

Ensaios da membrana cório-alantoide (HET-CAM e CAM-TBS): alternativas para a avaliação toxicológica de produtos com baixo potencial de irritação ocular

Chorioallantoic membrane assays (HET-CAM and CAM-TBS): alternative tests for performing toxicological evaluation of products with low potential for ocular irritation

RIALA6/1447

Amanda Gleyce Lima de OLIVEIRA¹, Ronald Santos SILVA², Eloisa Nunes ALVES², Rosaura de Farias PRESGRAVE², Octavio Augusto França PRESGRAVE², Isabella Fernandes DELGADO^{3*}

*Endereço para correspondência: ³Vice-Diretoria de Pesquisa e Ensino, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – Fundação Oswaldo Cruz. Av. Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, CEP 21040-900. Tel.: (21) 3865-5163, fax: (21) 2290-0915. E-mail: isabella.delgado@incqs.fiocruz.br.

¹Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica – PIBIC/FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

²Departamento de Farmacologia e Toxicologia, INCQS/FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

Recebido: 21.10.2011 - Aceito para publicação: 06.02.2012

RESUMO

O presente estudo analisou o potencial preditivo de dois modelos que utilizam a membrana cório-alantoide de ovo embrionado de galinha (i.e. o HET-CAM e sua versão modificada, o CAM-TBS, que quantifica os danos à membrana por meio da absorção do corante azul trypan), como estratégia para a implementação de alternativas aos testes *in vivo* de avaliação de toxicidade ocular. Vinte colírios foram avaliados *in vivo* por meio do teste de irritação ocular de Draize e por ensaios *in vitro* utilizando-se testes HET-CAM e CAM-TBS. Todos os colírios foram classificados como não irritantes pelo teste *in vivo*. No ensaio HET-CAM, foram observados 4 resultados falso-positivos, e o teste apresentou especificidade e precisão de 80%. O CAM-TBS demonstrou melhor desempenho, pois a especificidade e a precisão foram de 100%. O ponto de corte adotado (*cut-off* = 0,9) no HET-CAM é discutido, uma vez que os resultados falso-positivos observados no presente estudo poderiam ter sido contornados caso a categoria “não irritante” englobasse produtos “não irritantes” e “irritantes leves”, à semelhança do critério preconizado para o CAM-TBS (*cut-off* = 7,0).

Palavras-chave. teste de Draize, irritação ocular, colírios, métodos alternativos, vigilância sanitária, toxicidade *in vitro*.

ABSTRACT

This study aimed at evaluating the predictive potential of the conventional Hen's Egg Chorionallantoic Membrane (HET-CAM) test and its version CAM-TBS, that quantifies the damage to the membrane cause by absorption of dye trypan blue, in order to propose an alternative assay for assessing the ocular toxicity. Twenty collyria were evaluated *in vivo* by means of Draize eye irritation test, and by *in vitro* HET-CAM and CAM-TBS assays. All the analyzed collyria were classified as non-irritant by *in vivo* testing. In HET-CAM assay, 4 false positive results were observed, and the test specificity and accuracy were of 80%. CAM-TBS showed a better performance, having specificity and accuracy of 100%. The cut-off set up for HET-CAM test (0.9) is discussed, as the false-positive results observed in this study could have been bypassed if the category “non-irritant” encompassed “non-irritant” and “mild irritant” products, in compliance with the criteria recommended for CAM-TBS (*cut-off* = 7.0).

Keywords. Draize test, ocular irritation, collyrium, alternative methods, sanitary surveillance, *in vitro* toxicology.

INTRODUÇÃO

O potencial irritante de diversos produtos e substâncias químicas, como agrotóxicos, cosméticos e medicamentos de uso tópico, é avaliado desde a década de 1940 por meio de experimentos com animais de laboratório. Alguns dos ensaios adotados com o objetivo de determinar o grau de irritabilidade, chamados de testes de irritação ocular ou cutânea, foram descritos inicialmente por John H. Draize^{1,2} e ainda hoje são adotados mundialmente por órgãos oficiais^{3,4}.

Com a busca global por substituir os testes *in vivo*, cientistas de diversas áreas passaram a desenvolver e apresentar resultados de métodos alternativos para demonstrar a segurança e a eficácia de seus produtos. Geralmente, ao se falar em métodos alternativos, pensa-se apenas na substituição, porém pode-se definir como método alternativo qualquer procedimento que possa ser utilizado para substituir, reduzir ou refinar o uso de animais em experimentação, a fim de minimizar a dor e o desconforto, conforme o princípio dos 3R's descrito por William Russell e Rex Burch em *The principles of humane experimental technique*^{5,6,7}.

Além de questões éticas, a procura por ensaios *in vitro* visa alcançar vantagens como: maior eficácia, menor custo e maior facilidade de difusão e incorporação de tais metodologias por outros laboratórios, sendo, portanto, uma questão de grande relevância para os laboratórios oficiais de controle da qualidade^{8,9}.

Nas últimas décadas, várias metodologias alternativas foram estudadas, porém poucas foram validadas, sendo necessário o aprofundamento de estudos sobre a aplicabilidade de alguns ensaios *in vitro*¹⁰. Entre as limitações descritas na literatura científica com relação à substituição do teste de irritação ocular de Draize, destaca-se o fato de que as metodologias alternativas, como o modelo HET-CAM, podem tanto subestimar^{11,12} como superestimar resultados obtidos *in vivo*¹³, dependendo de fatores como natureza da substância-teste, seu potencial irritante e a presença de efeitos irreversíveis *in vivo*. Embora alguns métodos alternativos ao teste de irritação ocular de Draize, como o teste de opacidade e permeabilidade de córnea bovina (BCOP, *bovine corneal opacity and permeability*) e o teste do olho enucleado de galinha (ICE, *isolated chicken eye*), tenham sido formalmente validados¹⁴, estes não se aplicam à avaliação de produtos com baixo potencial irritante, pois possuem boa capacidade de predição apenas para produtos corrosivos ou com potencial irritante severo.

Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo a avaliação do potencial preditivo do modelo da membrana cório-alantoide de ovo embrionado de galinha (HET-CAM, *hen's egg test chorionallantoic membrane*) e de sua modificação (CAM-TBS, *chorionallantoic membrane - trypan blue staining*), que avalia os danos à membrana cório-alantoide pela quantidade do corante azul de trypan absorvido pela mesma, visando a propor alternativas para avaliação da toxicidade ocular de produtos com baixo potencial irritante.

METODOLOGIA

Amostras

Neste estudo, foram avaliados 20 colírios adquiridos no comércio do município do Rio de Janeiro, conforme Tabela 1. Todos os produtos foram codificados (Co01 a Co20) e testados sem diluição.

Teste de irritação ocular de Draize

Todos os dados utilizados neste estudo foram adquiridos no banco de dados do Setor de Irritação do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fiocruz. O teste *in vivo* foi realizado de acordo com o procedimento operacional padrão do INCQS¹⁵, sendo utilizada a classificação de Kay e Calandra modificada¹⁶.

No teste de Draize, para cada amostra, foram utilizados cinco coelhos da raça Nova Zelândia, tanto machos quanto fêmeas, hígidos e de peso corpóreo acima de 2 kg. Esses coelhos foram obtidos do Centro de Criação de Animais de Laboratório (Cecal/Fiocruz). Instilou-se 0,1 mL da amostra no saco conjuntival inferior e, logo após, massageou-se a área gentilmente num período de 30 segundos. Depois de aplicar a amostra, foram realizadas leituras no decorrer de 24, 48 e 72 horas e sete dias com o objetivo de observar as alterações macroscópicas que poderiam ocorrer nas estruturas do olho do coelho (córnea, íris e conjuntiva) e calcular a média dos escores máximo (MEM) por amostra analisada.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais da Fiocruz, sob o protocolo n. 79/09-1.

Ensaio *in vitro*

Cada colírio foi testado em triplicata, tanto no HET-CAM como no CAM-TBS, e o resultado final foi apresentado como a média de três ensaios independentes.

Para a realização dos testes *in vitro*, foram utilizados ovos fertilizados de galinha da raça Leghorn, livres de patógenos específicos (SPF, *specific pathogen free*), incubados por 10 dias à temperatura de $38,0 \pm 0,5$ °C e umidade relativa de aproximadamente 70%.

Ensaio HET-CAM

Para a realização de cada ensaio, foram utilizados 4 ovos por produto testado. No décimo dia de incubação, foi removida a casca do ovo ao redor da câmara de ar, evidenciando, assim, a membrana da casca. Esta foi removida cuidadosamente, a membrana cório-alantoide foi exposta, e foram aplicados nesta última 300 µL do produto. Depois de 20 segundos de contato, o produto foi removido, lavando-se a membrana cório-alantoide com solução salina isotônica a 37,0 °C. Durante 5 minutos, a membrana cório-alantoide foi examinada e as reações fisiológicas observadas foram graduadas em função de seu tempo de aparecimento, conforme indicado na Tabela 2.

Este ensaio foi realizado conforme a metodologia descrita no *Journal Officiel de la République Française*¹⁷.

A classificação final dos produtos, de acordo com seu potencial de irritabilidade no ensaio HET-CAM, está descrita na Tabela 3.

Ensaio CAM-TBS

O procedimento inicial dessa metodologia é semelhante ao do ensaio do HET-CAM, em que também foram utilizados 4 ovos, os quais, no décimo dia de incubação, tiveram a membrana cório-alantoide exposta. Sobre esta, foi colocado um anel de silicone para delimitar a área tratada. Foram aplicados 200 µL do produto sobre a membrana cório-alantoide, e, após 20 segundos, a área foi lavada com água destilada em temperatura ambiente. Depois da remoção do produto, foram aplicados 500 µL da solução corante azul de trypan a 0,1% (P/V), deixando agir por 1 minuto. Em seguida, o corante foi removido lavando-se a área tratada com uma pisseta contendo água destilada durante 20 segundos. Com auxílio de uma tesoura, a área tratada da membrana foi retirada e colocada em um tubo contendo 5 mL de formamida, o qual foi centrifugado com velocidade de 3.200 rpm por aproximadamente 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para uma cubeta de quartzo, e a leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm.

A quantidade de azul de trypan absorvido pela membrana cório-alantoide foi calculada usando-se a

seguinte equação: corante absorvido = absorbância x 5 nmol/1.000 × 10⁹.

A curva de calibração do corante foi feita com soluções de azul de trypan em formamida nas concentrações 10⁻⁶, 10⁻⁵ e 5 × 10⁻⁵ mol/L, lidas no espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm.

Este ensaio foi realizado conforme a metodologia descrita no protocolo INVITTOX n. 108¹⁸, e os produtos, classificados de acordo com a proposta de Lagarto¹⁹, conforme Tabela 4.

Análise estatística

Para determinação da sensibilidade, da especificidade e da precisão dos modelos HET-CAM e CAM-TBS, compararam-se os resultados *in vitro* com os resultados *in vivo* por meio de tabelas de contingência.

RESULTADOS

Pelos resultados obtidos das médias das triplicadas nos ensaios HET-CAM e CAM-TBS, foi possível classificar cada amostra de acordo com sua metodologia específica. Os resultados dessa classificação, assim como os valores médios obtidos, estão demonstrados na Tabela 5, que ainda traz a classificação obtida no teste de Draize, em que os valores de MEM variaram entre 0 e 0,8.

No ensaio HET-CAM, observamos 4 resultados falso-positivos, o que resultou em especificidade e precisão de 80%. O CAM-TBS demonstrou melhor desempenho, uma vez que os colírios Co03, Co05, Co7 e Co17, classificados como “irritantes leves” no ensaio HET-CAM, receberam a classificação “não irritante” no CAM-TBS, indicando especificidade e precisão superiores deste ensaio em reação ao modelo clássico HET-CAM.

A sensibilidade não pode ser calculada para nenhuma das metodologias *in vitro*, uma vez que todos os produtos foram classificados como não irritantes no coelho, não havendo, portanto, resultados positivos no modelo *in vivo*.

DISCUSSÃO

Quando os ensaios *in vivo* não podem ser substituídos por um único método alternativo, como parece ser a situação do teste de irritação ocular de Draize, deve ser levado em consideração o desenvolvimento de análise que inclua uma variedade de ensaios, em que os

Tabela 1. Formulação dos colírios analisados

Colírio	Composição
Co01	Fenolsulfonato de zinco (1,0 mg), cloridrato de nafazolina (0,5 mg). Veículo: sulfato de berberina, clorobutanol hidratado, cloreto de benzalcônio, citrato de sódio, glicerina, hidroxipropilcelulose e água purificada.
Co02	Cloridrato de metiltionínio (0,015 mg), cloridrato de tetrizolina (0,5 mg). Excipientes: hidroxipropilmetilcelulose, fosfato de sódio monobásico, fosfato dissódico, cloreto de sódio, cloreto de benzalcônio, edetato dissódico, água purificada.
Co03	Cloridrato de nafazolina (0,15 mg), sulfato de zinco (0,3 mg). Veículo: ácido bórico, borato de sódio, cloreto de benzalcônio, edetato dissódico, água para injetáveis.
Co04	Cloridrato de metiltionínio (0,15 mg), cloridrato de tetrizolina (0,5 mg). Veículo: ácido bórico, borato de sódio, cloreto de sódio, edetato dissódico, cloreto de benzalcônio como conservante e água destilada.
Co05	Clorobutanol (2,132 mg), ácido bórico (21,911 mg), cloreto de sódio (4,361 mg). Veículo: água purificada estéril.
Co06	Cloridrato de nafazolina (0,12 mg). Veículo: constituído de dextrano 70, hipromelose, cloreto de potássio, hidróxido de sódio e/ou ácido clorídrico, com edetato dissódico e cloreto de benzalcônio como conservante, e água purificada.
Co07	Álcool polivinílico (14 mg). Excipientes: cloreto de sódio, cloreto de benzalcônio, edetato dissódico, fosfato de sódio dibásico heptahidratado, fosfato de sódio monobásico monohidratado e água purificada.
Co08	Sulfato de condroitina (0,03 mg). Veículo: hialuronato de sódio, aprotinina, sorbato de potássio, cloreto de sódio, edetato dissódico e água purificada.
Co09	Dextrana 70 (0,001 g), hipromelose (0,003 g). Veículo: borato de sódio, cloreto de sódio, cloreto de potássio como conservante e água purificada.
Co10	Cloridrato de nafazolina (0,25 mg), maleato de feniramina (3 mg). Veículo: ácido bórico, borato de sódio, edetato dissódico, cloreto de benzalcônio como conservante e água purificada.
Co11	Pranoprofen (1 mg). Veículo: ácido bórico, borato de sódio, polissorbato 80, edetato dissódico, cloreto de benzalcônio e água purificada.
Co12	Cromoglicato dissódico (20 e 40 mg). Veículo: edetato de sódio, cloreto de benzalcônio como conservante e água purificada.
Co13	Cloridrato de tetrizolina (0,5 mg), sulfato de zinco (1 mL). Veículo: azul de metileno, ácido bórico, citrato de sódio, polisorbato 80, cloreto de benzalcônio e água purificada.
Co14	Dexametasona (1 mg), cloranfenicol (5 mg). Veículo: ácido bórico, borato de sódio, digluconato de clorexidina, edetato dissódico, cremophor RH40, plasdoni, bissulfito de sódio, creatinina e água purificada.
Co15	Hipromelose (5 mg). Veículo: fosfato de sódio dibásico, fosfato de sódio monobásico, cloreto de sódio, cloreto de potássio, citrato de sódio, edetato dissódico, metilparabeno, propilparabeno e água purificada.
Co16	Cloreto de benzalcônio (0,1 mg), ácido bórico (17 mg). Veículo: 0,1 mL de hidrolato de camomila, 0,1 mL de hidrolato de hamamelis, 3 mg de borato de sódio e água purificada.
Co17	Cloridrato de fenilefrina (100 mg). Veículo: citrato de sódio diidratado, metabissulfito de sódio, edetato dissódico, cloreto de benzalcônio e água purificada.
Co18	Cromoglicato dissódico (20 mg). Veículo: edetato dissódico, cloreto de benzalcônio como conservante e água purificada.
Co19	Sal sódico do ácido isopaglúmico (49 mg). Veículo: cloreto de benzalcônio e água purificada.
Co20	Dexametasona (0,05 mg), cloranfenicol (5 mg), cloridrato de tetrizolina (0,25 mg). Veículo: hipromelose, ácido bórico, borato de sódio, edetato dissódico, tiomersal, polivinilpirrolidona e água purificada.

Co = colírio.

Tabela 2. Graduação das alterações observadas na membrana córneo-alantoide do ovo embrionado de galinha

FENÔMENOS	TEMPO		
	≤ 30 segundos	30 segundos < t ≤ 2 minutos	2 minutos < t ≤ 5 minutos
Hiperemia	5	3	1
Hemorragia	7	5	3
Coagulação/Opacidade	9	7	5

Tabela 3. Classificação final do produto quanto ao seu potencial de irritabilidade no HET-CAM

Faixa (graduação das lesões)	Classificação
0,0 a 0,9	Não irritante (NI)
1,0 a 4,9	Irritante leve (IL)
5,0 a 8,9	Irritante moderado (IM)
9,0 a 21	Irritante severo (IS)

Fonte: *Journal Officiel de la Republique Française* (1996)

Tabela 4. Classificação final dos produtos quanto ao seu potencial de irritabilidade no ensaio CAM-TBS

Faixa (quantificação do corante)	Classificação
< 7,0	Não Irritante/Irritante Leve (NI)
7,0 a 14,5	Irritante Moderado (IM)
> 14,5	Irritante Severo (IS)

Fonte: LAGARTO et al., 2006

Tabela 5. Classificação obtida no teste de Draize em comparação com HET-CAM e CAM-TBS

Colírios	Draize		HET-CAM		CAM-TBS	
	MEM	Classificação	Média	Classificação	Média	Classificação
Co01	0	NI	0,88	NI	2,87	NI
Co02	0	NI	0,14	NI	3,57	NI
Co03	0	NI	1,20	IL	2,61	NI
Co04	0	NI	0,25	NI	1,69	NI
Co05	0	NI	1,12	IL	3,10	NI
Co06	0,4	NI	0,30	NI	1,69	NI
Co07	0	NI	2,45	IL	2,49	NI
Co08	0	NI	0,25	NI	1,03	NI
Co09	0	NI	0,65	NI	1,31	NI
Co10	0	NI	0,35	NI	3,17	NI
Co11	0,4	NI	0,25	NI	4,26	NI
Co12	0	NI	0,25	NI	3,36	NI
Co13	0	NI	0,18	NI	2,73	NI
Co14	0	NI	0,30	NI	1,50	NI
Co15	0	NI	0,17	NI	0,92	NI
Co16	0	NI	0,23	NI	3,65	NI
Co17	0,8	NI	2,23	IL	6,18	NI
Co18	0,4	NI	0,38	NI	4,70	NI
Co19	0	NI	0,27	NI	3,29	NI
Co20	0,4	NI	0,32	NI	1,09	NI
Sensibilidade				ND		ND
Especificidade				80%		100%
Precisão				80%		100%
Falso positivo				4		0
Falso negativo				ND		ND

Co = colírio; MEM = média do escore máximo; NI = não irritante; IL = irritante leve; ND: não determinado

animais sejam usados apenas para comprovar a ausência de irritação, reduzindo, assim, ao máximo o risco de expor ao sofrimento os animais em experimentação^{6,20,21}. Essa situação já se aplica no contexto da avaliação do potencial irritante ocular, uma vez que, para ingredientes com forte potencial irritante, os modelos BCOP e ICE estão disponíveis e com a devida aceitação regulatória²². Porém a avaliação de produtos acabados e com baixo potencial irritante é ainda um desafio.

O ensaio HET-CAM baseia-se na determinação de alterações macroscópicas que podem ocorrer na membrana cório-alantoide em decorrência da aplicação

de ingredientes com potencial irritante. Porém este método vem sendo criticado devido ao seu desfecho qualitativo e à subjetividade das leituras obtidas nas observações de hiperemia, hemorragia e coagulação/opacidade em função do tempo. Além disso, a subjetividade do desfecho do HET-CAM dificulta sua reprodutibilidade interlaboratorial, impactando negativamente em seu potencial de difusão/transferência para um grande número de laboratórios^{19,23}.

Foi neste contexto que o ensaio CAM-TBS foi desenvolvido e, hoje, agrega valor ao HET-CAM clássico, por meio da incorporação de uma leitura quantitativa, que

se dá pela medição do corante azul de trypan absorvido pelas células da membrana cório-alantoide exposta^{24,25}. O azul de trypan é um corante com ampla utilização laboratorial, nos processos em que se faz necessária a distinção entre células viáveis e células mortas. Esta determinação, além da vantagem de oferecer resultado quantitativo, é muito simples e reprodutível²⁴ e ainda demonstra boa correlação entre a quantidade de corante absorvida pela membrana e o MEM obtido *in vivo*, com coeficiente de correlação de 0,91 segundo os autores que a propuseram²⁶.

Em estudo realizado por Lagarto e colaboradores¹⁹, 21 amostras foram avaliadas no CAM-TBS, incluindo substâncias químicas e produtos cosméticos. Os autores encontraram um coeficiente de correlação mais robusto para substâncias químicas isoladas ($r = 0,925$; $p < 0,0001$) do que para produtos acabados ($r = 0,688$; $p < 0,05$), indicando que, para misturas complexas, os resultados dos modelos de membrana cório-alantoide de ovo embrionado de galinha devem ser avaliados com cautela. É também destes autores a proposta de ponto de corte para classificação do modelo CAM-TBS (*cut-off* = 7,0), conforme Tabela 4. Esta classificação agrega em uma única classe (NI) amostras “não irritantes” e “irritantes leves”, e parece ser a mais apropriada para comparação com o modelo *in vivo*. Tal constatação é reforçada pelos dados obtidos no presente estudo (Tabela 5). O ponto de corte adotado para o CAM-TBS (*cut-off* = 7,0) favoreceu a comparação entre *in vitro* e *in vivo*, conduzindo a uma precisão de 100% nas condições experimentais aqui propostas. Por outro lado, o ponto de corte preconizado pelo *Journal Officiel de la République Française*¹⁷ para o HET-CAM (*cut-off* = 0,9) levou a quatro resultados falso-positivos e a uma especificidade de apenas 80%. É importante apontar que a diferença encontrada em termos de precisão e especificidade entre HET-CAM e CAM-TBS deu-se única e exclusivamente devido à escolha dos pontos de corte, uma vez que, na sua totalidade, os colírios apresentaram valores menores no HET-CAM (faixa dos valores médios: 0,14-2,45) que no CAM-TBS (0,92-6,18). É digno de nota o fato de que, pelo menos no caso dos colírios aqui avaliados, tais resultados falso-positivos, teriam sido contornados caso o ponto de corte do HET-CAM englobasse “não irritantes” e “irritantes leves” (NI + IL = 4,9; Tabela 3), à semelhança da proposta de Lagarto et al.¹⁹. Por fim, vale ressaltar que, além da vantagem do desfecho quantitativo do ensaio CAM-TBS, o critério de classificação adotado no presente estudo parece ser o

mais apropriado, pelo menos para produtos com baixo potencial irritante.

CONCLUSÃO

Todos os colírios foram classificados como não irritantes no ensaio *in vivo*, e por isso não foi possível estabelecer a sensibilidade dos métodos *in vitro*. O CAM-TBS demonstrou melhor desempenho (especificidade e precisão de 100%) em relação ao HET-CAM (80%). A fim de reduzir o número de falso-positivos no HET-CAM, sugere-se a criação da categoria de baixo potencial irritante ocular, englobando as categorias “não irritantes” e “irritantes leves”, adotando o ponto de corte de 4,9. O CAM-TBS apresenta vantagens, como seu desfecho quantitativo e o critério de classificação adotado por Lagarto et al.¹⁹, que pelo menos para produtos com baixo potencial irritante parece ser o mais adequado.

AGRADECIMENTOS

Amanda Gleyce Lima de Oliveira é bolsista PIBIC (CNPq/Fiocruz), e Isabella Fernandes Delgado é bolsista de produtividade do CNPq. Este trabalho recebeu apoio financeiro do CNPq (MCT/CNPq 14/2008).

REFERÊNCIAS

1. Draize JH, Woodard G, Calvery HO. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *J Pharmacol Exp Ther*. 1944;82:377-90.
2. Draize JH. Appraisal of the safety chemicals in foods, drugs and cosmetics. In: *Drugs and cosmetics: dermal toxicity*. Austin: Association of Food and Drug Officials of the United States; 1959. p. 46-59.
3. Cruz AS. Teste de citotoxicidade *in vitro* como alternativa ao teste *in vivo* de Draize na avaliação de produtos cosméticos. [tese de doutorado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2003.
4. Mehling A, Kleber M, Hensen H. Comparative studies on the ocular and dermal irritation potential of surfactants. *Food Chem Toxicol*. 2007;45(5):747-58.
5. Worth AP, Ball M. Alternative (non-animal) methods for chemical testing: current status and future prospects. *ATLA*. 2002;30(1):13-9.
6. Abreu CLC, Presgrave OAF, Delgado IF. Metodologias alternativas à experimentação animal: aplicação no controle da qualidade de produtos sujeitos à ação da Vigilância Sanitária. *Rev CFMV*. 2008;45:20-7.
7. Presgrave OAF, Caldeira C, Gimenes I, Freitas JCBR, Nogueira STB, Oliveira NDE, Oliveira AGL, Silva RS, Alves EN, Presgrave RF. Métodos alternativos ao uso de animais: uma visão atual. *Ciênc Vet Trop*. 2010;13(1):106-17.
8. Reinhardt V. Taking better care of monkeys and apes. Washington: Animal Welfare Institute; 2008.

9. Eun HC, Suh DH. Comprehensive outlook of *in vitro* tests for assessing skin irritancy as alternatives to Draize tests. *J Dermatol Sci*. 2000;24(2):77-91.
10. Mitjans M, Infante MR, Vinardell MP. Human hemoglobin denaturation as an alternative to the Draize test for predicting eye irritancy of surfactants. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2008;52(2):89-93.
11. Steiling W, Bracher M, Courtellemont P, Silva O. The HET-CAM, a useful *in vitro* assay for assessing the eye irritation properties of cosmetic formulations and ingredients. *Toxicol In Vitro*. 1999;13:375-84.
12. Schell J, Kleber M, Kreutz J, Lehringer E, Mehling A, Reisinger K, et al. Eye irritation potential: usefulness of the HET-CAM under the globally harmonized system of classification and labeling of chemicals (GHS). *Regul Toxicol Pharmacol*. 2011;59(3):471-92.
13. Nobrega AM, Alves EM, Presgrave RF, Costa RN, Delgado IF. Determination of eye irritation potential of low-irritant products: comparison of *in vitro* results with the *in vivo* Draize rabbit test. *Braz Arch Biol Technol*. 2012;55(3):381-8.
14. Organization for Economic Co-operation and Development – OECD. Guideline for the testing of chemicals: bovine corneal opacity and permeability test method for identifying ocular corrosives and severe irritants. Guideline 437. Paris; 2009.
15. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS (BR). Ensaio de irritação ocular. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2011.
16. Kay JH, Calandra JC. Interpretation of eye irritation tests. *J Soc Cosm Chem*. 1962;13:281-9.
17. Journal Officiel de la République Française. Arrête du 27 décembre 1996 relatif aux méthodes d'analyse nécessaires au contrôle de la composition des produits cosmétiques. Annexe IV: méthode officiel d'évaluation du potentiel irritant par application sur la membrane chorioallantoïdienne de l'œuf de poule, p. 19137-8.
18. Itagaki H, Hagino S, Kato S, Shinobu K. Protocolo 108, CAM-TBS Test. INVITTOX. 1996.
19. Lagarto A, Vega R, Guerra I, González R. *In vitro* quantitative determination of ophthalmic irritancy by the chorioallantoic membrane test with trypan blue staining as alternative to eye irritation test. *Toxicol In Vitro*. 2006;20:699-702.
20. Costa RN, Abreu CLC, Presgrave RF, Alves EN, Presgrave OAF, Delgado IF. A reassessment of the *in vitro* total protein content determination (TPC) with SIRC and 3T3 cells for the evaluation of the ocular irritation potential of shampoos: comparison with the *in vivo* Draize rabbit test. *Braz Arch Biol Technol*. 2011;54(6):1135-45.
21. Donahue DA, Kaufman LE, Avalos J, Simion FA, Cerven DR. Survey of ocular irritation predictive capacity using chorioallantoic membrane vascular assay (CAMVA) and bovine corneal opacity and permeability (BCOP) test historical data for 319 personal care products over fourteen years. *Toxicol In Vitro*. 2011;25(02):563-72.
22. ESAC Statement. Scientifically validated methods: the bovine corneal opacity and permeability (BCOP) and the isolated chicken eye (ICE) test method for eye irritation. [acesso 2009 jan 26]. Disponível em: [http://ecvam.jrc.it].
23. Garcia L, Gleiby M, Montes de Oca N, Hildalgo L. Estudio de la irritación ocular y dérmica de *Pochonia chalamydisporia* var. *catenulata*. *Rev Toxicol*. 2004;21:103-7.
24. Hagino S, Itagaki H, Kato S, Kobayashi T, Tanaka M. Quantitative evaluation to predict the eye irritancy of chemicals: modification of chorioallantoic membrane test by using trypan blue. *Toxicol In Vitro*. 1991;5(4):301-4.
25. Alves EN, Pregrave RF, Presgrave OAF, Sabagh FP, Freitas JC, Corrado AP. A Reassessment of the *in vitro* RBC haemolysis assay with defibinated sheep blood for the determination of the ocular irritation potential of cosmetic products: comparison with the *in vivo* Draize rabbit test. *Atla*. 2008;36(3):275-84.
26. Hagino S, Itagaki H, Kato S, Kobayashi T. Further evaluation of the quantitative chorioallantoic membrane test by using trypan blue to predict the eye irritancy of chemicals. *Toxicol In Vitro*. 1993;7:35-9.