

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**Faculdade de Farmácia**

**Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia**

**Novas perspectivas na indústria cosmética com foco na redução do uso de animais  
e nos métodos alternativos**

**Sheila Janine da Silva**

**Porto Alegre, novembro de 2013**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**Faculdade de Farmácia**

**Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia**

**Novas perspectivas na indústria cosmética com foco na redução do uso de animais  
e nos métodos alternativos**

**Sheila Janine da Silva**

**João Victor Laureano**

**Co-orientador**

**Profa. Dra. Bibiana Verlindo de Araújo**

**Orientadora**

**Porto Alegre, novembro de 2013**

À meus pais, sem os quais nada disso teria sido possível.

*Podemos facilmente perdoar uma criança que tem medo do escuro; a real da tragédia da vida é quando os homens tem medo da luz.*

*Platão*

Este artigo foi elaborado segundo as normas da revista *Cosmetics & Toiletries Brasil*,  
apresentadas em anexo.

## **Novas perspectivas na indústria cosmética com foco na redução do uso de animais e nos métodos alternativos**

Sheila Janine da Silva, João Victor Laureano, Bibiana Verlindo de Araújo

Faculdade de Farmácia, UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul

Sheila Janine da Silva é aluna de graduação em Farmácia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

João Victor Laureano possui graduação em Farmácia pela Universidade Regional Integrada e é aluno de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Bibiana Verlindo de Araújo possui graduação em Farmácia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, mestrado e doutorado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da mesma Universidade. É professora do Departamento de Produção e Controle de Medicamentos da UFRGS e orientadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

**Resumo:** A preocupação com o bem estar dos animais e com sua redução em experimentações laboratoriais na indústria cosmética cresce exponencialmente. Esse estudo trata da situação em que estão inseridas diferentes nações, União Europeia, Estados Unidos da América e Brasil, quanto ao uso de métodos alternativos e parâmetros relevantes relacionados.

**Abstract:** The regarding with the animal welfare and the reduction of its use in laboratory experiments in the cosmetic industry increases exponentially. This review is about the situation in which are inserted different nations (European Union, United States of America and Brazil) on the use of alternative methods and relevant parameters related.

**Resumen:** La preocupación por el bienestar de los animales y la reducción de su uso en ensayos de laboratorio en la industria cosmética crece exponencialmente. Este estudio aborda la situación en el cual están las diferentes naciones, Unión Europea, Estados Unidos y Brasil, en el uso de métodos alternativos y los parâmetros pertinentes relacionados.

## Introdução

Em 1978, foi proclamada pela UNESCO a Declaração Universal dos Direitos dos Animais, a qual zela pelos bem estar e proteção do animal sob quaisquer circunstâncias. Dentre suas prescrições, a Declaração afirma que todo o animal tem direito a existência, ao respeito e que nenhum deverá ser submetido a maus tratos e atos cruéis, além de expor que a experimentação animal, que implica em sofrimento físico e psíquico, é incompatível com os direitos dos animais, sendo que técnicas substitutivas devem ser utilizadas e desenvolvidas.<sup>1</sup> Tal documento é base de apoio, há anos, para salvaguardar os direitos dos animais. Direitos que, hoje, são fatores preponderantes para que se inicie uma modificação sem precedentes no sistema de desenvolvimento de novos produtos na indústria cosmética: os métodos de ensaio *in vivo* estão começando a ser substituídos por modelos alternativos.

Em algumas localidades do mundo, os modelos que utilizam animais para testar produtos ou ingredientes cosméticos já foram totalmente proibidos e, caso não houver testes alternativos que comprovem a segurança toxicológica do produto, este não deverá ser colocado no mercado. Esse é o caso da União Europeia (UE), que comunicou oficialmente sua decisão em 11 de março de 2013.<sup>2</sup> Este foi um passo marcadamente inovador da UE e, como grande comunidade influente que é, a possibilidade que essa decisão conduza mudanças globais é grande. Ao redor do mundo, alguns países já estão recebendo, tão bem quanto colaborando com outras nações na pauta desenvolvimento de novos métodos alternativos para esse fim e, para tanto, já existem entidades internacionais que tem esse propósito e visam integrar países, o que pode ocasionar um crescimento generalizado na área científica para os participantes. Exemplos de países que já estão num caminho de cooperação global, juntamente com a UE, são os Estados Unidos da América (EUA) e o Brasil, ou seja, países em diferentes estágios de desenvolvimento econômico participam dos mesmos grupos colaborativos, o que evidencia a importância da pauta e o interesse mundial que ela instiga.

Sem dúvida um fator principal que influi com grande valia para que novos métodos de ensaio se tornem disponíveis é a garantia dos direitos dos animais e, concomitante, a proteção da saúde humana também deve ser considerada como ponto influente. Porém, existem outros parâmetros que devem ser levados em conta para que esse processo possa ser realizado eficaz e efetivamente. Um deles é que a economia dos países atua grandemente no processo e, apesar de os custos envolvidos com o bem estar dos animais serem altos, os gastos inerentes as pesquisas de novos métodos também

dispendem valor considerável em curto prazo, tendo sendo esse um fator de resistência a maiores inovações. Juntamente, obstáculos no desenvolvimento científico são também responsáveis pelo sistema não progredir tão rapidamente quanto temporalmente fosse possível. Desta forma, o objetivo deste estudo é apresentar um panorama atual sobre utilização e principais pontos dos métodos alternativos ao uso massivo de animais no desenvolvimento de produtos cosméticos, dando enfoque à situação presente na UE, EUA e Brasil, no que diz respeito aos quesitos histórico e perspectivas futuras.

## **Metodologia**

Este estudo constitui-se de uma revisão sobre o panorama histórico e atual das características, implantação e utilização de métodos toxicológicos alternativos ao uso massivo de animais na pesquisa e desenvolvimento de produtos cosméticos, focando na situação presente de três principais nações: União Europeia (UE), Estados Unidos da América (EUA) e Brasil, bem como apresenta perspectivas para o futuro nos dados territórios. Para tanto, utilizou-se documentos oficiais emitidos pela *European Commission*, *Food and Drug Administration* (FDA) e ANVISA, bem como realizou-se busca nos bancos de dados PubMed e ScienceDirect. A pesquisa não teve restrição de data e se deu até novembro de 2013.

## **Do passado até o presente: métodos alternativos ao uso massivo de animais**

A importância da busca por métodos alternativos

O surgimento de uma preocupação mais abrangente sobre a priorização em pesquisas por métodos alternativos é de caráter mundial. Diversos países se empenham em buscar novas fontes adequadas para métodos de testes cosméticos, o que permite observar a clara modificação nas práticas científicas. Alguns países estão a frente nesse processo, porém, outros que estão seguindo seus passos encontrarão um caminho mais sólido e estável. Nesse contexto, se existe a decisão comum em ampliar a utilização de métodos alternativos, pode-se imaginar que as razões para apoiar essa ação são variadas. Questões econômicas e éticas estão muito envolvidas nesse sistema. É de interesse por parte de líderes organizacionais que se consiga utilizar métodos com menos ou sem animais, visto que os custos implicados para manter o bem estar e assegurar os direitos dos animais são grandes.<sup>3</sup> Outro fator é que estados como o de fome, sede, dor

ou estado motivacional podem afetar a resposta do animal aos testes e, conseqüentemente, gerar resultados com muita variação.<sup>4</sup> De qualquer forma, deve-se levar em consideração a certeza que se tem a respeito de 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.<sup>5</sup> Um modelo que mimetize perfeitamente o organismo humano está muito longe de ser desenvolvido, porém, tem sua base já estabelecida com as atuais esforçadas pesquisas para que os principais parâmetros envolvidos nas situações dose-concentração e dose-resposta possam ser realizados *in vitro* e *in silico*.

Além de questões práticas, a ética envolvendo pesquisas tem sido fator preponderante para que qualquer atitude mais sóbria fosse tomada, pretendendo alcançar como objetivo maior a humanidade. Nessa conjuntura, deve-se pensar que métodos alternativos podem ser considerados não somente os que não utilizam animais em qualquer instância, mas aqueles que empregam esforços para utilizar o menor contingente de animais possível e que utilizem técnicas que produzam o menor ou nenhum sofrimento ao animal. Modelos que possam mimetizar os testes realizados atualmente e por muitos anos *in vivo* e que não utilizem animais envolvem parâmetros extremamente complexos e não estão disponíveis em sua totalidade hoje. Como será visto mais adiante, existem modelos alternativos (utilizando ou não animais em algum âmbito) já disponíveis hoje para algumas áreas de estudo, porém, parâmetros mais críticos chegam a ter previsão de até 2019 ou ainda não existe previsão para que possam estar disponíveis e para que sejam considerados suficientemente robustos, relevantes e úteis. Esse período não considera o tempo necessário para validação e aceitação regulatória.<sup>6</sup> Dessa maneira, o conceito de método alternativo exposto acima é uma opção de ensaio que implica em menor crueldade e, portanto, é algo viável. Para esta abordagem, se tem como base os parâmetros já defendidos por William Russel e Rex Burch, em 1959, no livro *Principles of Humane Experimental Technique*, os 3 R's.<sup>5</sup>

### Os 3 R's

A ideia de que os ensaios alternativos possam ser relativos a outras abordagens além do processo de substituição é abrangida pelos autores acima. O termo 3 R's diz respeito ao termo inglês *refinement*, *reduction* e *replacement*, ou seja, refinamento, redução e substituição, utilizando para esse fim pesquisas que, além de manter a

qualidade científica, minimizem a utilização de animais e o seu sofrimento.<sup>5</sup> Essa estratégia visa que, futuramente, possa ocorrer realmente a substituição total de testes com animais, que infelizmente atualmente não está disponível.

Nesse sentido, o termo refinamento faz alusão a procedimentos que possam minimizar o máximo possível a dor e o estresse em animais submetidos a experimentações, englobando os mais diversos processos, como uso de medicamentos, aparelhagens adequadas, procedimentos mais indolores. Essa premissa tem como objetivo conjunto que se evite o aumento da variabilidade na resposta dos animais em virtude de estes terem experiências desagradáveis a respeito de tais parâmetros. Para isso, deve-se contar com equipe profissional treinada e utilização de ensaios menos invasivos, de forma que seja assegurado bem estar integral ao animal.<sup>7</sup> Concomitante com a realização de anestésias e analgésias, a utilização da eutanásia em animais que terão que ser sacrificados deve ser parte integrante do processo, dado o tamanho das perturbações psíquicas, bioquímicas e citológicas que podem decorrer de uma morte aflitiva e penosa. A utilização de eutanásia, além de evitar que o animal sofra desnecessariamente, interfere positivamente na eficiência da avaliação do método, visto que, neste caso, não ocorrerão mudanças na resposta a um teste em função do estresse provocado por uma morte angustiante.<sup>5</sup>

Da mesma forma, o termo redução implica na utilização do menor número possível de animais em um dado experimento, de forma que se obtenham, ao final, as mesmas informações já obtidas outrora com maior número de animais; ou na maximização do número de informações obtidas por animal. Isso pode ser alcançado através de pesquisas que façam uso de vários órgãos de um mesmo organismo ou de estudos piloto que darão previsão mais adequada do número necessário de animais para o ensaio, caso o teste prove realmente ser apropriado.<sup>5</sup> Em associação com esses métodos, deve-se utilizar informações de bancos de dados, se disponíveis, bem como métodos estatísticos e ensaios *in vitro* ou *in silico* que possam prestar auxílio às experimentações animais.

Finalmente, quanto à substituição, desejada grandemente por razões humanitárias, métodos que podem ser considerados substitutos relativos são aqueles que buscam reduzir o número de animais necessários em um experimento. Assim, a obtenção de células, tecidos e órgãos de um animal para que possam ser realizados estudos *in vitro*, bem como a utilização de ensaios com micro-organismos, pode ser considerada uma substituição relativa.<sup>5</sup> Mais além, métodos que substituam absolutamente a participação

de animais são almejados, porém não disponíveis ainda, visto que este será um processo gradual e não teria como ser diferente.

Essas ideias só tendem a ter sua expansão e utilização aumentadas, a cada passo que a ciência puder dar em direção ao progresso, sendo utilizadas mundialmente. Além das evidentes questões humanas, a utilização dos 3 R's gerará grande redução de custos, principalmente depois de estabelecidos os métodos adequados e úteis para cada experimentação.

### Situação na União Europeia

A preocupação com a utilização de animais em métodos de ensaio para cosméticos data de décadas até o presente momento. Em 1993 a UE, pioneira na pesquisa por novos métodos alternativos, proibiu a comercialização de produtos cosméticos que fossem testados em animais com prazo de aplicação para 1998. Posteriormente, este prazo foi adiado para o ano de 2000, em função de não haver, até dado momento, testes alternativos disponíveis. Porém, apenas no ano de 2004 a União novamente interviu nesse assunto regulatório, proibindo a realização de ensaios de produtos cosméticos acabados nos territórios abrangidos pelos estados-membros. Seguindo na mesma linha, desde 2009 é proibida a comercialização de produtos cosméticos e seus componentes que tenham sido testados em animais (sendo, também nesse ano, a *Cosmetics Directive, 76/768/EEC (European Economic Community)*, substituída pela *EU Regulation 1223/2009*, que veio a reforçar a necessidade da avaliação de segurança e obtenção de dados toxicológicos de produtos cosméticos).<sup>8</sup> Essa decisão foi aplicada a todos os parâmetros que tinham relação com a saúde humana, com exceção dos mais complexos, que eram toxicidade dose repetida, sensibilização cutânea, carcinogenicidade, toxicidade reprodutiva e toxicocinética, os quais teriam prazo estendido até o ano de 2013. Além, essa atitude teve como base uma consulta pública realizada pela Comissão Europeia ao público em 2010.<sup>9</sup> Desta forma, nessa citada década de progressiva eliminação de ensaios em animais na indústria de cosméticos, não havia pretensão, por parte do Parlamento Europeu, de substituir totalmente tais ensaios, visto que já se tinha conhecimento que isso não seria possível até o prazo limite. O maior objetivo (que era político) realmente era por fim aos ensaios em animais sem se basear em nenhuma previsão científica de que outras alternativas estariam disponíveis posteriormente.<sup>6</sup>

Em 11 de março de 2013 a Comissão Europeia comunicou oficialmente que a proibição total em realizar testes de cosméticos em animais nos estados-membros entrava em vigor e, sendo assim, novos produtos cosméticos, se testados em animais, não poderiam mais ser comercializados nos seus territórios abrangidos.<sup>2</sup> Nesse momento, a Comissão Europeia se comprometia a continuar oferecendo apoio ao desenvolvimento de métodos alternativos e, indubitavelmente, se tornava exemplo de inovação no ramo dos cosméticos mundialmente. Nesse contexto, a regra básica que prevalecia era prezar pelo bem estar dos animais, como consta no artigo 13º do *The Treaty on the Functioning of the European Union* (TFEU).<sup>10</sup>

Com essa nova política sendo iniciada, por exigência da Diretiva 86/609/EE,<sup>11</sup> que dispunha sobre a proteção dos animais utilizados em experimentações e objetivava estimular o desenvolvimento e validação de métodos alternativos, entrava em vigor a pré-validação segundo os critérios do *European Centre for the Validation of Alternative Methods* (ECVAM), que veio a auxiliar o processo regulatório para novos testes. O ECVAM, fundado em 1991, foi instaurado pela Comissão Europeia para promover aceitação científica e regulamentar testes não animais, ou seja, apoiar e validar a aceitação de métodos alternativos ao uso massivo de animais em ensaios de produtos biológicos, químicos, agrotóxicos e farmacêuticos. Desde seu ano de criação, o ECVAM foi organizado pelo *Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection* (IHCP) e, posteriormente ao ano de 2011, passou a ter suas tarefas atribuídas ao *European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing* (EURL ECVAM). Tal laboratório foi criado devido a crescente necessidade de se desenvolver e propor métodos para a validação na UE, ou seja, tem seus esforços baseados na validação científica de testes alternativos à utilização de animais em experimentos e no desenvolvimento de novos métodos e suas aplicações industriais, bem como auxilia a promoção da aceitação de tais alternativas pelos responsáveis reguladores.<sup>12</sup>

De caráter mundial e, conseqüentemente vigorando também nos territórios da Comunidade Europeia, existe a *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD). A OECD é uma organização que promove variadas políticas em pró da economia e da integração social em escala mundial e, sendo assim, formula diretrizes de ensaios para avaliação de segurança de produtos químicos reconhecidos internacionalmente. É muito utilizada em processos de segurança regulamentar, notificação e registro de substâncias.<sup>13</sup> Além, juntamente com o Regulamento REACH, por exemplo, participa de registros de produtos químicos e recomenda a utilização de

certos métodos alternativos válidos.<sup>14</sup> O programa REACH (siglas fazem referência a *Registration, Evaluation, Authorisation e restriction of Chemical substances*) é um regulamento da Comissão Europeia e objetiva aumentar a proteção da saúde humana e do meio ambiente através de uma identificação melhor e em menor tempo das propriedades intrínsecas de substâncias químicas, bem como promove a inovação e competitividade na indústria química da UE.<sup>15</sup> O regulamento REACH coloca maior responsabilidade sobre a indústria para gerenciar os riscos de produtos químicos e fornecer informações de segurança sobre estes<sup>16</sup> e, por isso mesmo, auxilia a União a conduzir todas as etapas de elaboração de um novo método de ensaio.

Desta maneira, a UE está a frente, em comparação com outras nações do mundo, no que diz respeito a inovação na área cosmética, em função de sua radical decisão. Também, possui diversas pesquisas sendo feitas no ramo, o qual deverá se fortalecer ainda mais depois de 2013, visto que vários parâmetros ainda não possuem adequações *in vitro*, por exemplo. Mesmo assim, existem países fora da UE que também estão empregando esforços para adequar seus métodos de ensaio para modelos que não utilizem massivamente animais, apesar de não restringirem seu uso.

#### Situação em outra grande potência: os Estados Unidos

Os EUA, grande potência mundial que exerce forte influência em diversos países, também tem se empenhado em acelerar a pesquisa e validação de métodos alternativos, buscando progresso. No ano de 1997 os EUA criaram o *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods* (ICCVAM), com o objetivo de reduzir o uso de animais em métodos de ensaio, e a *Nacional Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation Of Alternative Toxicological Methods* (NICEATM), para prestar apoio às atividades da ICCVAM. No ano de 2000, a ICCVAM deixou de ser apenas uma medida administrativa para ser incorporada à legislação vigente, sendo direcionada a exercer funções específicas como coordenar revisões técnicas de métodos alternativos e submeter suas recomendações a órgãos federais competentes.<sup>14</sup>

Os EUA tem como órgão regulatório federal o *Food and Drug Administration* (FDA). O FDA é que proíbe a utilização de substâncias não seguras nesse país, porém não possui uma lista formal de métodos para avaliação toxicológica de cosméticos, visto que apenas o preâmbulo da seção 740.10 do *Code of Federal Regulations* (título 21, capítulo I) fala que cosméticos e ingredientes cosméticos devem ter comprovação de segurança,

sem fornecer dados sobre os métodos de ensaios específicos necessários.<sup>17</sup> Na realidade, o FDA apenas informa que a segurança de um produto pode ser oferecida a partir de dados de testes toxicológicos já disponíveis sobre os ingredientes individuais ou a partir de dados de formulações de produtos similares em sua composição, bem como afirma que pode ser realizado qualquer teste toxicológico adicional, ou outros testes, caso necessário for. Ou seja, não há, no país, regulação mais rígida sobre a segurança de produtos cosméticos ou sobre os métodos de ensaio que deveriam ser realizados. O FDA atua no ICCVAM hierarquicamente e colabora com o NICEATM.<sup>14</sup>

Atualmente, o FDA apoia e adere as disposições de leis, regulamentos e políticas que regem a experimentação animal, como a *Animal Welfare Act*, de 1966,<sup>18</sup> lei que é padrão mínimo aceitável para tratamento de animais em pesquisa nos EUA. Apesar de não ter banido o testes de cosméticos com animais, o FDA defende que as pesquisas *in vivo* devem obter o máximo de informações úteis a partir do uso mínimo de animais, sempre empregando os métodos mais humanos quanto possível for, dentro dos limites do avanço científico. Ou seja, devem ser muito bem observados todos os testes alternativos que não utilizem animais antes de pensar em utilizar testes *in vivo*.<sup>19</sup>

Além, existem, nos EUA, inúmeras organizações e associações nacionais e regionais, que objetivam o desenvolvimento, utilização ou promoção de métodos de ensaio alternativos à experimentação animal para testes de toxicidade.<sup>20</sup> A título de exemplo, o *Institute for In Vitro Sciences* (IIVS) realiza ensaios *in vitro*, sem fins lucrativos, em áreas como irritação ocular cutânea, fototoxicidade, corrosão dérmica e estudos de toxicidade sistêmica aguda, seguindo normas como as do FDA, OECD e outras diretrizes.<sup>21</sup> Outras organizações profissionais, industriais, acadêmicas e não governamentais dos EUA estão empenhadas nessas pesquisas.<sup>20</sup> Desta forma, apesar de não restringir a utilização de animais em métodos de ensaio para produtos cosméticos, o FDA orienta para que se reduza seu uso, além de haver, no país, diversas pesquisas para obtenção de modelos alternativos que estão em andamento, bem como órgãos responsáveis pelas etapas de validação dos métodos, mostrando claro progresso científico.

## Cooperações Internacionais

Em âmbito mundial, pode-se citar que houve a criação do *International Cooperation on Cosmetics Regulation* (ICCR), que é um grupo internacional formado por

autoridades regulatórias da UE (*European Commission DG Enterprise and Industry*), Canadá (*Health Canada*), Japão (*Ministry of Health, Labour, and Welfare*) e EUA (FDA), e tem o objetivo de assegurar confiabilidade ao consumidor global quanto ao uso de cosméticos, bem como minimizar as barreiras comerciais, podendo dialogar com as associações comerciais da indústria cosmética. Dessa forma, é dever de cada associação representar a maioria das posições adotadas por determinado setor industrial de sua jurisdição. Desta maneira, a ICCR, comprometida a colaborar na questão referente a validação de métodos alternativos criou, no ano de 2008, a *Internacional Cooperation on Alternative Test Methods* (ICATM), com o objetivo de melhorar procedimentos e os prazos na aceitação de métodos alternativos, bem como estabelecer posições comuns e evitar múltiplos esforços duplicados. Esse grupo é formado por Estados Unidos (ICCVAM), UE (ECVAM), Japão (JaCVAM), Canada (*Health Canada*) e, posteriormente integrada, Coréia do Sul (KoCVAM). Assim, a preocupação com a pesquisa de métodos alternativos se expande além das barreiras da UE, bem como a disposição de vários países em apostar esta prática é evidenciada.<sup>14</sup>

Ainda, em 2013, no sétimo encontro realizado pelas autoridades regulatórias da ICCR, representantes da China (AQSIQ) e do Brasil (ANVISA) participaram como observadores, expondo dados de seu sistema regulatório nacional.<sup>22</sup> Dado esse fato, percebe-se a forte influencia exercida pelo ICCR em países em desenvolvimento, como o Brasil. Nessa situação reside grande importância, visto que a tomada de decisão da UE é tendência mundial, ou seja, no dado momento, o Brasil começa a empregar mais esforços na pesquisa e validação de métodos alternativos, dando um passo em direção as práticas futuras. Esse fato passa a ter ainda maior relevância quando se leva em conta a grande influencia que o Brasil exerce sobre os países da América Latina. Há grande propensão de crescimento do consumo provindo da indústria de cosméticos nessa parte do mundo nos próximos anos,<sup>23</sup> o que ressalta a importância do uso de métodos de ensaio mais humanos para o progresso social, científico e econômico.

#### Outros países: Situação no Brasil

Os estudos de métodos alternativos iniciariam no Brasil no fim da década de 1980, porém, a ideia da criação do *Brazilian Center for the Validation of Alternative Methods* (BraCVAM) data de 2008. Nesse contexto, em 2011 foi criado o BraCVAM, bem como a Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA), que ficou sendo a responsável pela

execução de tal projeto. O Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA) ficara como responsável pela aprovação das medidas resultantes. O BraCVAM surgiu a partir de uma necessidade nacional de melhorar as pesquisas e validar métodos alternativos a utilização de animais, e possibilitou que o Brasil pudesse vir a ter mais oportunidades de se relacionar com organizações similares a essa em todo o mundo. Esse é um fator importante que levará o Brasil a ser cada vez mais requisitado em encontros internacionais sobre métodos alternativos. Além, no ano de 2012 também ocorreu a criação da *Brazilian Society of Alternative Methods* (SBMAIt), outra organização com o fim de realizar progresso na área de métodos alternativos.<sup>24,25</sup> Em adição, o Brasil já possui serviço de cosmetovigilância regulamentado desde 2005 e foi considerado há pouco tempo o terceiro maior consumidor de produtos cosméticos do mundo.<sup>26</sup> Isso evidencia mais uma vez uma vantagem para que o país que, com tamanha demanda interna, deve impulsionar pesquisas de métodos alternativos.

Ainda, a decisão do Brasil de aumentar seu envolvimento em pesquisas para ensaios alternativos a utilização de animais vem de encontro com legislações nacionais já vigentes que dizem respeito à proteção de animais. A Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998,<sup>27</sup> dispunha sobre sanções penais e administrativas para condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, incluindo os crimes contra a fauna. Porém, a primeira lei exclusiva de proteção aos animais no Brasil, lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008,<sup>28</sup> também conhecida como Lei Arouca, é que estabelece procedimentos científicos para o uso de animais e cria o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Além dessa disposição, o Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009,<sup>29</sup> vem a completar a regulamentação anterior, dispondo sobre a composição do CONCEA e estabelecendo normas para seu funcionamento e de sua Secretaria Executiva, bem como criando o Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais (CIUCA).<sup>30</sup>

Dessa forma, com a criação de órgãos empenhados na pesquisa e/ou validação de métodos alternativos, como o BraCVAM e a SBMAIt, bem como a existência de legislações que dispõem sobre o uso cauteloso de animais em pesquisas, o Brasil já mostra grande disposição a seguir os passos da UE ou mesmo de países membros da ICCR (da qual tem se aproximado) que estão a frente tecnologicamente nos estudos que envolvem experimentações alternativas, como métodos *in vitro*, *in silico* e modelos integrados de *Threshold of Toxicological Concern* (TTC).

## Processos envolvidos para que se possa utilizar um novo método alternativo na UE

No contexto da proibição de comercialização e fabricação de produtos cosméticos e seus ingredientes que tenham sido testados em animais, muitos parâmetros foram levados em consideração na UE. Dentro desta, o processo de disponibilização, validação e aceitação regulamentar dos métodos pode variar conforme o país, apesar de que, quando um método estiver descrito nas diretrizes da OECD é muito provável que ele tenha maior aceitação em todos os territórios.<sup>14</sup> Em função dos variados graus de complexidade inerentes aos ensaios para produtos cosméticos que garantam a segurança do consumidor, foram estipulados diferentes prazos para cada parâmetro necessário. Ao fim desse prazo, novos métodos alternativos deveriam estar disponíveis, caso contrário, o produto cosmético simplesmente não poderia ser comercializado.<sup>6</sup> Essa decisão de proibição não considerou, em nenhum momento, que seria possível ser realizada a substituição dos métodos *in vivo* até o ano de 2013, porém, isso faz parte de um plano para acelerar as pesquisas no ramo, visto que a UE tem um histórico de prorrogar prazos para acabar com a experimentação animal. Caso isso tivesse ocorrido novamente, além de possivelmente desestimular o empenho dos órgãos e das indústrias nas pesquisas iniciadas, provavelmente não haveria tanta busca por inovação nos anos seguintes, desacelerando o processo.<sup>3</sup>

Para comprovar que um produto cosmético oferece segurança ao consumidor e que ele pode ser disponibilizado no mercado, alguns processos devem ser considerados: após validação formal pelo ECVAM, e um parecer de órgãos competentes como o *Scientific Committee on Consumer Safety* (SCCS), o método é submetido aos Estados Membros da UE e ao Secretariado da OECD local, tendo a possibilidade, então, de ser adotado em nível de UE,<sup>14</sup> sendo descrito no anexo VIII da *EU Regulation 1223/2009*.<sup>31</sup> Entretanto, os métodos alternativos que estão sendo utilizados não são cosmético-específicos, ou seja, são aplicáveis a categorias de produtos químicos, e assim também oficialmente descritos.<sup>14</sup> Pode-se observar que as indústrias são, possivelmente, a parte mais afetada com as novas diretrizes entrando em vigor, visto que podem perder no quesito competitividade e, conseqüentemente, diminuir seus lucros internos. Acredita-se que, com a diminuição da lucratividade, o incentivo para pesquisas alternativas aos métodos *in vivo* ficaria igualmente reduzido, bem como haveria menos ferramentas para que as empresas pudessem cumprir o regulamento da UE. Levando-se em conta também o fato de que o consumidor ficará mais limitado nas suas opções de escolha, a Comissão Europeia assume o papel de monitorar a situação.<sup>2</sup>

Os parâmetros que já se enquadravam na proibição de comercialização de 2009 eram corrosividade cutânea, irritação cutânea, absorção dérmica, fototoxicidade, mutagenicidade/genotoxicidade, toxicidade aguda e irritação ocular. Mesmo estando nessa conjuntura, parâmetros como mutagenicidade/genotoxicidade, toxicidade aguda e irritação ocular apresentavam maior dificuldade para substituição em função de dificuldades e limitações inerentes a sua mimetização. Para pontos ainda mais complexos, como a toxicidade dose repetida, sensibilização cutânea, carcinogenicidade, toxicidade reprodutiva e toxicocinética, o prazo foi estendido até 2013.<sup>3</sup> Para os testes de toxicidade sistêmica, deve ser considerado que apenas produtos de absorção via oral, via inalatória ou dérmica/percutânea, onde o produto ou seus ingredientes penetrem significativamente no corpo e a exposição interna atinja níveis críticos, tem obrigatoriedade de passarem por ensaios de carcinogenicidade, toxicidade reprodutiva e toxicocinética.<sup>32</sup> A partir disso, os métodos de ensaio que estão sendo propostos se baseiam principalmente em métodos *in vitro*, *in silico* e em outros modelos como o TTC, numa grande abordagem integrada. É bom frisar que no contexto de avaliação de segurança de produtos cosméticos utilizando modelos alternativos, a única proposta viável até o momento é que vários testes, em conjunto, possam mimetizar um ensaio *in vivo* específico, dada a complexidade dos parâmetros. Aqui entra o termo “caixa de ferramentas”, utilizado para designar as várias estratégias de ensaio que devem estar envolvidas para imitar testes *in vivo* de parâmetros mais complexos.<sup>14</sup> Vários Grupos de Trabalho (GT) da UE, nomeados por órgãos como ICCS, estados membros da UE, indústrias e organizações não governamentais,<sup>6</sup> que tinham a função de avaliar as áreas toxicológicas envolvidas no desenvolvimento de métodos alternativos, mencionam esse termo em seus relatórios,<sup>33</sup> ressaltando a importância dessa abordagem.

### Métodos *in vitro*

Os métodos *in vitro* surgiram no início da década de 80, principalmente no âmbito cosmético, para substituir animais de laboratório e gerar resultados úteis a respeito da farmacologia e, posteriormente, avaliação de efeitos toxicológicos de substâncias. Revelaram, ainda, serem úteis em sistemas biológicos simples, como estudos utilizando microrganismos,<sup>7</sup> o que amplia consideravelmente as áreas de pesquisa. Dessa maneira, os métodos *in vitro* (experiências *in house* ou formalmente validados) servem como parte de uma ampla abordagem de parâmetros toxicológicos para avaliação de segurança de produtos cosméticos, juntamente com outros fatores.<sup>14</sup>

Com a proibição de comercialização de cosméticos que sejam ou tenham seus ingredientes testados em animais na UE, os métodos *in vitro* ficaram em grande evidência e as indústrias e demais centros de pesquisa buscam cada vez mais desenvolver estes modelos. A Tabela 1 mostra claramente o progresso destes testes, da fase de desenvolvimento até sua aceitação, muito mais que quaisquer outros modelos, o que ressalta sua importância no momento atual, tanto na UE, quanto em âmbito mundial.

## Métodos matemáticos

Esses métodos, genericamente denominados “métodos *in silico*”, produzem um modelo que auxilia na extrapolação de dados obtidos experimentalmente na predição computacional de respostas. Esse caso se aplica quando, por exemplo, se avalia a toxicidade de um ingrediente cosmético, baseando-se em suas propriedades físico-químicas, como solubilidade e estrutura química, gerando modelos como o SAR (*structure-activity relationship*) e QSAR (*quantitative structure activity relationship*).<sup>12</sup>

Desta forma, os métodos matemáticos auxiliam na pré-seleção de matérias-primas identificando a segurança da substância, entretanto, deve-se ter cuidado ao utilizar esse modelo, pois ele está baseado em um também método preditivo (modelos *in vitro* e *in vivo*).<sup>12</sup> Tem sido foco da indústria farmacêutica desenvolver modelos *in silico* que possam prever propriedades de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade. Dentre eles está a criação de um importante modelo de ligação a proteína plasmática (*plasma protein binding*, PPB), por exemplo, levando-se em conta que a PPB afeta a distribuição e, conseqüentemente, a biodisponibilidade de uma substância no organismo.<sup>34</sup>

Assim sendo, tais modelos ainda não estão em evidência, pois, em grande parte, estão em fase de desenvolvimento,<sup>12</sup> como mostra a Tabela 1.

## TTC

Os níveis críticos de exposição interna que uma substância pode atingir dizem respeito ao limiar de risco toxicológico (TTC). O conceito de TTC é relativo a um valor limite de exposição abaixo do qual há uma probabilidade muito baixa de que haja algum risco significativo à saúde humana, utilizando-se, para isso, informações sobre a estrutura

química de determinado composto e a estrutura de substâncias quimicamente relacionadas. O TTC é utilizado comumente para obter informações sobre substâncias químicas que ainda não possuem dados toxicológicos relevantes, o que pode ser útil na avaliação de segurança de produtos cosméticos, ao menos como estratégia integrada.<sup>6</sup>

Assim, o TTC se baseia em uma análise estatística dos dados toxicológicos de várias substâncias químicas diferentes e estruturalmente relacionadas, e em uma extrapolação de dados obtidos a partir de experimentações animais utilizando uma dose que seria incapaz de produzir efeitos significantes à saúde humana.<sup>35</sup> Entretanto, como a aplicação do TTC necessita de um amplo e abrangente banco de dados, sua utilização pode se tornar limitada em alguns casos por ausência de informações adequadas, como é o caso de substâncias de absorção cutânea, visto que os resultados nos quais os dados dos bancos se baseiam são, principalmente, de toxicidade após ingestão oral.<sup>6</sup> Para substâncias que utilizem via oral o empecilho maior que pode ser enfrentado é ter dados suficientes para realização do método.

### **Parâmetros que necessitam ser analisados e os métodos alternativos que deverão ser utilizados na UE**

Na consulta ao público realizada em 2010 pela Comissão Europeia, quando todos os cidadãos e organizações poderiam contribuir com sua opinião, foram abordados 5 parâmetros principais e fundamentais para que a segurança do consumidor pudesse ser garantida, utilizando-se métodos alternativos ao uso massivo de animais. Eles são a toxicocinética, a sensibilização cutânea, a toxicidade dose repetida, a carcinogenicidade e a toxicidade reprodutiva.<sup>3</sup>

#### **Toxicocinética**

A toxicocinética integra os processos de absorção, distribuição, metabolização e excreção (ADME) de determinada substância ou seus metabólitos no organismo. Os dados obtidos através desses parâmetros devem ser utilizados para avaliar segurança clínica e entender achados clínicos toxicológicos.<sup>36</sup> Assim, prioritariamente, esses parâmetros dizem respeito aos vários processos *in vivo* que levam uma substância a ter comportamento tóxico ao longo do tempo. Igualmente, a toxicocinética auxilia a prever o alcance de uma dose interna (células, tecidos e órgãos) relativa a uma dose de exposição

externa. Isso permite o entendimento mais claro das diferenças de sensibilidade interespecies ou das variações existentes na resposta de uma mesma espécie a um mesmo composto.<sup>37</sup> No desenvolvimento de um método alternativo, é essencial que a toxicocinética seja integrada aos ensaios, pois esse estudo é a base para que se possam transpor os dados obtidos *in vitro*, por exemplo, para situações reais, *in vivo*. Além disso, a utilização da toxicocinética para prever doses internas relativas a doses de exposição externas tem importância fundamental para que se tenha conhecimento a respeito das doses que devem ser utilizadas em testes *in vitro* (informações dose-resposta).<sup>6</sup>

Métodos alternativos para a toxicocinética estão em fase de desenvolvimento, mas para alguns parâmetros específicos ainda não se tem métodos disponíveis, como ensaios que prevejam a excreção renal e biliar e a absorção pulmonar. Para tais pontos, estima-se que em 2015-2017 métodos mais específicos possam estar disponíveis. Nesse cenário, para testes de exposição a produtos cosméticos de longo prazo, é grande a incerteza a respeito do nível de exposição das células em modelos *in vitro* e, por isso, se faz necessário o desenvolvimento de métodos analíticos específicos e sensíveis que abordem a toxicocinética, o que se tornará base para a continuidade dos testes. Existem vários modelos *in vitro* e *in silico* que englobam esse parâmetro, porém, em grande parte, não estão validados.<sup>6</sup>

As Tabelas 1 e 2 auxiliam a ilustrar um quadro de todas as fases de regulamentação dos métodos alternativos atualmente, ou seja, apesar de não serem apresentados todos os métodos em fase de concepção até hoje, os dados da tabela representam um panorama presente. Nesse panorama, modelos de toxicocinética ainda estão em fases precedentes à aceitação. A exceção para esse quadro é o modelo de absorção dérmica *in vitro*, para o qual existem diretrizes da OECD.<sup>38</sup>

## Toxicidade tópica

A toxicidade tópica inclui os seguintes parâmetros: irritação ocular, fototoxicidade, corrosão, irritação e sensibilização cutânea. Nesses casos, pode-se dizer que o andamento da concepção de métodos alternativos disponíveis está mais avançado, ou seja, já existem vários testes em fase de aceitação, como se observa na Tabela 2.

Tabela 1. Situação de alguns métodos alternativos em fases antecedentes à aceitação regulatória em 2013, ano da proibição total da realização de testes em animais para produtos cosméticos na UE.

Área de toxicidade	Método de Ensaio	Área de Aplicação/ utilização	Situação em 2010 (ano da consulta pública realizada pela Comissão Europeia)	Situação até 2013 (ano que a Comissão Europeia proibiu totalmente a UE de realizar testes de cosméticos em animais) e perspectivas futuras
Toxicocinética (indução do metabolismo) <sup>39</sup>	Ensaio de indução do citocromo P450 (CYP) utilizando a linha celular humana HepaRG® criopreservada e hepatócitos humanos criopreservados <sup>39</sup>	Principalmente produtos farmacêuticos; em princípio nenhum produto químico/ Modelagem metabólica humana <sup>39</sup>	Passava pelo processo de validação pelo ECVAM <sup>39</sup>	Análise pelo ECVAM <i>Scientific Advisory Committee</i> (ESAC**) deve ser feita; o ECVAM deve validar o método e fornecer o “ECVAM <i>recommendations</i> ”. O método ainda deve ter aceitação regulatória
Sensibilização cutânea <sup>40</sup>	Método de ensaio <i>KeratinoSens</i> <sup>40</sup>	Principalmente para produtos químicos/ Identificar sensibilizadores <sup>41</sup>	O tempo estimado para início da pré-validação era 2010-2012 <sup>41</sup>	Análise inter pares foi concluída pelo ESAC em 2013 <sup>40</sup>  O ECVAM deve validar o método
	Ensaio de reatividade direta de peptídeos (mais de 6 métodos) (DPRA) <sup>40</sup>	Principalmente para produtos químicos/ Identificação de perigo <sup>41</sup>	O tempo estimado para início da pré-validação era 2009-2014 <sup>41</sup>	Análise inter pares foi concluída pelo ESAC em 2013 <sup>40</sup> O ECVAM apresentou o projeto de recomendação ao público (até 09/13) <sup>42</sup>  O ECVAM deve fornecer oficialmente o “ECVAM <i>recommendations</i> ” O método ainda deve ter aceitação regulatória

	Ensaio de ativação de uma linha celular humana (h-CLAT) <sup>40</sup>	Principalmente produtos químicos/ Identificação de perigo <sup>41</sup>	O método estava sendo pré-validado pelo ECVAM <sup>41</sup>	Análise interpares pelo ESAC deve começar em 2013 <sup>40</sup>  O ECVAM deve validar o método O método ainda deve ter aceitação regulatória
Toxicidade dose repetida (imunotoxicidade)* **43	Ensaio de liberação de citocinas no sangue humano <sup>43</sup>	Produtos químicos/ Identificação de perigo <sup>43</sup>	Estava pré-validado <sup>43</sup>	O ECVAM deve validar o método O método ainda deve ter aceitação regulatória
Toxicidade dose repetida (cardiotoxicidade)* **43	Linhas celulares <sup>43</sup>	Produtos químicos e farmacêuticos/ Triagem e identificação de perigo <sup>43</sup>	Passava por ensaios hERG (utilizados no desenvolvimento de produtos farmacêuticos) Estava pronto para pré-validação <sup>43</sup>	O ECVAM deve validar o método O método ainda deve ter aceitação regulatória
Toxicidade dose repetida (ensaios <i>in silico</i> )* ***43	TOPKAT <sup>43</sup>	Produtos químicos/ Método de triagem <sup>43</sup>	Havia passado por fase de otimização Estava pronto para pré-validação <sup>43</sup>	O ECVAM deve validar o método O método ainda deve ter aceitação regulatória
Genotoxicidade e carcinogenicidade não genotóxica <sup>44</sup>	Ensaio de transformação celular <i>in vitro</i> (CTA) em células de embrião de hamster sírio (SHE) <sup>40</sup>	Produtos químicos/ Método de triagem, identificação de perigo, estudo sobre os mecanismos de ação <sup>44</sup>	Pré-validação havia sido completada <sup>44</sup>	O “ECVAM <i>recommendations</i> ” foi disponibilizado em 2011 <sup>45</sup>  O método deve ter aceitação regulatória

	Ensaio de transformação celular <i>in vitro</i> (CTA) em células de murganho BALB/C <sup>40</sup>	Produtos químicos/ Método de triagem, identificação de perigo, estudo sobre os mecanismos de ação <sup>44</sup>	Pré-validação havia sido completada <sup>44</sup>	O ECVAM apresentou ao público o projeto de recomendação em 2011 <sup>45</sup> O “ECVAM <i>recommendations</i> ” foi disponibilizado em 2012 <sup>42</sup>  O método deve ter aceitação regulatória
	Ensaio de transformação celular <i>in vitro</i> (CTA) em células BHAS <sup>40</sup>	Produtos químicos/ Método de triagem, identificação de perigo, estudo sobre os mecanismos de ação <sup>44</sup>	Pré-validação estava em andamento <sup>44</sup>	Análise foi concluída pelo ESAC <sup>46</sup> ECVAM validou o método e apresentou o projeto de recomendação ao público (até 09/13) <sup>42</sup>  O ECVAM deve fornecer o “ECVAM <i>recommendations</i> ” O método deve ter aceitação regulatória
Toxicidade reprodutiva*** <sup>45</sup>	Interação com o receptor de hidrocarboneto aromático <sup>47</sup>	Produtos químicos/ Estudo sobre os mecanismos de ação <sup>47</sup>	Estava na fase de otimização Estimado de levar mais de 5 anos para entrar na pré-validação <sup>47</sup>	O ECVAM deve validar o método O método deve ter aceitação regulatória
Toxicidade aguda por via oral <sup>40</sup>	Método de ensaio de absorção do vermelho neutro (NRU) em células 3T3 <sup>40</sup>	Produtos Químicos/ Avaliação da fototoxicidade Avaliação da citotoxicidade <sup>48</sup>	Estava na fase de validação	O ECVAM publicou o “ECVAM <i>recommendations</i> ” em 2013 <sup>42</sup>  O método deve ter aceitação regulatória
Desregulação do sistema endócrino <sup>40</sup>	Ensaio de transativação de receptores de estrogênios MELN® (protocolos agonista e antagonista) <sup>40</sup>	Produtos químicos/ Avaliação do potencial de interação com receptores hormonais <sup>49</sup>	Estava na fase de otimização <sup>6</sup>	Análise interpares pelo ESAC deve começar em 2013 <sup>40</sup>  O ECVAM deve fornecer o “ECVAM <i>recommendations</i> ” O método ainda deve ter aceitação regulatória

	Ensaio de transativação de receptores de androgênios (protocolos agonista e antagonista) <sup>40</sup>	Produtos químicos/ Avaliação do potencial de interação com receptores hormonais	Estava na fase de otimização <sup>6</sup>	Validação pelo ECVAM deve começar em 2013 <sup>40</sup>  O ECVAM deve fornecer o “ECVAM <i>recommendations</i> ” O método ainda deve ter aceitação regulatória
	Ensaio de transativação de receptores de Androgênios <sup>40</sup>	Produtos químicos/ Avaliação do potencial de interação com receptores hormonais	Estava na fase de otimização <sup>6</sup>	Validação pelo ECVAM deve começar em 2013 <sup>40</sup>  O ECVAM deve fornecer o “ECVAM <i>recommendations</i> ” O método ainda deve ter aceitação regulatória

\*Baseado em cinco níveis de evolução pelos quais um teste deve passar: Pesquisa e Desenvolvimento (P&D), otimização de teste, pré-validação, validação e aceitação regulamentar

\*\*ESAC consta no Registro do Grupo de Especialistas da UE e dá conselhos ao ECVAM, conferindo validade científica a um método (confiabilidade e relevância). É a base das recomendações do ECVAM<sup>50</sup>

\*\*\*Ensaio dessa área de toxicidade estão em fases precedentes à fase de validação.

Tabela 2. Métodos alternativos aceitos que passariam por atualização ou métodos em processos de aceitação regulatória no período de 2010 a 2013.

<b>Área de toxicidade<sup>40</sup></b>	<b>Método de Ensaio<sup>40</sup></b>	<b>Área de Aplicação/ utilização</b>	<b>Situação da aceitação regulatória do método até 2013<sup>40</sup></b>	<b>Tempo aproximado transcorrido do período de validação pelo ECVAM até aceitação regulatória</b>
Corrosão cutânea	Método de ensaio em epiderme humana reconstruída (RhE)	Produtos químicos/ Avaliação de perigo <sup>51</sup>	O método teve aceitação regulatória em 2004, conforme a diretriz 431 da OECD e o Método de Ensaio B.40.A da UE* Foi atualizado em 2013 para inclusão de Padrões de Desempenho (PS) para avaliação de métodos testes modificados baseados no RhE	6 anos 1997 – 1998 <sup>52</sup> a 2004
	Ensaio da resistência elétrica transcutânea (RET)	Produtos químicos/ Avaliação de perigo <sup>53</sup>	O método teve aceitação regulatória em 2004, conforme a diretriz 430 da OECD e o Método de Ensaio B.40 da UE*	7 anos 1996 – 1997 <sup>52</sup> a 2004
Irritação cutânea	Método de ensaio em epiderme humana reconstruída (RhE)	Produtos químicos/ Avaliação de perigo <sup>54</sup>	O método teve aceitação regulatória em 2010, conforme a diretriz 439 da OECD e o Método de Ensaio B.46 da UE*	3 anos 2003 – 2007 <sup>55</sup> a 2010
Irritação ocular	Método de ensaio de difusão de fluoresceína (FL)	Produtos químicos/ Avaliação de perigo (função celular e citotoxicidade) <sup>56</sup>	O método teve aceitação regulatória em 2012, conforme a diretriz 460 da OECD	4 anos 2006 – 2008 <sup>57</sup> a 2012

	Método de ensaio de opacidade e permeabilidade da córnea em bovinos (BCOP)	Produtos químicos/ Avaliação de perigo (ensaio <i>in vitro</i> organotípicos) <sup>58</sup>	O método teve aceitação regulatória em 2009, conforme a diretriz 447 da OECD e o Método de Ensaio B.47 da UE*	3 anos 2003 – 2006 <sup>57</sup> a 2009
	Método de ensaio em olhos de frango isolados (ICE)	Produtos químicos/ Avaliação de perigo (ensaio <i>in vitro</i> organotípicos) <sup>57</sup>	O método teve aceitação regulatória em 2009, conforme a diretriz 438 da OECD e o Método de Ensaio B.48 da UE*	3 anos 2003 – 2006 <sup>57</sup> a 2009
Genotoxicidade	Aberrações cromossômicas <i>in vitro</i>	Produtos Químicos/ Avaliação de aberrações estruturais <sup>59</sup>	O método teve aceitação regulatória em 1997 (primeira versão) Projeto da diretriz 473 da OECD deve ser analisado para atualização em 2013	**
	Ensaio de micronúcleos <i>in vitro</i>	Produtos Químicos/ Avaliação de aberrações numéricas e estruturais <sup>59</sup>	O método teve aceitação regulatória em 2004 (primeira versão) Projeto da diretriz 487 da OECD deve ser analisado para atualização em 2013	Menos de 1 ano 2004 <sup>60</sup> a 2004
Carcinogenicidade	Ensaio de transformação celular <i>in vitro</i> (CTA) em células de embrião de hamster sírio (SHE)	Produtos químicos/ Avaliação do potencial carcinogênico <sup>61</sup>	Em 2012 não foi considerado pronto para uso regulamentar <sup>45</sup> Novo projeto para diretriz deve ser discutido em 2013	---

Desregulação do sistema endócrino	Ensaio de transativação de receptores de estrogénios (BG1Luc ER TA; protocolos agonistas e antagonistas)	Produtos químicos/ Avaliação do potencial de interação com receptores hormonais	O método teve aceitação regulatória em 2012, conforme a diretriz 457 da OECD	2 anos 2010 <sup>62</sup> a 2012
	Diretriz de ensaio baseada no desempenho para ensaios de transativação por transfecção estável <i>in vitro</i> para detectar substâncias agonistas dos receptores de estrogénios	Produtos químicos/ Avaliação do potencial de interação com receptores hormonais	O método teve aceitação regulatória em 2012, conforme a diretriz 455 da OECD	1 ano 2011 <sup>63</sup> a 2012

\*Métodos de Ensaio contidos no Regulamento (CE) n.º 440/2008 da Comissão Europeia<sup>64</sup>

\*\*Dados insuficientes

Como um dos principais parâmetros a serem levados em consideração, tem-se a sensibilização, que se encontra dentre os pontos principais para que se possa substituir métodos *in vivo* com segurança. Substâncias que sensibilizam a pele são aquelas que têm a capacidade de induzir resposta alérgica após contato (dermatite de contato alérgica) em seres humanos.<sup>65</sup> Em alguns casos, na primeira exposição do indivíduo com determinada substância ocorrerá pequena reação e, na segunda exposição, essa reação pode se tornar severa e persistente, sendo que contatos subsequentes podem produzir reações alérgicas de longa duração.<sup>66</sup> Assim, a avaliação de seu potencial é importante para se ter segurança com o uso das substâncias e, por isso, tem sido foco de pesquisas.<sup>65</sup>

Para métodos que abordem a sensibilização, é necessário que esses identifiquem perigo e informem a potência sensibilizante para que se possa utilizar a substância em nível seguro de exposição humana, o que gera um impasse. Desta forma, apesar de se ter tido progresso no desenvolvimento de testes não animais para o parâmetro sensibilização, torna-se mais complexo o desenvolvimento de um método com tal capacidade, em detrimento dos testes que utilizam animais, os quais, muitas vezes, podem informar a potência sensibilizante.<sup>6</sup> Apesar de, até o momento, nenhum método de sensibilização ter sido aceito via regulatória, alguns testes já estão em fases avançadas de validação, como mostra a Tabela 1.

#### Toxicidade sistêmica

Aqui estão incluídos os parâmetros toxicidade dose repetida, genotoxicidade, carcinogenicidade, toxicidade reprodutiva e toxicidade aguda.<sup>67</sup> Os pontos específicos toxicidade dose repetida, carcinogenicidade e toxicidade reprodutiva foram apresentados pela Comissão Europeia como parâmetros principais e de grande relevância para que se fosse possível substituir testes em animais por modelos *in vitro* ou *in silico* e, por isso, serão foco principal dentro desta pauta.

Pode-se dizer que existe toxicidade dose repetida em um indivíduo quando houver uma disfunção deteriorante persistente ou progressiva em suas células ou órgãos, proveniente de uma exposição por longo período a determinado agente químico (excluindo-se efeitos reprodutivos, carcinogênicos e genotóxicos).<sup>6</sup> Existem diversos testes de toxicidade dose repetida *in vivo*, como estudos toxicidade oral e dérmica, toxicidade de inalação e toxicidade crônica, em roedores, porquinhos-da-índia e coelhos<sup>68</sup>

e, visto que os métodos *in vivo* que abordam o parâmetro conseguem obter uma resposta integral do indivíduo ao agente químico ao qual foi exposto, incluindo parâmetros como toxicocinética, efeitos hormonais, sistema nervoso autônomo, sistema imune e outros, substituí-los por métodos alternativos torna-se bastante complexo.<sup>6</sup>

Nesse contexto, métodos que reduzam e refinem o uso de animais devem ser fortemente considerados como, por exemplo, no caso de se utilizar métodos *in vitro* como forma de planejamento para que um modelo *in vivo* utilize menos animais. Também, métodos *in vitro* podem fornecer dados para identificação de perigo, mecanismo de ação e potencial de toxicidade. Apesar de modelos *in silico* já estarem sendo utilizados pela indústria farmacêutica no P&D, até o momento a grande maioria dos métodos de toxicidade dose repetida considerados alternativos não estão disponíveis, visto que estes se encontram em fases anteriores a validação.<sup>6</sup>

Para o segundo parâmetro ao qual se fará referência aqui, são consideradas substâncias carcinogênicas as que possuem capacidade de induzir, aumentar a ocorrência ou malignidade ou reduzir o tempo de ocorrência de tumores malignos após serem inaladas, ingeridas ou terem sido injetadas ou aplicadas via dérmica. Existem alguns testes de carcinogenicidade *in vivo* disponíveis e comumente utilizados por anos, porém métodos *in vitro* estão em validação (como mostra a Tabela 1) ou em fases anteriores, sendo que estratégias *in silico* também estão sendo pesquisadas (um exemplo é o projeto *carcinoGENOMICS FP6*).<sup>69</sup> Visto que a carcinogênese é, na verdade, uma série de etapas de um processo de transição de células normais a cancerosas que, com várias interações biológicas, depende de diversos fatores como genética, idade, dieta, ambiente e equilíbrio hormonal, a predição dos efeitos de determinada substância ainda não pode ser realizada totalmente *in vitro*, tendo seu prazo se estendendo para além de 2013.<sup>6</sup> Porém, ter ensaios para avaliar agentes genotóxicos e cancerígenos não genotóxicos se faz necessário para garantir segurança ao consumidor.<sup>32</sup>

A toxicidade reprodutiva pode ocorrer como consequência de exposições a uma determinada substância tóxica, afetando diversos pontos e fases do ciclo reprodutivo, tais como fertilidade, comportamento sexual, implamantação de embrião, desenvolvimento embrionário/fetal, adaptação pós-natal, crescimento e desenvolvimento à maturidade sexual, sendo o desenvolvimento embrionário/fetal, o ponto mais crítico. Muito se tem investido em pesquisas que colaborem com novos modelos para esse parâmetro, porém, é algo complexo de ser conseguido visto que se faz necessária uma integração de diversos métodos que, por fim, possam mimetizar uma situação *in vivo* de mamíferos.<sup>32</sup>

Desta maneira, não há prazo estimado ainda para que se consiga substituir os testes em animais para toxicidade reprodutiva (mais de 10 anos), porém, pensa-se que os métodos que já estão sendo estudados podem servir como triagem, de forma integrada, devido a sua sensibilidade e especificidade, o que reduziria e refinaria a utilização de animais.<sup>6</sup>

## Discussão

A preocupação com o bem estar e direito dos animais tem crescido consideravelmente nas últimas décadas e esse foi, sem dúvidas, um fator determinante para que a UE proibisse a comercialização de produtos cosméticos que tenham sido, em seu desenvolvimento, testados em animais, em 2013. Mesmo assim, essa inquietação a respeito das condições com as quais os animais são tratados data de tempo muito maior do que as últimas décadas de discussões sobre utilização destes para fins científicos ou, nesse caso, fins cosméticos, ou seja, existe, sem dúvida, uma sólida base na qual as autoridades podem se apoiar para julgar o que hoje é pertinente, ou não, no desenvolvimento de novos produtos. Um exemplo bem fundamentado é o princípio dos 3 R's de Russel e Burch (1959), que faz referência aos termos refinamento, redução e substituição. Tal abordagem feita pelos autores citados é essencial para a pauta em questão, ainda mais quando se pensa que dificilmente se conseguirá métodos que substituam totalmente os mesmos modelos *in vivo*, quando o mais próximo do ideal é que exista uma integração de vários métodos *in vitro* ou *in silico* para, por fim, mimetizar determinado parâmetro. Percebe-se que para a avaliação de parâmetros toxicológicos, os direitos dos animais podem ser feridos, pois a) muitos destes testes resultam inevitavelmente em sofrimento do animal, b) muitos testes toxicológicos são requeridos por diretrizes e leis antes dos produtos serem comercializados e c) a realização de tais procedimentos é rotineira e não há análise caso a caso, aumentando ainda mais a utilização e sofrimento de animais.<sup>70</sup> Em função disso, o uso de métodos alternativos, sejam eles *in vitro*, *in silico* e utilizando abordagem de TTC integradas, irão fazer parte de uma estratégia dos 3 R's. Apesar disso, ainda não há testes disponíveis para todos os pontos que devem ser avaliados para garantir segurança ao consumidor, e muitos não tem previsão de disponibilidade. Ademais, percebe-se que os métodos que estão sendo estudados dizem respeito não apenas a regulação cosmética, mas, sim, existe preocupação com a pesquisa e desenvolvimento de modelos que possam ser utilizados em outras áreas, como na indústria farmacêutica ou de agrotóxicos, por exemplo, como é

o caso de alguns parâmetros citados, tais como toxicidade dose repetida, toxicidade aguda por via oral, toxicidade reprodutiva e desregulação do sistema endócrino.

Grandes desafios, sem dúvida, estão presentes quando se pensa em métodos alternativos a utilização massiva de animais no desenvolvimento de produtos cosméticos. Como visto nas Tabelas 1 e 2, existem parâmetros mais complexos que geram maior dificuldade no momento de encontrar modelos que mimetizem seu teste *in vivo*. Parâmetros como toxicidade reprodutiva em testes alternativos não tem se quer data prevista para estarem disponíveis na UE. Ademais, além do fato de ter métodos disponíveis, existe o espaço de tempo necessário para que fatores regulatórios sejam finalizados. Para grande parte dos métodos aceitos via regulatória desde 2010, existe intervalo maior que 3 anos no período que se inicia quando o método é validado até quando é aceito. Esse espaço de tempo não leva em consideração o tempo necessário para otimizar, pré-validar e validar o método. Ou seja, possivelmente quase 10 anos seriam necessários, a partir do momento em que se tivesse um teste disponível, para que sua segurança pudesse ser confirmada, isso em nível de UE, visto que os dados expostos são, grandemente, referentes a validações feitas apenas pelo ECVAM. Este período de tempo é grande, porém, necessário se o objetivo for salvaguardar o bem estar dos animais e, conseqüentemente, vir a ter benefícios econômicos no futuro. Futuro relativamente distante, quando as empresas não necessitem dispendir tanto capital com pesquisas incessantes de novos métodos e igualmente não tiverem mais deveres relativos aos custos que utilizar animais gerariam, visto que estes devem, incontestavelmente, ser respeitados e bem tratados sob quaisquer circunstâncias.

Ainda, com a proibição em 2013, a UE foi pioneira em prezar pelo bem estar dos animais e, também, pela segurança humana. De certa forma, abriu espaço para que o restante do mundo pudesse, por conseguinte, seguir os mesmos passos. Atualmente, existem na UE, bem como em diversos países do mundo, órgãos e autoridades responsáveis por etapas inerentes ao processo de desenvolvimento de métodos analíticos. Desta forma, na UE já estão em funcionamento entidades que fazem a validação de métodos analíticos alternativos, como o ECVAM, órgãos que auxiliam as entidades que fazem a validação, como o ESAC, bem como autoridades competentes que emitam parecer sobre o método, aprovando sua utilização naquele território, como o SCCS. Em âmbito mundial, a OECD é uma responsável por emitir diretrizes de utilização do método. Organizações com funções semelhantes as citadas são necessárias em qualquer país ou jurisdição, mundialmente falando, visto que as etapas até o método estar

disponível para uso são muitas e complexas, necessitando, para seu desenvolvimento, profissionais capacitados que possam garantir que o método tenha confiabilidade e relevância. Ou seja, apesar da expectativa de comunidades científicas, internacionais e de proteção aos animais ser grande, não se pode deixar de considerar que não menos importante que validar um método, é garantir que ele seja dotado dessas duas características cruciais, pois, se assim não fosse, um completo desastre se estabeleceria no processo de aceitação de um novo método.<sup>70</sup>

Nesse sentido, algo que deve ser desenvolvido em outras localidades fora da UE são tais organizações, desde que aptas para realizar trabalhos. Nos Estados Unidos já existem órgãos competentes que trabalham efetivamente, como o ICCVAM e o NICEATM, orientado e que recebe colaborações do FDA, respectivamente. Em alguns casos, inclusive, o ICCVAM e o ECVAM trabalham em parceria na validação de determinado método, como foi para ensaios de irritação ocular, como BCOP e ICE, por exemplo.<sup>3</sup> Desta forma, do ponto de vista organizacional, os EUA, grande potencia mundial, encontra-se favorecido, pois já possui órgãos competentes em ação, porém, o país ainda não tem se empenhado tanto para substituir totalmente os testes *in vivo*. É claro que o passo que a UE deu, proibindo completamente a realização de testes em animais é radical e, indubitavelmente, não seriam todos os países que tomariam tal decisão, mesmo levando em conta que eles tivessem potencia econômica semelhante a da Comunidade Europeia. Os EUA tem uma economia que faz uma movimentação global e, por isso, pode não ser algo desejado impedir a comercialização de novos produtos em seu território se estes forem testados ou tiverem seus ingredientes testados em animais, pois a queda na economia, provavelmente, seria grande, ainda mais quando se pensa que grandes empresas estão situadas, em grande parte, nesses dois amplos territórios citados. As questões éticas talvez sejam o maior objetivo do refinamento, redução e substituição de métodos com uso massivo de animais, porém, a lucratividade não deixará de ser um fator preponderante para que qualquer decisão seja tomada, ainda mais quando se fala de grandes potências.

No caso da UE, apesar das indústrias terem feito ressalvas de que seu lucro diminuiria e que, conseqüentemente, não teriam base econômica para dar continuidade a pesquisa de métodos alternativos, a Comissão Europeia decidiu por manter a sua decisão preliminar da proibição total em 2013, visto que essa possuía histórico de anos que foram preparatórios para que ela pudesse chegar ao ponto de tomar a decisão atual, se comprometendo a: acompanhar os efeitos dessa atitude, continuar dando apoio as

diversas fases de desenvolvimento dos métodos e integrar os métodos na agenda comercial e internacional da UE. Isso ocorreu em virtude da experiência decorrida dos últimos anos de discussões sobre o assunto nesse território, que demonstrou que as novas disposições na legislação sobre o uso de animais em pesquisas aceleraram o processo de desenvolvimento e validação de métodos alternativos. Tendo isso em vista, concluiu-se que prorrogar o prazo seria uma maneira de desestimular a determinação em desenvolver rapidamente esses métodos. Além, cumprir com o prazo seria demonstrar inovação responsável na área dos cosméticos,<sup>3</sup> que é exatamente o que se pode observar atualmente. É certo que indústrias e empresas pensarão primariamente em seus lucros e, se o país em que se encontram ou a jurisdição a que pertencem determina um prazo para que elas não utilizem mais animais massivamente para desenvolver seus produtos e que, caso contrário, elas não poderão mais por novos artigos no mercado, elas irão buscar, com a maior eficiência e em menor tempo possível, novas alternativas para que sua comercialização não seja prejudicada. Com base nisso, a atitude da UE foi estratégica e provavelmente surtirá mais efeitos do que os já observados. Porém, esse processo deve ser, sem dúvidas, bem controlado e monitorado para evitar grandes prejuízos econômicos às empresas e, conseqüentemente, a Comunidade Europeia. Tendo isso em vista, pode-se perceber por que potências com economia semelhante a da UE, como os EUA, ainda não aderiram ao disposto.

No histórico da UE de que, de tempos em tempos, novas medidas eram tomadas em prol do bem estar animal, a proibição de comercialização foi imposta em 1993; em 2004 houve proibição de realização de testes em animais para produtos cosméticos acabados e, em 2009, houve proibição da realização de ensaios e comercialização de produtos que tenham sido testados em animais. Dessa forma, até se chegar ao ponto de, em 2013, proibir totalmente a comercialização de produtos cosméticos que tenham sido testados em animais, uma eliminação gradual já estava sendo feita e, desta forma, a substituição da legislação vigente envolvendo os métodos utilizados para testar produtos cosméticos foi sendo assimilada por indústrias e empresas do ramo, ou seja, estas tiveram certo tempo para modificarem seus processos e, mais recentemente, tiveram um prazo estendido até 2013 para que pudessem definitivamente se adequar. Outros países, em grande parte, não têm dados muito semelhantes a estes, ou seja, não tiveram maior preocupação ou mesmo, não possuíam maneiras palpáveis de aplicar os 3 R's em seu território efetivamente e, sendo assim, a mudança se torna ainda mais complexa.

O Brasil é um exemplo de país que começou a prezar pelo bem estar animal há anos, decretando Leis como a nº 9.605, mas, principalmente, Lei nº 11.794, Lei Arouca, primeira lei que dispunha exclusivamente sobre proteção aos animais. Mesmo assim, a preocupação específica com os animais utilizados para fins cosméticos não emergia significativamente nesse território. Há poucos anos o Brasil criou um órgão para validação de métodos analíticos alternativos (BraCVAM), porém, este não está efetivamente em ação. Como existem cooperações internacionais, espera-se que a UE possa estimular e criar sinergias com outros países, tais como o Brasil, mais além, China e Austrália, por exemplo,<sup>3</sup> levando a um aumento da participação de outras nações nesse aspecto. É de grande valia que outras regiões recebem esse auxílio da UE, visto que esta que já percorreu caminhos que a grande maioria das outras nações ainda não conhecem. No caso do Brasil, ainda, deve-se considerar que este ainda é um país em desenvolvimento, ou seja, há divergências econômicas e sociais e, claro, o país não conta com recursos tão vastos quanto nações desenvolvidas. De qualquer forma, é possível, sem dúvidas, iniciar, finalmente, um processo que dirija o Brasil para o progresso, visto que mesmo a UE não conseguiu finalizar tais pontos em poucos anos e, sim, fez uma construção de decisões, a qual se segue até o momento. Logo, é interessante que outros países se espelhem nas atitudes tomadas pela Comissão Europeia ao longo dos anos, o que se torna ainda mais fácil quando se tem parcerias de nações, como ocorre com o ICCR. Mais além, indústrias que tem produção cosmética devem, desde já, inovar nas pesquisas e desenvolvimento de métodos alternativos que, integrados, possam mimetizar modelos *in vivo*. A tarefa proposta é dotada de dificuldades inerentes à complexidade do processo, porém, além de haver a possibilidade de utilizar métodos mundialmente aceitos, é cada vez mais necessário que os próprios países busquem, por si, novas vias para que a utilização de animais seja refinada, reduzida e, na melhor das hipóteses, substituída. Isso por que construir um modelo internamente é uma maneira de ter métodos disponíveis mais facilmente, pois os recursos utilizados no desenvolvimento do modelo possivelmente serão acessíveis no futuro para dar continuidade a sua utilização, ao menos quando se compara os recursos disponíveis em diferentes países.

De qualquer forma, tanto dentro da UE, mas principalmente em países que estão iniciando seu envolvimento com pesquisa de métodos alternativos, é necessária uma abordagem mais coordenada por parte das autoridades responsáveis, para que se possa explorar as possibilidades dentro do quadro regulamentar e acelerar o processo de desenvolvimento de mais modelos alternativos ao uso de animais. É preciso, por conseguinte, impulso para que tais medidas sejam implementadas e para que haja

garantia de apoio político e, sem dúvidas, econômico.<sup>71</sup> As grandes indústrias já desenvolvem seus modelos *in house* por conta da demanda de produtos que necessitam passar por averiguações dentro da empresa e, por isso, estão muito envolvidas com a pesquisa e desenvolvimento de novos métodos. Em função disso, devem ser ainda mais estimuladas a buscar novas vias para se possa alcançar uma implementação total dos 3 R's. Os EUA e o Brasil já iniciaram sua caminhada em direção ao progresso e o primeiro, sem dúvidas, já tem capacidade financeira para desenvolver novos modelos, como mesmo já o faz. O Brasil, por sua vez, mais fragilizado economicamente, depende mais, no momento, de um impulso por parte das autoridades governamentais para que novas ações comecem a ser pensadas e implementadas. A decisão da UE é tendência global e, por isso, espera-se que em alguns anos as outras nações comecem a seguir mais efetivamente seus passos, ao menos no que diz respeito a acelerar as pesquisas nacionais e colaborar mais ativamente com cooperações mundiais.

## **Conclusão**

Já em 1978 se proclamou que os animais tem direito a existência e ao respeito e, sendo assim, práticas como utiliza-los em pesquisa e desenvolvimento de produtos fere essa premissa. Desta maneira, nações como a UE estão fortemente empenhadas na busca por novos modelos de teste que não utilizem animais massivamente. Para isso, pesquisas incessantes estão sendo realizadas com o objetivo de alcançar, em menor tempo possível, o término do uso desenfreado de animais na indústria cosmética, principalmente para parâmetros toxicológicos mais complexos, que requerem maior tempo de desenvolvimento. A UE, atualmente, é considerada inovadora no ramo dos cosméticos por proibir, em 2013, a comercialização de qualquer produto novo que tenha sido testado ou que tenha algum ingrediente testado em animais dentro de seus territórios. Desta forma, abriu espaço para que o restante do mundo pudesse iniciar uma caminhada semelhante a sua. Nesse sentido, vários modelos estão sendo utilizados, mas, sem dúvida, se destacam os métodos *in vitro* como os mais acessíveis. Além disso, apesar de testes referentes a vários parâmetros, como toxicidade dose repetida e toxicidade reprodutiva, terem longo prazo ou ainda não terem previsão para poderem ser substituídos totalmente, mesmo que por alternativas integradas, o andamento do desenvolvimento e regulamentação dos métodos já é grande na UE, e cada vez mais estudos são realizados dentro e fora desta.

Grandes potências como os EUA, apesar de já ter começado seu desenvolvimento nesse sentido, tem poder econômico e organizacional para aumentar sua ênfase em novas pesquisas e, sendo assim, o que lhe falta é impulso e interesse por parte das autoridades. No Brasil, país em desenvolvimento, há certa carência de recursos, porém, o país já tem respaldo para crescer ainda mais na área científica e organizacional e, sabendo disso, o governo deve impulsionar órgãos e indústrias para que estes tenham maior mobilização nesse ramo. É de grande importância que nações possam integrar grupos que pautem assuntos referentes aos métodos alternativos, pois, desta forma, a evolução, mundialmente falando, se torna mais intensa. A decisão da UE é tendência global e, sem dúvidas, é uma questão de tempo para que o restante do mundo se adeque a essa esfera de progresso, visto que os direitos dos animais são cada vez mais evidentes e, felizmente, incontestáveis.

## Referencias

1. UNESCO. Declaração Universal dos Direitos dos Animais. On line. Disponível em [http://www.forumnacional.com.br/declaracao\\_universal\\_dos\\_direitos\\_dos\\_animais.pdf](http://www.forumnacional.com.br/declaracao_universal_dos_direitos_dos_animais.pdf). Acesso em 20 out 2013
2. European Commission. Full EU ban on animal testing for cosmetics enters into force. On line. Disponível em [http://europa.eu/rapid/press-release\\_IP-13-210\\_en.htm](http://europa.eu/rapid/press-release_IP-13-210_en.htm). Acesso em 20 out 2013
3. European Commission. Communication from the Commission to the European Parliament and the Council on the animal testing and marketing ban and on the state of play in relation to alternative methods in the field of cosmetics. On line. Disponível em [http://ec.europa.eu/governance/impact/ia\\_carried\\_out/docs/ia\\_2013/swd\\_2013\\_0067\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/governance/impact/ia_carried_out/docs/ia_2013/swd_2013_0067_en.pdf). Acesso em 20 out 2013
4. The National Academies Press. Guide for the care and use of Laboratory Animals. On line. Disponível em <http://grants.nih.gov/grants/olaw/Guide-for-the-care-and-use-of-laboratory-animals.pdf>. Acesso em 20 out 2013
5. Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health. The Principles of Humane Experimental Technique. On line. Disponível em [http://altweb.jhsph.edu/pubs/books/humane\\_exp/chap1a](http://altweb.jhsph.edu/pubs/books/humane_exp/chap1a). Acesso em 20 out 2013
6. S Adler et al. Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010, Arch Toxicol 85: 367-485, 2011
7. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos. On line. Disponível em [http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/92f15c004e219a73a96dbbc09d49251b/Guia\\_cosmeticos\\_grafica\\_final.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/92f15c004e219a73a96dbbc09d49251b/Guia_cosmeticos_grafica_final.pdf?MOD=AJPERES). Acesso em 20 out 2013

8. European Commission. Review of Cosmetics Directive 76/768/EEC. On line. Disponível em <http://ec.europa.eu/consumers/sectors/cosmetics/documents/revision/>. Acesso em 20 out 2013
9. European Commission. Consultation on “Draft Report on alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects – 2010”. On line. Disponível em [http://ec.europa.eu/consumers/sectors/cosmetics/files/pdf/animal\\_testing/consultation\\_animal\\_testing\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/consumers/sectors/cosmetics/files/pdf/animal_testing/consultation_animal_testing_en.pdf). Acesso em 20 out 2013
10. European Union. The Treaty on The Functioning of The European Union. On line. Disponível em <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:C:2008:115:0047:0199:en:PDF>. Acesso em 20 out 2013
11. W Waldregrave. The Council of The European Communities. On line. Disponível em [http://ec.europa.eu/food/fs/aw/aw\\_legislation/scientific/86-609-eec\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/aw/aw_legislation/scientific/86-609-eec_en.pdf). Acesso em 20 out 2013.
12. European Commission. European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing (EURL ECVAM). On line. Disponível em [http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our\\_labs/eurl-ecvam](http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam). Acesso em 20 out 2013
13. The Organization for Economic Co-operation and Development. OECD Guidelines for the testing of chemicals and related documents. On line. Disponível em <http://www.oecd.org/env/ehs/oecdguidelinesforhetestingofchemicalsandrelateddocuments.htm>. Acesso em 20 out 2013
14. International Cooperation on Cosmetics Regulation Industry Committee. Applicability of Animal Testing Alternatives in Regulatory Frameworks within ICCR Regions. On line. Disponível em <http://www.fda.gov/downloads/Cosmetics/InternationalActivities/ConferencesMeetingsWorkshops/InternationalCooperationonCosmeticsRegulationsICCR/UCM320464.pdf>. Acesso em 20 out 2013
15. Associação Brasileira da Indústria Química. Perguntas mais frequentes efetuadas pela indústria sobre o REACH. On line. Disponível em [http://www.desenvolvimento.gov.br/arquivos/dwnl\\_1348772380.pdf](http://www.desenvolvimento.gov.br/arquivos/dwnl_1348772380.pdf). Acesso em 20 out 2013
16. European Commission. REACH – Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals. On line. Disponível em [http://ec.europa.eu/enterprise/sectors/chemicals/reach/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/enterprise/sectors/chemicals/reach/index_en.htm). Acesso em 20 out 2013
17. United States Government Printing Office. Code of Federal Regulation – Title 21 – Food and Drugs. On line. Disponível em <http://www.fda.gov/medicaldevices/deviceregulationandguidance/databases/ucm135680.htm>. Acesso em 20 out 2013
18. United States Department of Agriculture. Animal Welfare Act. On line. Disponível em <http://awic.nal.usda.gov/government-and-professional-resources/federal-laws/animal-welfare-act>. Acesso em 20 out 2013

19. United States Food and Drug Administration. Animal Testing and Cosmetics. On line. Disponível em <http://www.fda.gov/Cosmetics/ProductandIngredientSafety/ProductTesting/ucm072268.htm>. Acesso em 20 out 2013
20. AltTox. Organizations and Associations. On line. Disponível em <http://www.alttox.org/ttrc/resources/organizations.html>. Acesso em 20 out 2013
21. Institute for In Vitro Sciences. Science: to Apply the Knowledge. On line. Disponível em <http://www.iivs.org/scientific-services/>. Acesso em 20 out 2013
22. United States Food and Drug Administration. International Cooperation on Cosmetics Regulation (ICCR), Outcomes of the Meeting Held July 8-10, 2013. On line. Disponível em <http://www.fda.gov/Cosmetics/InternationalActivities/ConferencesMeetingsWorkshops/InternationalCooperationonCosmeticsRegulationsICCR/ucm361495.htm>. Acesso em 20 out 2013
23. Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos. Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos. On line. Disponível em [http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/f569ef804822feed95bed754098589a5/2\\_Palestra.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/f569ef804822feed95bed754098589a5/2_Palestra.pdf?MOD=AJPERES). Acesso em 20 out 2013
24. O Presgrave. The Need for the Establishment of a Brazilian Centre for the Validation of Alternative Methods (BraCVAM), Atla 36: 705-708, 2008
25. O Presgrave. 3 Rs Implementation in Latin America. In: EU Science: Global Challenges & Global Collaboration, Bruxelas, 2013.
26. BG Chiari et al. Estudo de segurança de cosméticos: presente e futuro, Rev Ciênc Farm Básica Apl. 33 (3): 323-330, 2012
27. G Krause. Lei nº 9.605, de 12 de Fevereiro de 1998. On line. Disponível em [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/l9605.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l9605.htm). Acesso em 21 out 2013
28. T Genro et al. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. On line. Disponível em [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm). Acesso em 21 out 2013
29. SM Rezende. Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009. On line. Disponível em [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2007-2010/2009/Decreto/D6899.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2009/Decreto/D6899.htm). Acesso em 21 out 2013
30. JR Goldim, MM Raymundo. Pesquisa em Modelos Animais. On line. Disponível em <http://www.bioetica.ufrgs.br/animrt.htm>. Acesso em 21 out 2013
31. European Union. Regulation (EC) N° 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products. On line. Disponível em <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:342:0059:0209:en:PDF>. Acesso em 21 out 2013
32. V Zuang et al. EURL ECVAM progress report on the development, validation and regulatory acceptance of alternative methods. On line. Disponível em [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab\\_animals/pdf/EURL\\_ECVAM\\_progress\\_report\\_cosmetics\\_2013.pdf](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pdf/EURL_ECVAM_progress_report_cosmetics_2013.pdf). Acesso em 21 out 2013

33. United States Food and Drug Administration. Public Consultation on the “Draft Report on Alternative (non-animal) Methods for Cosmetics Testing, Current Status and Future Prospects – 2010”: Comment. On line. Disponível em [http://ec.europa.eu/consumers/sectors/cosmetics/files/pdf/animal\\_testing/at\\_responses/fda\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/consumers/sectors/cosmetics/files/pdf/animal_testing/at_responses/fda_en.pdf). Acesso em 21 out 2013
34. TL Moda et al. Estudos In Silico de Propriedades Farmacocinéticas: Desenvolvimento de Um Modelo Preditivo para a Ligação Protéica Plasmática. On line. Disponível em <http://sec.sbq.org.br/cd29ra/resumos/T0115-1.pdf>. Acesso em 21 out 2013
35. Joint Research Centre. Threshold of Toxicological Concern. On line. Disponível em [http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our\\_labs/predictive\\_toxicology/background/TTC](http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/predictive_toxicology/background/TTC). Acesso em 21 out 2013
36. European Medicines Agency. Toxicokinetics: A Guidance for Assessing Systemic Exposure in Toxicology Studies. On line. Disponível em [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2009/09/WC500002770.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002770.pdf). Acesso em 21 out 2013
37. R Ashauer, BI Escher. Advantages of toxicokinetic and toxicodynamic modelling in aquatic ecotoxicology and risk assessment. On line. Disponível em <http://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/2010/EM/c0em00234h#!divAbstract>. Acesso em 21 out 2013
38. The Organization for Economic Co-operation and Development. Skin Absorption: *in vitro* Method. On line. Disponível em <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9742801e.pdf?expires=1382379370&id=id&accname=guest&checksum=F9AFD98C7130D45CD5B4782F16D88198>. Acesso em 21 out 2013
39. O Pelkonen et al. Draft Report on Alternative (Non-Animal) Methods for Cosmetics Testing: current status and future prospects – 2010: Chapter 4 Toxicokinetics. On line. Disponível em [http://ec.europa.eu/consumers/sectors/cosmetics/files/pdf/animal\\_testing/chapter\\_4\\_toxicokinetics\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/consumers/sectors/cosmetics/files/pdf/animal_testing/chapter_4_toxicokinetics_en.pdf). Acesso em 21 out 2013
40. European Commission. Comunicação da Comissão ao Parlamento Europeu e ao Conselho sobre a proibição da experimentação em animais e a proibição da comercialização e a situação atual relativamente aos métodos alternativos no domínio dos cosméticos. On line. Disponível em <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=COM:2013:0135:FIN:PT:HTML>. Acesso em 21 out 2013
41. D Basketter et al. Draft Report on Alternative (Non-Animal) Methods for Cosmetics Testing: current status and future prospects – 2010: Chapter 2 Skin Sensitisation. On line. Disponível em [http://ec.europa.eu/consumers/sectors/cosmetics/files/pdf/animal\\_testing/chapter\\_2\\_sensitisation\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/consumers/sectors/cosmetics/files/pdf/animal_testing/chapter_2_sensitisation_en.pdf). Acesso em 21 out 2013
42. EURL ECVAM. EURL ECVAM Recommendation on Direct Peptide Reactivity Assay for Skin Sensitisation Testing. On line. Disponível em [http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our\\_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/EURL-ECVAM-REC-DPRA-DRAFT-ver02August2013.pdf](http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/EURL-ECVAM-REC-DPRA-DRAFT-ver02August2013.pdf). Acesso em 21 out 2013
43. S Creton et al. Draft Report on Alternative (Non-Animal) Methods for Cosmetics Testing: current status and future prospects – 2010: Chapter 1 Repeated dose toxicity. On

line. Disponível em

[http://ec.europa.eu/consumers/sectors/cosmetics/files/pdf/animal\\_testing/chapter\\_1\\_repeat\\_dose\\_toxicity\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/consumers/sectors/cosmetics/files/pdf/animal_testing/chapter_1_repeat_dose_toxicity_en.pdf). Acesso em 21 out 2013

44. JV Benthem et al. Draft Report on Alternative (Non-Animal) Methods for Cosmetics Testing: current status and future prospects – 2010: Chapter 3 Carcinogenicity. On line. Disponível em

[http://ec.europa.eu/consumers/sectors/cosmetics/files/pdf/animal\\_testing/chapter\\_3\\_carcinogenicity\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/consumers/sectors/cosmetics/files/pdf/animal_testing/chapter_3_carcinogenicity_en.pdf). Acesso em 21 out 2013

45. EURL ECVAM. EURL ECVAM Recommendation on the Cell Transformation Assays using SHE and Balb/c 3T3 Mouse Fibroblast Cell line. On line. Disponível em

[http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our\\_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/EURL-ECVAM%20-Recommendation.pdf](http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/EURL-ECVAM%20-Recommendation.pdf). Acesso em 21 out 2013

46. EURL ECVAM. ECVAM Recommendation on the Cell Transformation Assay based on the Bhas 42 cell line. On line. Disponível em [http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our\\_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/EURL-ECVAM-REC-Bhas42-DRAFT-ver02August2013.pdf](http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/EURL-ECVAM-REC-Bhas42-DRAFT-ver02August2013.pdf). Acesso em 21 out 2013

47. S Adler et al. Draft Report on Alternative (Non-Animal) Methods for Cosmetics Testing: current status and future prospects – 2010: Chapter 5 Reproductive Toxicity. On line. Disponível em

[http://ec.europa.eu/consumers/sectors/cosmetics/files/pdf/animal\\_testing/chapter\\_5\\_reproductive\\_toxicity\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/consumers/sectors/cosmetics/files/pdf/animal_testing/chapter_5_reproductive_toxicity_en.pdf). Acesso em 21 out 2013

48. P Prieto et al. Follow-up study on the predictive capacity of the 3T3 Neutral Red Uptake cytotoxicity assay to correctly identify substances not classified for acute oral toxicity under the EU CLP system (LD50 > 2 000 mg/kg. On line. Disponível em

[http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our\\_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/files-3t3/Final%203T3%20NRU%20Study%20Report%20with%20amendements%20and%20Annexes.pdf](http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/files-3t3/Final%203T3%20NRU%20Study%20Report%20with%20amendements%20and%20Annexes.pdf). Acesso em 21 out 2013

49. H Witters et al. The assessment of estrogenic or anti-estrogenic activity of chemicals by the human stably transfected estrogen sensitive MELN cell line: Results of test performance and transferability. On line. Disponível em

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0890623810000250>. Acesso em 21 out 2013

50. Joint Research Centre. ESAC (ECVAM Scientific Advisory Committee). On line.

Disponível em [http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our\\_labs/eurl-ecvam/scientific-advice-stakeholders-networks/ecvam-scientific-advisory-committee-esac](http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/scientific-advice-stakeholders-networks/ecvam-scientific-advisory-committee-esac). Acesso em 21 out 2013

51. The Organization for Economic Co-operation and Development. In vitro skin corrosion: reconstructed human epidermis (RHE) test method. On line. Disponível em

<http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9713211e.pdf?expires=1382384362&id=id&accname=guest&checksum=7B8DC8E5BA0CCCF2C862E10412F26E70>. Acesso em 21 out 2013

52. Joint Research Centre. Skin Corrosion. On line. Disponível em

[http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our\\_labs/eurl-ecvam/validation-regulatory-acceptance/topical-toxicity/skin-corrosion](http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/validation-regulatory-acceptance/topical-toxicity/skin-corrosion). Acesso em 21 out 2013

53. The Organization for Economic Co-operation and Development. In Vitro Skin

Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER). On line. Disponível em

- [http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-430-in-vitro-skin-corrosion-transcutaneous-electrical-resistance-test-ter\\_9789264071124-en](http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-430-in-vitro-skin-corrosion-transcutaneous-electrical-resistance-test-ter_9789264071124-en). Acesso em 21 out 2013
54. The Organization for Economic Co-operation and Development. *In Vitro* Skin Irritation: Reconstructed Human *Epidermis* Test Method. On line. Disponível em <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9713241e.pdf?expires=1382385059&id=id&accname=guest&checksum=BD298AF6408DB3C60238C5C437C0DDA4>. Acesso em 21 out 2013
55. C Griesinger et al. Explanatory Background Document to the OECD Draft Test Guideline on in vitro Skin Irritation Testing. Disponível em [http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our\\_labs/eurl-ecvam/validation-regulatory-acceptance/docs-skin-irritation-1/DOC10-background%20document.pdf](http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/validation-regulatory-acceptance/docs-skin-irritation-1/DOC10-background%20document.pdf). Acesso em 21 out 2013
56. The Organization for Economic Co-operation and Development. Fluorescein Leakage Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants. On line. Disponível em <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9712241e.pdf?expires=1382385481&id=id&accname=guest&checksum=CB0A2F9843E2D792DF31F5961BB0CDF8>. Acesso em 21 out 2013
57. Joint Research Centre. Eye Irritation. On line. Disponível em [http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our\\_labs/eurl-ecvam/validation-regulatory-acceptance/topical-toxicity/eye-irritation](http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/validation-regulatory-acceptance/topical-toxicity/eye-irritation). Acesso em 21 out 2013
58. The Organization for Economic Co-operation and Development. 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. On line. Disponível em <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9713221e.pdf?expires=1382385341&id=id&accname=guest&checksum=39A2B5A0AD14663A76D785B10134138F>. Acesso em 21 out 2013
59. Joint Research Centre. Genotoxicity. On line. Disponível em [http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our\\_labs/eurl-ecvam/validation-regulatory-acceptance/systemic-toxicity/genotoxicity](http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/validation-regulatory-acceptance/systemic-toxicity/genotoxicity). Acesso em 21 out 2013
60. R Corvi et al. ECVAM retrospective validation of *in vitro* micronucleus test (MNT). On line. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2441751/>. Acesso em 21 out 2013
61. Joint Research Centre. Carcinogenicity. On line. Disponível em [http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our\\_labs/eurl-ecvam/validation-regulatory-acceptance/systemic-toxicity/Carcinogenicity](http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/validation-regulatory-acceptance/systemic-toxicity/Carcinogenicity). Acesso em 21 out 2013.
62. W Casey et al. Regulatory Acceptance of the BG1Luc Estrogen Receptor Transactivation Test Method. On line. Disponível em <http://iccvam.niehs.nih.gov/meetings/SOT13/posters/Casey-text-508.pdf>. Acesso em 21 out 2013
63. ICCVAM. Validation Study of the BG1Luc4E2 Estrogen Receptor (ER) Transcriptional Activation (TA) Test Method. On line. Disponível em [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/endo\\_docs/ERTA-TMER/AppxC/BRD.pdf](http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/endo_docs/ERTA-TMER/AppxC/BRD.pdf). Acesso em 21 out 2013
64. European Union. Regulamento (CE) nº 440/2008 da Comissão de 30 de Maio de 2008. On line. Disponível em

lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:142:0001:0001:PT:PDF . Acesso em 21 out 2013

65. Joint Research Centre. Skin Sensitisation. On line. Disponível em [http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our\\_labs/eurl-ecvam/validation-regulatory-acceptance/topical-toxicity/skin-sensitisation](http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/validation-regulatory-acceptance/topical-toxicity/skin-sensitisation). Acesso em 21 out 2013

66. M Chorilli et al. Ensaio biológicos para avaliação de segurança de produtos cosméticos. On line. Disponível em [http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/Cien\\_Farm/article/viewFile/869/768](http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/Cien_Farm/article/viewFile/869/768). Acesso em 21 out 2013

67. Joint Research Centre. Systemic Toxicity. On line. Disponível em [http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our\\_labs/eurl-ecvam/validation-regulatory-acceptance/systemic-toxicity](http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/validation-regulatory-acceptance/systemic-toxicity). Acesso em 21 out 2013

68. Joint Research Centre. Repeated Dose Toxicity. On line. Disponível em [http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our\\_labs/eurl-ecvam/validation-regulatory-acceptance/systemic-toxicity/repeated-dose-toxicity](http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/validation-regulatory-acceptance/systemic-toxicity/repeated-dose-toxicity). Acesso em 21 out 2013

69. Joint Research Centre. Carcinogenicity. On line. Disponível em [http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our\\_labs/eurl-ecvam/validation-regulatory-acceptance/systemic-toxicity/Carcinogenicity](http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/validation-regulatory-acceptance/systemic-toxicity/Carcinogenicity). Acesso em 21 out 2013

70. M Balls, JH Fentem. The Validation and Acceptance of Alternatives to Animal Testing, Toxicology in vitro 13: 837-846, 1999

71. B Garthoff. Alternatives to animal experimentation: The regulatory background, Toxicology and Applied Pharmacology 207: 388-392, 2005