existentes e executando os ensaios de segurança complementares, quando necessário. Essa resolução reforça a adesão aos métodos alternativos e permite o uso de animais, somente, quando o desfecho for inconclusivo, após esgotarem-se todos os recursos possíveis.

Outras empresas, por exemplo, das áreas de artigos escolares e de brinquedos, estão em fase de transição. Apesar de os ensaios requeridos para essas categorias serem perfeitamente substituíveis pelas RNs, o impacto financeiro dessa medida ainda é significativamente elevado. Nesse sentido, a política brasileira precisa caminhar no sentido de otimizar o processo de importação dos insumos utilizados nos testes, considerando que a maioria deles são importados ou desenvolvidos com o uso com insumos importados, o que encarece e prolonga a execução dos métodos. Tomar essa medida seria de grande importância para a viabilização da implantação de métodos alternativos nos diferentes setores.

Desfechos Toxicológicos e Diretrizes Aceitas

A RN n.º 18[6] e a RN n.º 31[7] descrevem diretrizes que não necessariamente substituem completamente o uso de animais de pesquisa, mas que propõem o refinamento e a redução do uso desses animais. Entendemos a relevância científica desses métodos, porém nosso grupo é especializado em ensaios *in vitro* para a avaliação de segurança, utilizando apenas cultura de células e tecido como sistema-teste. Dessa forma, neste artigo, discutiremos as metodologias que foram completamente desenvolvidas sem o uso de animais e que atendem os diferentes desfechos toxicológicos presentes nas resoluções normativas e aceitos pela Anvisa.

Sobre alguns desfechos, a OECD disponibiliza documentos de orientação para a realização de Abordagens Integradas de Testes e Avaliações (IATA, sigla em inglês para Integrated Approaches to Testing and Assessment). Essas abordagens visam orientar a tomada de decisão e a integração de todas as informações sobre o potencial de risco do produto em teste, para orientar as decisões finais de classificação e rotulagem. Nesse sentido, sempre que possível, discutiremos as diretrizes dentro da visão integrada proposta pelas IATA. Vale ressaltar que, além dos ensaios *in vitro* descritos nos guias, as IATA consideram dados previamente existentes em seres humanos, propriedades físico-químicas e análises in silico que não serão discutidas aqui.

Corrosão ou irritação da pele

Em relação a esses desfechos, a OECD estabelece a IATA n.° 203[53] para a identificação do potencial, do produto em teste, de corrosão ou irritação da pele (ou a ausência desses desfechos), assegurando informações adequadas para a classificação e a rotulagem do produto de acordo com o Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos, da Organização das Nações Unidas (GHS-ONU).

Para a avaliação de segurança cutânea, os métodos alternativos disponibilizados são os guias TG 430, TG 431, TG 435 e TG 439.[12-15] O TG 430[12] não será abordado neste artigo, devido ao uso de animais.

A diretriz OECD TG 431 (Corrosão dérmica *in vitro*: teste da epiderme humana reconstituída)[13] utiliza como sistema-teste uma epiderme humana reconstruída (RhE) que mimetiza as propriedades bioquímicas e fisiológicas da epiderme humana. Os

modelos de RhE são construídos por meio de cultura de queratinócitos em interface ar-líquido para formar um modelo altamente diferenciado das camadas epidérmicas. Os produtos em teste são aplicados topicamente aos modelos de RhE e expostos por 3 minutos, 1 e 4 horas. A viabilidade celular é avaliada, imediatamente após a exposição, pela conversão do corante vital MTT [3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil bromo tetrazólio] em azul de formazan, o qual é quantificado após a extração dos tecidos. Os produtos corrosivos são identificados por sua capacidade de diminuir a viabilidade celular abaixo dos níveis-limite definidos. Essa metodologia pode ser utilizada como um teste independente para a detecção ou a exclusão de efeitos corrosivos dos produtos. Um resultado negativo para esse ensaio exigirá a realização de um teste adicional de irritação da pele *in vitro* seguindo a diretriz OECD TG 439,[15] para determinar se o produto deverá ser classificado como Categoria 2 (irritante) ou se não vai requer classificação (Sem categoria), portanto o quê substitui completamente o teste *in vivo* OECD TG 404. A OECD TG 431[13] também permite a subcategorização de produtos corrosivos em Categoria 1A ou Categoria 1B/1C, mas não permite a distinção destes em Categoria 1B e Categoria 1C. Quando é necessária a discriminação entre essas subcategorias, o guia OECD TG 435[14] (teste de barreira de membrana *in vitro*) pode ser utilizado e, assim como na TG 431,[13] um resultado negativo nesse método exigirá a realização de um teste adicional de irritação da pele *in vitro* (OECD TG 439).[15]

O guia TG 439 (teste de irritação cutânea *in vitro*)[15] é realizado por meio da exposição de um dos modelos validados de RhE ao produto em teste por um período de tempo específico para cada modelo. A viabilidade celular é avaliada após 42 horas da exposição ao produto, utilizando a redução do sal de MTT como parâmetro. Esse método é capaz de identificar produtos classificados como Categoria 2 ou Sem categoria. Caso a execução do método resulte em Categoria 2, será necessário realizar um teste de corrosão para determinar a classificação final do produto.

Corrosão e irritação ocular

Para esse desfecho, a OECD estabelece a IATA n°. 263,[54] que sugere uma abordagem integrada para a identificação de danos graves e riscos de irritação ocular, orientando as tomadas de decisões para a classificação e a rotulagem do produto em teste.

Para a avaliação de segurança ocular, os métodos alternativos disponibilizados e aceitos pela Anvisa são os guias: TG 437 (teste de permeabilidade e opacidade e de córnea bovina);[17] TG 438 (teste ocular de olho isolado de galinha);[18] TG 491 (teste *in vitro* de curta duração para danos oculares);[34] TG 492 (epitélio córneo humano reconstruído);[35] e TG 460 (teste de permeação de fluoresceína).[19] Em junho de 2019, foi validado um novo ensaio para a classificação de produtos sem categoria: OECD TG 494 (teste de irritabilidade ocular em Vitrigel),[55] porém ainda não está presente nas IATA e nas resoluções normativas.

A abordagem para substituir ou reduzir o uso do teste *in vivo* (OECD TG 405)[16] consiste em realizar estratégias de testes que combinem os pontos fortes dos métodos *in vitro* disponíveis para a identificação de danos oculares graves e de risco de irritação ocular. Para a execução das avaliações, são sugeridos estes dois caminhos:

1. Abordagem top-down – é iniciada com um método *in vitro* que possa identificar produtos causadores de dano ocular sério ou irreversível (GHS-ONU Categoria 1), com baixa taxa de falso positivo e a maior acurácia possível, sendo utilizada quando há indícios de que o produto em teste possa causar danos oculares graves.

A FUSÃO DA SABEDORIA MILENAR E TECNOLOGIA AVANÇADA

NeoPlanta® Withania

A sabedoria milenar encontra a tecnologia avançada. Há mais de 3000 anos, *Withania somnifera* é utilizada na tradicional medicina Ayurvédica. As propriedades curativas de suas raízes ajudam a fortalecer o sistema imunológico, acalmar o estresse mental e manter a vitalidade da pele. Utilizando cultivo in vitro otimizado de NeoPlanta® Whitania, conseguimos agregar ainda mais benefícios a esse presente da natureza: crescimento controlado sem uso de pesticidas, herbicidas e exploração social. Além disso, nosso sérum para o equilíbrio da pele urbana é vegano e livre de glúten e conservantes.

NeoPlanta® Whitania é o primeiro produto da Evonik Advanced Botanicals. Para mais informações acesse nosso website.

www.evonik.com/personal-care

EVONIK
POWER TO CREATE

Tabela 4. Uso regulatório, aplicabilidade, limitações e desempenho dos métodos *in vitro* para classificação de produtos quanto ao potencial dano ocular

		BCOP (OECD TG 437)[17]	ICE (OECD TG 438)[18]	STE (OECD TG 491)[34]	RhCE (OECD TG 492)[35]	FL (OECD TG 460)[19]
Identificação de Categoria 1 (GHS-ONU)	**Aplicabilidade**	Substâncias e misturas	Substâncias e misturas	Substâncias e misturas solúveis ou uniformemente suspensas por pelo menos 5 minutos	Não aplicável	Substâncias e misturas solúveis em água
	Limitações	Álcoois e cetonas	Álcoois	Nenhuma limitação relatada	Não aplicável	Ácidos e Bases fortes, fixadores de célula, substâncias altamente voláteis, coloridas ou viscosas
	Acurácia	79% (150/191)	86% (120/140)	83% (104/125)	Não aplicável	77% (117/151)
	Falso positivo	25% (32/126)	6% (7/113)	1% (1/86)	Não aplicável	7% (7/103)
	Falso Negativo	14% (9/65)	48% (13/27)	51% (20/39)	Não aplicável	56% (27/48)
Identificação para Sem Categoria (GHS-ONU)	**Aplicabilidade**	Substâncias e misturas	Substâncias e misturas	Substâncias e misturas solúveis ou uniformemente suspensas por pelo menos 5 minutos	Substâncias e misturas; produtos incompatíveis com MTT	Não aplicável
	Limitações	Não deve ser a primeira escolha para abordagem bottom-up	Solventes orgânicos antiincrustantes que contêm tintas e sólidos	Substâncias altamente voláteis e sólidos, exceto surfactante	Nenhuma limitação relatada	Não aplicável
	Acurácia	69% (135/196)	82% (125/152)	90% (92/102)	80% (90/112)	Não aplicável
	Falso positivo	69% (61/89)	33% (26/79)	19% (9/48)	37% (20/55)	Não aplicável
	Falso negativo	0% (0/107)	1% (1/73)	2% (1/54)	4% (2/57)	Não aplicável

Adaptado IATA n° 263. BCOP: opacidade e permeabilidade da córnea bovina; ICE: olho de galinha isolado; STE: exposição de curto prazo; RhCE: epitélio corneal humano reconstruído; FL: permeação de fluoresceína.

2. Abordagem bottom-up – é iniciada com um método *in vitro* que possa identificar produtos que não causem dano ocular (GHS-ONU Sem categoria), com baixa taxa de falso negativo e a maior acurácia possível.

Na Tabela 4 estão relatados os testes validados e aceitos pela Anvisa, de acordo com sua aplicabilidade, limitação, acurácia e taxas de falso positivo e negativo. Essa tabela pode ser utilizada como um guia para a escolha dos métodos empregados.

Sensibilização Cutânea

Para esse desfecho, a OECD estabelece a IATA n.° 256,[56] que não endossa nenhuma abordagem específica para a avaliação de sensibilização cutânea, mas exemplifica as tomadas de decisões com uma série de estudos de caso com o nível de informação necessário para facilitar o desenvolvimento de uma abordagem harmonizada durante a avaliação do produto em teste.

Nas resoluções normativas constam estes ensaios:

- TG 429 – sensibilização cutânea: ensaio do linfonodo local.[24]

- TG 442A e 442B – versões não radioativas do ensaio do linfonodo local.[2-5-26]

- TG 442C – sensibilização cutânea *in chemico*.[36]

- TG 442D – sensibilização cutânea *in vitro* (ARE-Nrf2).[37]

Como as diretrizes TG 429,[24] TG 442A[25] e TG 442B[26] envolvem a utilização de animais, não as abordaremos nesta discussão. Para complementar o conceito de abordagem integrada, consideramos oportuno incluir o método TG 442E – sensibilização cutânea *in vitro* (hClat),[57] mesmo este não constando nas RNs.

Conforme foi definido pelo GHS-ONU, um sensibilizante cutâneo refere-se a uma substância que resulta na resposta alérgica após o contato repetido com a pele. Existe consenso geral sobre os principais eventos químicos e biológicos subjacentes ao processo de sensibilização, os quais foram descritos por diferentes grupos de pesquisa, ao longo dos anos.[58-62] Com o intuito de facilitar o desenvolvimento de ensaios e de estratégias toxicológicos na avaliação desse desfecho, a OECD compilou esse conhecimento no relatório intitulado "Vias de desfecho adverso (AOP – Adverse Outcome Pathway) para sensibilização da pele iniciado por ligação covalente a proteínas."[63-64] As AOPs identificam quatro eventos-chave envolvidos no processo de sensibilização cutânea. São eles:

1 - Ligação covalente a proteínas da pele.

2 - Ativação de queratinócitos epidérmicos.

3 - Ativação e mobilização de células de Langerhans e de células dendríticas (DC) epidérmicas.

4 - Apresentação de antígeno mediado por DC para células T naives e proliferação de linfócitos T ativados.

As combinações de métodos não animais (*in silico*, *in vitro* e *in chemico*) contidas na IATA n.° 256[56] são necessárias para que se possam substituir totalmente os testes em animais atualmente em uso. Não é recomendada a utilização de um único método para fins regulatórios.

Na Tabela 5, descrevemos brevemente os métodos que abordam cada evento-chave da sensibilização cutânea, assim como seus endpoints.

Permeação cutânea

A diretriz validada e aceita pela Anvisa para esse desfecho é a OECD TG 428 – absorção cutânea: método *in vitro*.[22] Nessa

diretriz, estão descritos os parâmetros experimentais para a avaliação da permeação cutânea do produto em sistema de célula de difusão vertical, chamada célula de Franz, que consiste em uma câmara doadora e em uma câmara receptora entre as quais o substrato no qual o produto que será aplicado é posicionado. Esse substrato pode ser: pele humana *ex vivo*, pele porcina ou até mesmo membranas sintéticas. Vale reforçar que cada ingrediente possui um perfil de permeação específico, por isso o uso de membrana sintética ou de pele porcina pode não ser tão preditivo do efeito *in vivo* para algumas substâncias. O ingrediente em avaliação é quantificado no líquido receptor que está em contato direto com a superfície inferior do substrato. Essa diretriz permite a avaliação por diferentes métodos e em diferentes tempos experimentais, possibilitando desde a execução de um ensaio qualitativo até a realização de cinética de permeação de uma molécula. Essa flexibilidade viabiliza a aplicação do método nos diferentes setores e que se obtenha amplos objetivos, englobando desde as etapas de pesquisa e desenvolvimento até os fins regulatórios.

Fototoxicidade

A fototoxicidade é definida como uma resposta tóxica aguda que é provocada após a primeira exposição da pele a certos produtos químicos e à sua subsequente exposição à luz, ou que é induzida de maneira semelhante pela irradiação da pele após a administração sistêmica de um produto químico.

Para esse desfecho, a OECD preconiza o guia TG 432 - teste de fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU.[20] Esse método é baseado na comparação da redução da viabilidade celular da cultura incubada com o produto, quando avaliada na presença e na ausência de uma dose não citotóxica de luz ultravioleta A (UV-A). A predição da fototoxicidade é baseada na avaliação destes dois fatores:

1 - Fator fotoirritante (PIF): é o quociente entre as IC_{50} (concentração do produto que reduz 50% da viabilidade celular) das culturas celulares não expostas e das expostas à radiação UV-A.

2 - Fotoefeito médio (MPE): é a comparação estatística das curvas de concentração-resposta.

Toxicidade aguda

O método validado pela OECD e aceito pela Anvisa para a avaliação de toxicidade oral aguda é a diretriz OECD TG 129 – estimativa da dose inicial para teste de toxicidade aguda oral sistêmica.[28] Esse método utiliza a técnica de incorporação do corante vermelho neutro (VN) como forma de determinação da viabilidade celular em fibroblastos murinos (BALB/3T3 clone A31) incubados com o produto em teste. Com esse ensaio, pode-se calcular a IC_{50} e, a partir de cálculos matemáticos, estimar a dose oral inicial que causa 50% de letalidade (DL_{50}). Simulações mostraram que o uso de ensaios de citotoxicidade *in vitro* para estimar um DL50 reduz potencialmente o uso de animais em 25-40%.[65-66]

Genotoxicidade

Atualmente, o método alternativo aceito pela Anvisa para o desfecho de genotoxicidade é o TG 487 – teste do micronúcleo em célula de mamífero *in vitro* (MNvit).[33] Esse é um teste de mutagenicidade para a detecção de micronúcleos no citoplasma de células em interfase. Os micronúcleos podem ter origem em fragmentos cromossômicos acêntricos, ou em cromossomos completos que são incapazes de migrar para os polos durante o estágio de anáfase da divisão celular. Portanto, o teste MNvit é um método *in vitro* que fornece uma base abrangente para investigar o potencial danoso de cromossomos *in vitro* de substâncias aneugênicas e clastogênicas em células que sofreram divisão celular durante ou após exposição ao produto em teste.

Contaminação pirogênica

Esse teste é usado para detectar ou quantificar endotoxinas de bactérias gram-negativas presentes no produto em teste. Há duas técnicas com sensibilidades diferentes para esse teste. São elas:

1 - Método de coagulação em gel: é baseado na formação de coágulo ou gel (método semiquantitativo).

2 - Método fotométrico quantitativo: inclui o método turbidimétrico e o método cromogênico.[40]

Tabela 5. Evento-chave das vias de desfecho adverso (AOP), Método validado e os respectivos endpoints para a classificação de produtos quanto ao seu potencial de sensibilização cutânea

Evento-chave das vias de desfecho adverso	Método validado	Endpoint
1) Interação covalente com proteínas celulares	OECD TG 442C – Sensibilização cutânea química: ensaio direto de reatividade do peptídeo (DPRA)[36]	Teste *in chemico* para a discriminação entre sensibilizadores cutâneos e não sensibilizadores, realizado por meio da quantificação de peptídeos contendo cisteína ou lisina, realizada após 24 horas de incubação com a substância em teste
2) Ativação de queratinócitos – vias bioquímicas	OECD TG 442D – Ensaios de sensibilização cutânea *in vitro* que abordam o evento-chave AOP sobre a ativação do queratinócitos[37]	Dependendo do quadro regulatório, os resultados positivos gerados com a aplicação desses métodos podem ser utilizados isoladamente para classificar uma substância química na categoria 1 do GHS, avaliado por meio da atividade de luciferase como indicador da atividade do fator de transcrição Nrf2*
3) Ativação de DC – estimulação de moléculas coestimulatórias e de adesão	OECD TG n.º 442E – Ensaios de sensibilização da pele *in vitro* voltada para o principal evento de ativação de células dendríticas (h-Clat)[57]	Teste *in vitro* para discriminação entre sensibilizadores cutâneos e não sensibilizadores, por meio da expressão de CD86 e CD54 e morte celular
4) Eventos em linfócitos	Até o momento, apenas modelos murinos são disponibilizados	

*Nrf2: Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2

Novas Perspectivas para Avaliação da Segurança de Produtos

Embora estejam na vanguarda regulatória mundial, os pesquisadores da academia e do setor privado brasileiro nem sempre conseguem transferir uma diretriz para seus laboratórios.

A importação de insumos para a pesquisa nacional é um processo limitante, sendo diversas vezes impraticável a implantação de alguns métodos preconizados, particularmente aqueles envolvendo tecidos reconstruídos e algumas linhagens celulares. Isso ocorre devido ao curto tempo de viabilidade do material biológico e ao longo tempo de espera para o desembaraço aduaneiro.

Atualmente, contamos no Brasil com o Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), que fornece as principais linhagens celulares descritas nas diretrizes regulatórias. Da mesma forma, recentemente foi disponibilizado no país um dos modelos de pele reconstruída preconizados pela OECD TG 431 e pela OECD TG 439, que já se encontra em comercialização.

Adicionalmente, no Brasil, diversos grupos iniciaram o desenvolvimento de seus próprios modelos experimentais. A academia e alguns fabricantes brasileiros de produtos cosméticos têm hoje seus protótipos de pele reconstruída e os utilizam internamente, principalmente para realizar triagens de segurança ou eficácia de matérias-primas e formulações. Outra alternativa que vem sendo aprimorada ao longo dos anos é o uso da própria pele humana, obtida de cirurgia plástica eletiva, como modelo para a avaliação da segurança e eficácia de produtos aplicados topicamente.

Modelo de pele humana *ex vivo*

De acordo com um relatório da Sociedade Internacional de Cirurgia Plástica Estética (ISAPS, sigla em inglês para International Society of Aesthetic Plastic Surgery),[67] o Brasil ocupa a segunda colocação em número de procedimentos cirúrgicos realizados em 2017, com destaque para prótese mamária, lipoaspiração, abdominoplastia e rinoplastia.

Considerando que os fragmentos de pele sobressalentes dessas cirurgias plásticas eletivas são rotineiramente descartados como resíduo infectante, sua utilização constitui uma alternativa experimental factível e sustentável para suprir a lacuna existente entre o *in vitro* e o clínico, aproximando-se dos reais efeitos que um produto aplicado topicamente pode exercer.

Estudos vêm comprovando que a pele humana proveniente de cirurgia plástica se mantém viável em condições de cultura, não perde sua função de barreira e conserva a diferenciação das camadas epidérmicas e a composição da matriz extracelular.[68-76] Entre os modelos alternativos, a pele humana é um sistema-teste promissor, que pode mimetizar, de forma mais fidedigna, as condições reais da pele humana por conter toda a população celular nativa.

Em um estudo recente, foi avaliada a aplicabilidade desse modelo aos ensaios de irritação e corrosividade cutânea, seguindo as diretrizes OECD TG 431[13] e OECD TG 439.[15] Os resultados para esses dois métodos demonstraram que a utilização da pele *ex vivo* padronizada, respeitando critérios de inclusão e exclusão, fornece classificações equivalentes das substâncias de proficiência preconizadas pelos guias da OECD. Isso permite que esse modelo possa ser considerado uma opção para a avaliação desses desfechos (dados em publicação).

Conclusões

É notória a evolução do Brasil no engajamento de sua comunidade científica e no desenvolvimento de políticas públicas que visam à implantação, em âmbito nacional, dos métodos alternativos em pesquisa. No Brasil, desde 2012, há grande movimentação de várias esferas que buscam alavancar esse processo no país investindo na disseminação do conhecimento, na harmonização entre os laboratórios, na capacitação dos grupos nos diferentes ensaios que hoje são aceitos pela Anvisa e na elaboração de um processo de validação nacional. Além disso, o Brasil é um país de grande nível científico, sede de importantes universidades e conta com elevado número de mestres e doutores que são formados anualmente. Esse contexto favorece a posição destes autores não apenas como agentes capazes de produzir ciência, mas também como participantes ativos do desenvolvimento científico, que caminha para um futuro livre de experimentação animal.

Mesmo nesse cenário ainda existem desafios a serem superados, como o aprimoramento do processo de importação de insumos pelo país e a evolução dos ensaios toxicológicos *in vitro* para que possam permitir obter respostas mais assertivas e robustas quanto à segurança dos produtos.

Referências

1. WMS Russell, RL Burch. The principles of humane experimental technique. London, UK, Methuen, 1959
2. OECD. OECD Economic Outlook No. 34 (Edition 1983/2), OECD Economic Outlook: Statistics and Projections (database), 1983. On-line. Disponível em: www.oecd-ilibrary.org/economics/data/oecd-economic-outlook-statistics-and-projections/oecd-economic-outlook-no-34_data-00132-en. Acesso em:14/10/2019
3. O Presgrave, W Moura, C Caldeira, E Pereira, MHV Boas, C Eskes. Brazilian Center for the Validation of Alternative Methods (BraCVAM) and the Process of Validation in Brazil. ATLA (44):85–90, 2016
4. Presgrave, C Caldeira, W Moura, M Cruz, G Méier, E Santos, MHV Boas. Participation of Brazil in the World Congresses on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences: Na Increase in Commitment to the Three Rs. ATLA (**43**):69–72, 2015
5. Concea. RN nº 17: Dispõe sobre o reconhecimento de métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil e dá outras providências. On-line. Disponível em: http://www.lex.com.br/legis_25707022_RESOLUCAO_NORMATIVA_N_17_DE_3_DE_JULHO_DE_2014.aspx. Acesso em 14/10/2019
6. Concea. RN nº 18: Reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil, nos termos da Resolução Normativa nº 17, de 3 de julho de 2014, e dá outras providências. On-line. Disponível em: https://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/Resolucao-Normativa-CONCEA-n-18-de-24.09.2014-D.O.U.-de-25.09.2014-Secao-I-Pag.-9.pdf. Acesso em 14/10/2019
7. Concea. RN nº 31: Reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil. On-line. Disponível em: https://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/Resolucao-Normativa-CONCEA-n-31-de-18.08.2016-D.O.U.-de-19.08.2016-Secao-I-Pag.-04.pdf. Acesso em 14/10/2019
8. Anvisa. RDC Nº 35/15: Dispõe sobre a aceitação dos métodos alternativos de experimentação animal reconhecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - Concea. Disponível em: http://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/32389206/do1-2015-08-10-resolucao-rdc-n-35-de-7-de-agosto-de-2015-32389026. Acesso em 14/10/2019
9. MCTIC. Premasul: O que é. On-line. Disponível em: https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/ciencia/SEPED/Saude/PReMASUL/PReMASUL.html. Acesso em 10/10/2019.
10. LD Moretto, MA Stephano. Métodos Alternativos ao uso de Animais em Pesquisa Reconhecidos no Brasil. 1ª ed, Limay Editora, São Paulo, 2019
11. OECD. Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4 - Test No. 404: Acute Dermal Irritation/Corrosion, OECD Publishing, Paris, 2015. DOI.org/10.1787/9789264242678-en

12. OECD. Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4 - Test No. 430: In Vitro Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test Method (TER), OECD Publishing, Paris, 2015. DOI.org/10.1787/9789264242739-en
13. OECD. Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4 - Test No. 431: In vitro skin corrosion: reconstructed human epidermis (RHE) test method, OECD Publishing, Paris, 2019. DOI.org/10.1787/9789264264618-en
14. OECD. Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4 - Test No. 435: In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion, OECD Publishing, Paris, 2015. DOI.org/10.1787/9789264242791-en
15. OECD. Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4 - Test No. 439: In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method, OECD Publishing, Paris, 2019. DOI.org/10.1787/9789264242845-en
16. OECD. Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4 - Test No. 405: Acute Eye Irritation/Corrosion, OECD Publishing, Paris, 2017. DOI.org/10.1787/9789264185333-en
17. OECD. Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4 - Test No. 437: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage, OECD Publishing, Paris, 2017. DOI.org/10.1787/9789264203846-en
18. OECD. Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4 - Test No. 438: Isolated Chicken Eye Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage, OECD Publishing, Paris, 2018. DOI.org/10.1787/9789264203860-en
19. OECD. Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4 - Test No. 460: Fluorescein Leakage Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants, OECD Publishing, Paris, 2017. DOI.org/10.1787/9789264185401-en
20. OECD. Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4 - Test No. 432: In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, 2019. DOI.org/10.1787/9789264071162-en
21. OECD. Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4 - Test No. 427: Skin Absorption: In Vivo Method, OECD Publishing, Paris, 2004. DOI.org/10.1787/9789264071063-en
22. OECD. Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4 - Test No. 428: Skin Absorption: In Vitro Method, OECD Publishing, Paris, 2004. DOI.org/10.1787/9789264071087-en
23. OECD. Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4 - Test No. 406: Skin Sensitisation, OECD Publishing, Paris, 1992. DOI.org/10.1787/9789264070660-en
24. OECD. Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4 - Test No. 429: Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, OECD Publishing, Paris, 2010. DOI.org/10.1787/9789264071100-en
25. OECD. Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4 - Test No. 442A: Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay: DA, OECD Publishing, Paris, 2010. DOI.org/10.1787/9789264090972-en
26. OECD. Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4 - Test No. 442B: Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA or –FCM, OECD Publishing, Paris, 2018. DOI.org/10.1787/9789264090996-en
27. OECD. Series on Testing and Assessment, No. 24 - Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing, OECD Publishing, Paris, 2002. DOI.org/10.1787/9789264078413-en
28. OECD. Series on Testing and Assessment, No. 129 - Guidance Document On Using Cytotoxicity Tests To Estimate Starting Doses For Acute Oral Systemic Toxicity, OECD Publishing, Paris, 2010. On-line. Disponível em: http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2010)20&doclanguage=en. Acesso em: 14/10/2019
29. OECD. Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4 - Test No. 420: Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Procedure, OECD Publishing, Paris, 2002. DOI.org/10.1787/9789264070943-en
30. OECD. Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4 - Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method, OECD Publishing, Paris, 2002. DOI.org/10.1787/9789264071001-en
31. OECD. Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4 - Test No. 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure, OECD Publishing, Paris, 2008. DOI.org/10.1787/9789264071049-en

32. OECD. Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4 - Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, OECD Publishing, Paris, 2016. DOI.org/10.1787/9789264264762-en
33. OECD. Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4 - Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test, OECD Publishing, Paris, 2016. DOI.org/10.1787/9789264264861-en
34. OECD. Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4 - Test No. 491: Short Time Exposure In Vitro Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage, OECD Publishing, 2018. DOI.org/10.1787/97892642424 32-en
35. OECD. Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4 - Test No. 492: Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage, OECD Publishing, Paris, 2019. DOI.org/10.1787/9789264242548-en
36. OECD. Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4 - Test No. 442C: In Chemico Skin Sensitisation: Assays addressing the Adverse Outcome Pathway key event on covalent binding to proteins, OECD Publishing, Paris, 2019. DOI.org/10.1787/9789264229709-en
37. OECD. Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4 - Test No. 442D: In Vitro Skin Sensitisation: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method, OECD Publishing, Paris, 2018. DOI.org/10.1787/9789264229822-en
38. OECD. Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4 - Test No. 421: Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test, OECD Publishing, Paris, 2016. DOI.org/10.1787/9789264264380-en
39. OECD. Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4 - Test No. 422: Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/ Developmental Toxicity Screening Test, OECD Publishing, Paris, 2016. DOI.org/10.1787/9789264264403-en
40. Anvisa. Farmacopeia Brasileira, 6ª ed, vol I, Brasília 2019
41. Abihpec. Panorama do Setor 2019. On-line. Disponível em: https://abihpec.org.br/publicacao/panorama-do-setor-2019-2/. Acesso em 8/10/2019
42. Anvisa. Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos, 2ª ed, Brasília, 2012. On-line. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/106351/107910/Guia+para+Avalia%C3%A7%C3%A3o+de+Seguran%C3%A7a+de+Produtos+Cosm%C3%A9ticos/ab0c660d-3a8c-4698-853a-096501c1dc7c. Acesso em: 14/10/2019
43. Assembleia Legislativa do Estado de São Paulo. Lei nº 15.316, de 23/1/2014: Proíbe a utilização de animais para desenvolvimento, experimento e teste de produtos cosméticos e de higiene pessoal, perfumes e seus componentes e dá outras providências. On-line. Disponível em: https://www.al.sp.gov.br/norma/172282. Acesso em: 10/10/2019.
44. Assembleia Legislativa do Estado de Mato Grosso do Sul. Lei nº 4.538, de 3/7/2014: Proíbe a utilização de animais para desenvolvimento, experimento e teste de produtos cosméticos e de higiene pessoal, perfumes e seus componentes e dá outras providências. On-line. Disponível em: https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=271023. Acesso em: 10/10/2019
45. Assembleia Legislativa do Estado do Paraná. Lei nº 18.668, de 22/12/2015: Proíbe a utilização de animais para desenvolvimento de experimentos e testes de produtos cosméticos, de higiene pessoal, perfumes, e seus componentes. On-line. Disponível em: https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=314531. Acesso em: 10/10/2019
46. Assembleia Legislativa do Estado do Pará. Lei Estadual nº 8.361, de 11/5/2016: Proíbe a utilização de animais para desenvolvimento de experimentos e testes de produtos cosméticos, de higiene pessoal, perfumes, e seus componentes. On-line. Disponível em: https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=320483. Acesso em: 10/10/2019.
47. Assembleia Legislativa do Estado do Rio de Janeiro. Lei Estadual nº 7.814, de 15/12/2017: Proíbe a utilização de animais para desenvolvimento de experimentos e testes de produtos cosméticos, de higiene pessoal, perfumes, e seus componentes. On-line. Disponível em: https://gov-rj.jusbrasil.com.br/legislacao/533361597/lei-7814-17-rio-de-janeiro-rj. Acesso em: 10/10/2019.
48. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Lei Estadual nº 23.050, de 25/7/2018: Proíbe a utilização de animais para desenvolvimento de experimentos e testes de produtos cosméticos, de higiene pessoal, perfumes, e seus componentes. On-line. Disponível em: https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=365473. Acesso em: 10/10/2019.
49. Assembleia Legislativa do Estado do Amazonas. Lei Estadual nº 289, de 3/12/2015: Proíbe a utilização de animais para desenvolvimento de experimentos e testes de produtos cosméticos, de higiene pessoal, perfumes, e seus componentes. On-line. Disponível em: https://sapl.al.am.leg.br/media/sapl/public/normajuridica/2015/9412/9412_texto_integral.pdf. Acesso em: 10/10/2019.
50. Senado Federal. Projeto de Lei Federal PLC nº 70, 2014: Altera dispositivos dos arts. 14, 17 e 18 da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, para dispor sobre a vedação da utilização de animais em atividades de ensino, pesquisas e testes laboratoriais com substâncias para o desenvolvimento de produtos de uso cosmético em humanos e aumentar os valores de multa nos casos de violação de seus dispositivos. On-line. Disponível em: https://www25.senado.leg.br/web/atividade/materias/-/materia/118217. Acesso em: 10/10/2019.
51. Y Jang, J Kim, S Jeong, M Cho. Towards a Strategic Approaches in Alternative Tests for Pesticide Safety. Toxicol Res 30(3):159-168, 2014
52. Anvisa. RDC Nº 294/19: Dispõe sobre os critérios para avaliação e classificação toxicológica, priorização da análise e comparação da ação toxicológica de agrotóxicos, componentes, afins e preservativos de madeira, e dá outras providências. Disponível em: http://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-da-diretoria-colegiada-rdc-n-294-de-29-de-julho-de-2019-207941987. Acesso em 29/10/2019
53. OECD. Series on Testing and Assessment, No. 203 - Guidance Document on an Integrated Approach on Testing and Assessment (IATA) for Skin Corrosion and Irritation, OECD Publishing, Paris, 2017. DOI.org/10.1787/9789264274693-en
54. OECD. Series on Testing and Assessment, No. 263 - Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) for Serious Eye Damage and Eye Irritation, OECD Publishing, Paris, 2019. On-line. Disponível em: http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV-JM-MONO(2017)15/REV1%20&doclanguage=en. Acesso em: 14/10/2019
55. OECD. Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4 - Test No. 494: Vitrigel-Eye Irritancy Test Method for Identifying Chemicals Not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage, OECD Publishing, Paris, 2019. DOI.org/10.1787/9f20068a-en
56. OECD. Series on Testing and Assessment, Guidance Document on the Reporting of Defined Approaches and Individual Information Sources to be Used within Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) for Skin Sensitisation, No. 256, OECD Publishing, Paris, 2017. DOI.org/10.1787/9789264279285-en
57. OECD. Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4 - Test No. 442E: In Vitro Skin Sensitisation: In Vitro Skin Sensitisation assays addressing the Key Event on activation of dendritic cells on the Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation, OECD Publishing, Paris, 2018. DOI.org/10.1787/9789264264359-en
58. S Adler et al. Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospect. Arch Toxicol 85:367-485, 2010
59. AT Karlberg, MA Bergström, A Börje, K Luthman, JL Nilsson. Allergic contact dermatites formation, structural requirements, and reactivity of skin sensitizers. Chem Res Toxicol 21:53-69, 2008
60. I Kimber, DA Basketter, GF Gerberick, CA Ryan, RJ Dearman. Chemical allergy: translating biology into hazard characterization. Toxicol Sci 120:238-68, 2011
61. SF Martin et al. T-cell recognition of chemicals, protein allergens and drugs: towards the development of in vitro assays. Cell Mol Life Sci 67:4171-84, 2010
62. M Vocanson, A Hennino, A Rozières, G Poyet, JF Nicolas. Effector and regulatory mechanisms in allergic contact dermatitis. Allergy 64:1699-714, 2009
63. OECD. Series on Testing and Assessment No.168 - The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence, OECD Publishing, Paris, 2014. DOI.org/10.1787/9789264221444-en
64. OECD. The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 2: Use of the AOP to Develop Chemical Categories and Integrated Assessment and Testing Approaches. Series on Testing and Assessment No. 168, OECD Publishing, Paris, 2014. DOI.org/10.1787/9789264221444-en
65. ICCVAM. Report of the International Workshop on In Vitro Methods for Assessing Acute Systemic Toxicity. NIH Publication Nº 01-4499. Research Triangle Park, NC: National Institute for Environmental Health Sciences, 2001. On-line. Disponível em: https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/acutetox_docs/finalrpt/finalall0801.pdf. Acesso em: 14/10/2019

PRELLIANCE®

Multifuncionalidade nos cuidados dos cabelos

Ação anticaspa com efeito prebiótico
Radiância
Penteabilidade
Antipoluição
Nutrição | Hidratação

Efeito imediato e com enxague

100% BRASILEIRO

PRELLIANCE®
in-cosmetics latin america
GOLD

Somos gold

Traga para suas formulações
esse ingrediente premiado!

Rua 52.001, N 200 | Lote 237C, Zona 52 | Rod 317, Km 12
Distrito de Floriano | Cep 87065 571 | Maringá - PR
+55 (44) 3260 8000 | www.solabia.com.br | contato@solabia.com.br

Solabia

Visioscan VC 20plus

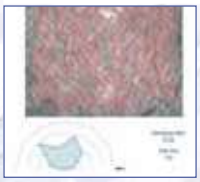
PARA MELHOR AVALIAR A TOPOGRAFIA DA PELE

Hardware e software aprimorados oferecem infinitas possibilidades

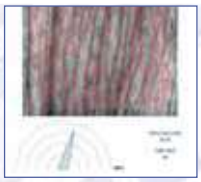
O **Visioscan VC 20plus** é uma câmera de alta resolução, com fonte de luz UV e com autofoco, para iluminação homogenia da superfície da pele.

O **Visioscan VC 20plus** utiliza a nova versão do software SELS *(Surface Evaluation of the Living Skin)* para medições da topografia da pele (rugosidade, textura, volume e superfície), também calcula os parâmetros de anisotropia e o tamanho das células (polígonos entre as linhas visíveis). Além disso, permite desenhar linhas para avaliar o comprimento ou a espessura de um fio de cabelo, e desenhar contornos para avaliar pontos e lesões, entre outras funções.

Porduz imagens 3D, permite análises com **Sebufix®** e **Corneofix®**. Os dados mostrados na tela são salvados com as imagens.



Anisotropy-low



Anisotropy-high

SELS-after

SELS-before

TECNOTESTS

Distribuidor exclusivo no Brasil: **Tecnotests Produtos e Serviços Ltda.**

Rua Álvaro de Menezes 74 – sala 1– 04007-020 – São Paulo – SP

(11) 3884-8756 | tecnotests@tecnotests.com.br | www.tecnotets.com.br

66. H Spielmann, E Genschow, M Liebsch, W Halle. Determination of the starting dose for acute oral toxicity (DL50) testing in the up and down procedure (UDP) from cytotoxicity data. Altern Lab Anim 27:957-966, 1999
67. IASPS. International Survey on Aesthetic/Cosmetic Procedures Performed in 2017. On-line. Disponível em: https://www.isaps.org/wpcontent/uploads/2018/10/ISAPS_2017_International_Study_Cosmetic_Procedures.pdf. Acesso em: 11/10/2019
68. G Facchini, S Eberlin, SP Clerici, ALTA Pinheiro, A Costa. Ultraviolet A photosensitivity profile of dexchlorpheniramine maleate and promethazine-based creams: Anti-inflammatory, antihistaminic, and skin barrier protection properties. J Cosmet Dermatol 16(4):e59-e67, 2017. DOI: 10.1111/jocd.12349
69. S Eberlin, G Facchini, S Eberlin, ALTA Pinheiro, MS Silva, AS Pinheiro, A Costa. Alternative methodology for the study of infrared-A radiation effects on human skin. Surg Cosmet Dermatol 8(2):115-20, 2016
70. EL Ayres, A Costa, S Eberlin, SP Clerici. Ex vivo study for evaluating the whitening activity of Pycnogenol® after exposure to ultraviolet and infrared radiations, and visible light. Surg Cosmet Dermatol 7(4):303-7, 2015
71. G Facchini, MS Silva, ALTA Pinheiro, AV Schwambach, S Eberlin, AS Pinheiro, S Eberlin. Transcriptome (RNA-Seq) Analysis of Human Skin Exposed to Infrared-A Radiation: New Targets for Photodamage. IFSCC Magazine 22(2):101–8, 2019
72. BS Mello Netto, JM Corassa, G Facchini, MS Silva, S Eberlin. Avaliação pré-clínica dos efeitos profiláticos do extrato de Pinus pinaster (Pycnogenol®) sobre a deposição cutânea de hemossiderina. Surg Cosmet Dermatol 11(2):121-5, 2019
73. AFC Pereira, MH Igarashi, M Mercuri, AF Pereira, ALTA Pinheiro, MS Silva, G Facchini, S Eberlin. Whitening effects of cosmetic formulation in the vascular component of skin pigmentation. J of Cosmetic Dermatology, 10/5/2019. DOI.org/10.1111/jocd.12979
74. MS Silva, G Facchini, ALTA Pinheiro, AS Pinheiro, S Eberlin, S Eberlin. Envelhecimento do folículo capilar impulsionado pela radiação ultravioleta via proteólise de COL17A1. Cosm & Toil Brasil 30(1):46-49, 2018
75. Pinheiro ALTA, Lizárraga A, Silva MS, Facchini G, Eberlin S. El envejecimiento cutáneo y la "revolución gris", Arte y Ciencia Cosmética 28(65):18-24, 2016
76. S Eberlin, SP Clerici, S Eberlin, ALTA Pinheiro, AS Pinheiro. Preclinical Evaluation of the Effect of Infrared-A Radiation and Visible Light on the Melanogenesis Process Using an In Vitro Model of Cell Cultures and an Ex Vivo Model of Skin Culture. IFSCC Magazine 19(2):69-72, 2016

- **Samara Eberlin** é farmacêutica, mestre em Fisiopatologia Médica e doutora em Farmacologia pela Faculdade de Ciência Médicas da Universidade Estadual de Campinas (FCM-Unicamp) e gerente técnica do Departamento de ensaios pré-clínicos do Grupo Kosmoscience, Campinas SP, Brasil.
- **Michelle Sabrina da Silva** é bióloga, doutora em Farmacologia pela Faculdade de Ciência Médicas da Universidade Estadual de Campinas (FCM-Unicamp) e pesquisadora do Departamento de ensaios pré-clínicos do Grupo Kosmoscience, Campinas SP, Brasil.
- **Gustavo Facchini** é biólogo, mestre e doutor em Biologia Funcional e Molecular pelo Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (IB/Unicamp) e pesquisador do Departamento de ensaios pré-clínicos do Grupo Kosmoscience, Campinas SP, Brasil.
- **Gustavo Henrique da Silva** é biólogo pela Universidade Estadual Paulista (Unesp) e assistente de laboratório do Departamento de ensaios pré-clínicos do Grupo Kosmoscience, Campinas SP, Brasil.
- **Ana Lúcia Tabarini Alves Pinheiro** é médica, pós-graduada em Dermatologia Clínica e Dermatologia Estética Avançada e diretora clínica e responsável médica do Grupo Kosmoscience, Campinas SP, Brasil.
- **Adriano da Silva Pinheiro** é bacharel em Química Tecnológica pela Universidade Federal de São Carlos (UfSCar) e diretor-executivo do Grupo Kosmoscience, Campinas SP, Brasil.