



**UFG**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO FARMACÊUTICA**

**WANESSA MACHADO ANDRADE**

---

**ESTRATÉGIA ASSOCIANDO MÉTODOS SUBSTITUTIVOS À  
EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL PARA AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE  
OCULAR, CATEGORIZAÇÃO E ROTULAGEM DE FORMULAÇÕES  
AGROTÓXICAS COMERCIALIZADAS NO BRASIL**

---

**Goiânia  
2018**

---

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR  
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES  
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico:     Dissertação     Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: Wanessa Machado Andrade

Título do trabalho: **ESTRATÉGIA ASSOCIANDO MÉTODOS SUBSTITUTIVOS À EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL PARA AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE OCULAR, CATEGORIZAÇÃO E ROTULAGEM DE FORMULAÇÕES AGROTÓXICAS COMERCIALIZADAS NO BRASIL**

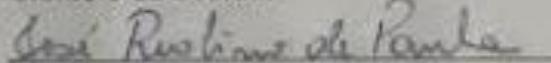
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento  SIM     NÃO<sup>1</sup>

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

  
Assinatura do(a) autor(a)<sup>2</sup>

Ciente e de acordo:

  
Assinatura do(a) orientador(a)<sup>2</sup>

Data: 03/12/2019

Prof. Dr. José Ruelino de Paula  
Coord. do Programa de Pós-Graduação  
em Engenharia de Alimentos - PPGEA

<sup>1</sup> Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação de dissertação/tese em livro.

<sup>2</sup> A assinatura deve ser escaneada.

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR  
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES  
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o(a) autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

**1. Identificação do material bibliográfico:**     Dissertação     Tese

**2. Identificação da Tese ou Dissertação:**

Nome completo do(a) autor(a): Wanessa Machado Andrade

Título do trabalho: Estratégia associando métodos substitutivos à experimentação animal para a avaliação da toxicidade ocular, caracterização e rotulagem de formulações agrotóxicas comercializadas no Brasil

**3. Informações de acesso ao documento:**

Concorda com a liberação total do documento  SIM     NÃO<sup>1</sup>

Independente da concordância com a disponibilização eletrônica, é imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

Wanessa Machado Andrade  
Assinatura do(a) autor(a)<sup>2</sup>

Ciente e de acordo:  
Marize Campos Valadares  
Profª Dra. Adjunto de Toxicologia  
Faculdade de Farmácia / UFG  
Assinatura do(a) orientador(a)<sup>2</sup>

Data: 26 / 11 / 2021

<sup>1</sup> Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante: a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a); b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

<sup>2</sup> As assinaturas devem ser originais sendo assinadas no próprio documento. Imagens coladas não serão aceitas.

**WANESSA MACHADO ANDRADE**

---

---

**Estratégia associando métodos substitutivos à experimentação animal para avaliação da toxicidade ocular, categorização e rotulagem de formulações agrotóxicas comercializadas no Brasil**

---

---

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Doutor em Inovação Farmacêutica.

Orientadora: Professora Dr<sup>a</sup> Marize Campos Valadares.

**Goiânia  
2018**

---

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Machado Andrade, Wanessa

Estratégia associando métodos substitutivos à experimentação animal para avaliação da toxicidade ocular, categorização e rotulagem de formulações agrotóxicas comercializadas no Brasil [manuscrito] / Wanessa Machado Andrade. - 2018.  
111 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Marize Campos Valadares.  
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade Farmácia (FF), Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica, Goiânia, 2018.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Agrotóxicos. 2. Métodos alternativos à experimentação animal. 3. Irritação Ocular. 4. Teste de Draize. 5. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. I. Campos Valadares, Marize, orient. II. Título.

CDU 615



Ministério da Educação  
 Universidade Federal de Goiás  
 Faculdade de Farmácia  
 Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica  
 UFG/UFAM/UNIFAP/UFPA



**ATA DA SEÇÃO PÚBLICA DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO 06**

Aluno (a): Wanessa Machado Andrade

Orientador (a): Prof. Dr. Marize Campos Valadares

Título da Dissertação: "Estratégia associando métodos substitutivos a experimentação animal para avaliação da toxicidade ocular, categorização e rotulagem de formulações agrotóxicas comercializadas no Brasil".

Data: 20/12/2018

Horário: 14:00 horas

Local: Mini auditório da Faculdade de Farmácia/UFG

**Sugestões\*:**

\*Obs: sugestão de alteração de título da dissertação deve ser acompanhada de justificativa.

*pe banca solicitar as correções criteriosas  
 do trabalho final de tese*

**Parecer da Banca Examinadora**

Membro	Aprovado/ Reprovado	Assinatura
Prof. Dr. Marize Campos Valadares (UFG) Presidente	<i>aprovada</i>	<i>[assinatura]</i>
Prof. Dr. Renata Mazaro Costa (UFG)	<i>aprovada</i>	<i>[assinatura]</i>
Prof. Dr. José Realino de Paula (UFG)	<i>aprovada</i>	<i>[assinatura]</i>
Prof. Dr. Thaisângela Rodrigues L. e Silva Gomes (UFG)	<i>aprovada</i>	<i>[assinatura]</i>
Prof. Dr. Marcelo do Nascimento Gomes (UFG)	<i>aprovada</i>	<i>[assinatura]</i>
Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha (UFG)		
Prof. Dr. Daniella Guimarães Almeida Diniz (UFG)		
<b>Parecer Final</b>	<b>Aprovado/Reprovado</b>	<i>aprovada</i>



**UFG**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO FARMACÊUTICA**

**Coordenador do Programa de Pós-Graduação**

Prof. Dr. José Realino de Paula

**Sub-Coordenador do Programa de Pós-Graduação**

Prof. Dr. Edemilson Cardoso

**Goiânia-GO  
2018**

**Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica  
da Universidade Federal de Goiás**

**BANCA EXAMINADORA - Defesa**

**Aluno(a): Wanessa Machado Andrade**

---

**Orientador(a): Professora Dr<sup>a</sup> Marize Campos Valadares**

---

**Professora Dr<sup>a</sup> Marize Campos Valadares / Presidente**

Professora da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, FF/UFG.

**Professor Dr José Realino de Paula / Membro Titular**

Professor da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, FF/UFG.

**Professora Dr<sup>a</sup> Renata Mazaro Costa / Membro Titular**

Professora do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás,  
ICB/UFG.

**Professor Dr Marcelo do Nascimento Gomes / Membro Titular**

Professor Substituto da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás,  
FF/UFG.

**Professora Dr Thaisângela Rodrigues Lopes e Silva Gomes / Membro Titular**

Bolsista Pós-doutor da Universidade Federal de Goiás, FO/UFG.

**Professor Dr Luiz Carlos da Cunha / Membro Suplente**

Professor da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, FF/UFG.

**Professora Dra Danielle Guimarães Almeida Diniz / Membro Suplente**

Professora da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, FF/UFG.

---

**Data: 20/12/2018**

---

*Dedico este trabalho aos meus pais, Adely Aparecida Machado  
Andrade e Rômulo Pires de Andrade, bem como ao meu  
esposo Marcos James de Oliveira Veras e ao meu filho Pedro  
Henrique Andrade Veras, pelos ensinamentos, abdições,  
apoio, amor e incentivos. Vocês foram minha fonte de forças! E  
essa vitória também é de vocês!*

## AGRADECIMENTOS

---

*Agradeço primeiramente à Deus por ter me ajudado a concretizar este sonho, me fornecendo saúde, sabedoria e força para vencer os desafios inerentes à este trabalho. Sou prova do Seu amor e cuidado em minha vida. Não existe palavras para mensurar tamanha bênção. Com Deus tudo é possível!*

*Aos meus pais Adely Aparecida Machado Andrade e Rômulo Pires de Andrade por sempre me apoiarem, por cuidarem do meu filho (tão pequenininho!), por serem meu alicerce, por escutar meus desabafos e sempre me dar os conselhos mais sábios e encorajadores.*

*Ao meu amado esposo, por estar ao meu lado há tantos anos e sempre me incentivar, proteger e tornar a caminhada mais leve e divertida. Seu otimismo e alegria foram cruciais. Obrigada por todo amor e cuidado.*

*Ao meu filho Pedro Henrique Andrade Veras por ser minha principal fonte de forças e por me fazer esquecer todas as dificuldades e angustias apenas por estar ao meu lado. Seu amor sincero e seu sorriso contagiante sempre me revigoraram. Que privilégio ser sua mamãe!*

*À minha irmã Larissa Machado Andrade por sempre estar ao meu lado e me fazer sentir capaz.*

*À minha sogra Mariluci do Nascimento Oliveira por sua solicitude para cuidar do meu filho e da minha casa sempre que precisei.*

*À minha orientadora professora Dra Marize Campos Valadares pela oportunidade, confiança, ensinamentos e por ter contribuído imensamente para o meu crescimento e independência. Sinto-me orgulhosa por fazer parte da sua equipe.*

*Ao grande amigo e confidente Artur Christian Garcia da Silva por todo apoio na realização deste trabalho, por tantos sábados árdusos, pelos intermináveis BCOPs, dentre tantos outros momentos intensos de trabalho. Obrigada por ter acreditado em*

*mim quando eu mesma não acreditei, por cada palavra dita e precisa, por ter se tornado um verdadeiro amigo. Você é muito especial!*

*À grande amiga Larissa Cleres Moreira, em especial, pela colaboração nos ensaios HETCAM, desde a companhia durante a viagem à Itaberaí até a realização prática da metodologia. Com você aprendi muito! Aprendi cálculos de diluição de uma maneira não usual (para farmacêuticos), a aceitar que você sempre muda “um pouquinho” os protocolos (e tudo bem! No final da certo), a acelerar meu raciocínio... mas o meu maior aprendizado com você foi sobre a lealdade e a verdadeira amizade. Obrigada por se fazer presente na minha vida, profissional e pessoal.*

*A toda equipe do Laboratório de Ensino e Pesquisa em Toxicologia (TOXIN): Adrienny Chialchia, Alane Cortez, Ana Clara Stival, Artur Christian, Bruna Tollstadius, Bruna Pedralli, Elisandra Gava, Gessyca Gonçalves, Hallisson Ranieri, Isabelly Paula, Laís Brito, Lara Prado, Larissa Cleres, Larissa Matuda, Renato Ivan, Soraia Ferreira, Thaisângela Rodrigues, Thaís Rosa. Obrigada pela troca de conhecimentos, pelos inúmeros cafés (com ou sem bolo), pelos almoços (com ou sem divisão de marmita), pelas risadas, pela torcida e pela concivência diária. Vocês tornaram a trajetória mais leve e agradável.*

*À Fernanda Bellato, Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, por continuar com sua solicitude, delicadeza e cuidado comigo, mesmo eu não sendo mais aluna do Programa.*

*À Profa. Dra. Aline Carvalho Batista, por disponibilizar seu Laboratório para confecção dos cortes histológicos.*

*Aos nossos “vizinhos” do Laboratório de Nanotecnologia e Sistemas de Liberação de Fármacos, pela convivência e amizade.*

*À Ludmila, do frigorífico Vale do Cedro, pela parceria na doação dos olhos bovinos.*

*A todos os docentes do Programa de Pós-graduação em Inovação Farmacêutica que de alguma maneira contribuíram para minha formação.*

*À CAPES, ao CNPq e à FAPEG pelo suporte financeiro concedido.*

*À UFG e à Faculdade de Farmácia.*

*“Deleita-te também no Senhor, e ele te concederá o que deseja o teu coração. Entrega o teu caminho ao Senhor, confia Nele e Ele tudo fará.”*

*Salmos 37:4,5*

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Formulações agrotóxicas no Brasil e seus aspectos legais.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Toxicidade ocular.....</b>	<b>7</b>
<i>1.2.1 Estrutura ocular.....</i>	<i>7</i>
<i>1.2.2 Reações adversas oculares adversos.....</i>	<i>10</i>
<i>1.2.3 Avaliação in vivo do potencial de irritação ocular de substâncias químicas e misturas.....</i>	<i>11</i>
<i>1.2.4 Metodos substitutivos ao uso animal para avaliação da toxicidade ocular.....</i>	<i>18</i>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
<b>2.1 Objetivo geral.....</b>	<b>23</b>
<b>2.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>23</b>
<i>2.2.1 Quanto às formulações agrotóxicas comercializadas no Brasil .....</i>	<i>23</i>
<i>2.2.2 Quanto ao refinamento do ensaio BCOP.....</i>	<i>24</i>
<b>3. MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
<b>3.1 Abordagem em camadas para avaliar a irritação ocular com base em parâmetros mecanístico.....</b>	<b>25</b>
<i>3.1.1 Seleção das formulações agrotóxicas.....</i>	<i>26</i>
<i>3.1.2 Método de Exposição de Curta Duração (OECD 491/2017): Primeiro nível – desfecho morte celular.....</i>	<i>30</i>
<i>3.1.2.1 Preparo da monocamada celular.....</i>	<i>30</i>
<i>3.1.2.2 Preparo e Exposição das formulações agrotóxicas .....</i>	<i>31</i>
<i>3.1.2.3 Análise dos dados: Viabilidade celular e Classificação.....</i>	<i>31</i>
<i>3.1.3 Teste de Opacidade e Permeabilidade da Córnea Bovina (OPCB) - OECD 437/2017 seguida da análise histopatológica: Segundo nível – desfecho opacidade, permeabilidade, localização de danos no tecido, colágeno e células soltas.....</i>	<i>32</i>
<i>3.1.3.1 – Obtenção das córneas e exposição às formulações agrotóxicas...</i>	<i>32</i>

3.1.3.2 – <u>Análise dos resultados de opacidade e permeabilidade</u> .....	34
3.1.3.3 <u>Avaliação Histopatológica das córneas bovina</u> .....	36
3.1.3.3.1 – <u>Processamento das córneas, confecção dos cortes histológicos e coloração das lâminas com Hematoxilina/Eosina (HE)</u> .....	36
3.1.3.3.2 – <u>Análise dos eventos histopatológicos e classificação da irritação ocular</u> .....	37
<u>3.1.4 - Ensaio da Membrana Corioalantóide do Ovo Embrionado de Galinha (Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane - HET-CAM) – adaptado do INVITTOX 47 (1992): Terceiro nível – eventos inflamatórios</u> ....	38
3.1.4.1 – <u>Obtenção dos ovos embrionados e exposição aos praguicidas</u> .....	38
3.1.4.2 – <u>Elaboração da pontuação final e classificação do potencial de irritação das amostras</u> .....	39
<b>3.2 Análise da profundidade da lesão</b> .....	40
<u>3.2.1 Processamento das córneas, confecção dos cortes histológicos e coloração das lâminas com Hoescht</u> .....	41
<u>3.2.2 Análise da profundidade da lesão</u> .....	42
<b>4. RESULTADOS</b> .....	44
4.1 Artigo 1.....	44
4.2 Artigo 2.....	76
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	86
<b>6. REFERÊNCIAS</b> .....	87
<b>7. ANEXOS</b> .....	93
7.1 Normas de publicação do periódico <i>Toxicology in vitro</i> .....	93

---

	<b>Título</b>	<b>Página</b>
<b>Figura 1</b>	Esquema da estrutura ocular e seus componentes.	8
<b>Figura 2</b>	Esquema do epitélio da córnea	10
<b>Figura 3</b>	Fluxograma referente a combinação dos ensaios substitutivos ao uso de animais que compõem a plataforma de níveis para avaliar a toxicidade ocular de formulações agrotóxicas.	26
<b>Figura 4</b>	Representação esquemática das etapas sequenciais envolvidas na execução do ensaio de Opacidade e Permeabilidade da Córnea Bovina segundo as orientações da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (OECD TG 437/2017)	35
<b>Figura 4</b>	Cortes transversais realizados na região central da córnea para obtenção da porção central da qual realizou-se o processamento para obtenção dos cortes histológicos.	36
<b>Figura 5</b>	Representação esquemática das etapas sequenciais da análise da profundidade da lesão nas córneas por meio da permeação de fluoresceína.	42

## QUADROS

---

	<b>Título</b>	<b>Página</b>
<b>Quadro 1</b>	Critérios para a classificação toxicológica de praguicidas segundo a Portaria SNVS/MS nº 3 de 16 de janeiro de 1992	4
<b>Quadro 2</b>	Métodos alternativos reconhecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal e seus respectivos desfechos pela Resolução Normativa nº 18 de 24 de setembro de 2014.	6
<b>Quadro 3</b>	Métodos alternativos reconhecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal e seus respectivos desfechos através da Resolução Normativa nº 31 de 18 de agosto de 2016.	6
<b>Quadro 4</b>	Visão geral dos critérios de classificação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária e Sistema Globalmente Harmonizado para Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos das Nações Unidas para irritação ocular de produtos químicos e misturas	13
<b>Quadro 5</b>	Formulações agrotóxicas selecionados para o estudo de irritação ocular comercializados no Brasil e registrados na Agência Nacional de Vigilância Sanitária	28
<b>Quadro 6</b>	Modelo de predição para irritação ocular de substâncias químicas e misturas de acordo com a viabilidade celular proposto pelo método de Exposição de Curta Duração.	32
<b>Quadro 7</b>	Modelo de predição para irritação ocular de substâncias químicas e misturas de acordo com o <i>in vitro score</i> (IVIS) proposto pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (OECD TG 437/2017).	34
<b>Quadro 8</b>	Esquema de pontuação do teste da Membrana Corioalantóide do Ovo de Galina Embrionado para classificar o perfil de irritação ocular	40
<b>Quadro 7</b>	Substâncias utilizadas no refinamento do ensaio Opacidade e Permeabilidade da Córnea Bovina para averiguação da profundidade de dano à córnea por meio da permeação de fluoresceína	41

## SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

---

<b>Símbolo, sigla ou abreviatura</b>	<b>Significado</b>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BraCVAM	Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos
BCOP	<i>Bovine Cornea Opacity and Permeability</i>
CAAT	<i>Center for Alternatives to Animal Testing</i>
CAM	<i>Chorion-Allantoic Membrane</i>
C&L	Categorização e Rotulagem
CL50	Concentração letal média necessária para levar ao óbito 50% da população de estudo que inalou a substância teste
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DL50	Dose necessária para levar ao óbito 50% da população de estudo exposta à substância teste
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
ECD	Exposição de curta duração
ECETOC	European Center for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals
ECVAM	<i>European Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
FDA	<i>Food and Drug and Administration</i>
FAPEG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás
HE	Hematoxilina e Eosina
HET-CAM	<i>Hen egg Chorion-allantoic Membrane test</i>
IATA	<i>Integrated Approach on Testing and Assessment</i>

IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ICCVAM	<i>Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods</i>
JACVAM	<i>Japanese Center for the Validation of Alternative Methods</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MCOGE	Membrana corioalantóide do ovo de galinha embrionado
MEM	Meio Essencial Mínimo
MTT	<i>Brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio</i>
OECD	<i>Organization for Economic Co-operation and Development</i>
OPCB	Opacidade e permeabilidade da córnea bovina
PIB	Produto Interno Bruto
PL	Projeto de Lei
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RN	Resolução Normativa
RPM	Rotações por minuto
SFB	Soro Fetal Bovino
SGH NU	Sistema Globalmente Harmonizado das Nações Unidas
SIRC	<i>Statens Seruminstitut Rabbit Cornea</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SNVS/MS	Sistema Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil/Ministério da Saúde
ToxIn	Laboratório de Educação e Pesquisa em Toxicologia <i>in vitro</i>
UFG	Universidade Federal de Goiás
UN GHS	<i>United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals</i>

---

**Estratégia associando métodos substitutivos à experimentação animal para avaliação da toxicidade ocular, categorização e rotulagem de formulações agrotóxicas comercializadas no Brasil**

---

**Introdução:** Diferentes estratégias para categorização e rotulagem (C&L) de ingredientes e produtos acabados tem sido considerada pelas Agências Reguladoras. A falta de harmonização global para C&L é o principal problema para a implementação de métodos substitutivos para agrotóxicos. Porém, métodos *in vitro* e *ex vivo* são adotados com sucesso para avaliar o potencial de toxicidade de produtos químicos. O teste padrão de Opacidade e Permeabilidade da Córnea Bovina (BCOP) fornece informações parciais sobre a córnea, por isso, a análise histomorfológica tem sido recomendada como um parâmetro adicional para melhor categorizar os produtos irritantes oculares. **Objetivo:** Sugerir uma plataforma, associando métodos *in vitro* e *ex vivo*, baseada em parâmetros mecânicos de avaliação da toxicidade ocular para C&L de formulações agrotóxicas comercializadas no Brasil. Bem como, mensurar a profundidade da lesão na córnea bovina induzida por substâncias irritantes para os olhos e associá-la à severidade do dano. **Material e Métodos:** Para a plataforma, foram selecionados 86 formulações agrotóxicas de diferentes categorias de toxicidade ocular no sistema de categorização da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Primeiramente, o potencial de toxicidade ocular foi avaliado através do desfecho citotoxicidade utilizando o teste de Exposição de Curta Duração (STE). No segundo passo, as amostras não classificadas e àquelas classificadas como não irritantes pelo STE, foram avaliadas pelos desfechos de opacidade, permeabilidade e alterações histopatológicas da córnea, através do teste BCOP. O terceiro passo foi avaliar o potencial de indução de dano vascular por meio dos desfechos de coagulação e hemorragia utilizando o teste da Membrana Corioalantóide do Ovo de Galina Embrionado (HET-CAM). Para a proficiência, foram selecionadas 12 substâncias pertencentes às categorias GHS UN (Categoria 1, 2A e 2B). O ensaio de BCOP foi realizado para determinação do índice de irritação *in vitro* (IVIS). Após o ensaio de permeabilidade com fluoresceína, as córneas utilizadas foram seccionadas em criostato, coradas com Hoechst 33342 e analisadas por microscopia de fluorescência. Cinco medidas de profundidade de permeação de fluoresceína foram obtidas em relação à espessura total do epitélio. **Resultados e Discussão:** Pela plataforma após o teste STE, 68 formulações agrotóxicas apresentaram-se altamente citotóxicas e foram categorizadas como Categoria 1 pelo GHS UN; 13 não classificado e 5 não irritante. Estas 18 formulações de agrotóxicos foram avaliadas no segundo nível da plataforma pelo teste BCOP seguido de análise histopatológica, e o perfil de irritação dessas formulações agrotóxicas foi confirmado pelo ensaio HET-CAM. Sendo assim, 7 apresentaram opacidade, dano à córnea na porção epitelial e no estroma, coagulação e hemorragia, e por isso foram categorizados na Categoria 2 A do GHS UN. 11 causaram apenas coagulação e hemorragia e foram categorizadas na Categoria 2 B do GHS UN. Na proficiência, a profundidade de permeação da fluoresceína foi diretamente proporcional ao grau de irritação das substâncias testadas. **Conclusão:** Uma vez que a Categorização e Rotulagem de formulações agrotóxicas no Brasil não se baseia no GHS UN, esta plataforma de nível, pode ser útil para harmonizar a categorização de agrotóxicos, fornecendo subsídios regulatórios para a ANVISA. Bem como, o refinamento do BCOP pela análise da profundidade da lesão pela permeação epitelial da fluoresceína pode ser um parâmetro quantitativo útil para melhor categorizar os irritantes oculares.

**Palavras-Chave:** Agrotóxicos; Métodos alternativos à experimentação animal; Irritação Ocular; Teste de Draize; Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

**Agradecimentos:** ToxIn, Faculdade de Farmácia, UFG, CAPES, CNPq e FAPEG.

---

---

**Strategy associating substitutive methods with animal experimentation to evaluate ocular toxicity, categorization and labeling of agrochemical formulations marketed in Brazil**

**Introduction:** Different strategies for categorization and labeling (C & L) of ingredients and finished products have been considered by the Regulatory Agencies. Regarding agrochemical formulations, the lack of global harmonization for C & L is the main problem for the implementation of substitute methods. On the other hand, *in vitro* and *ex vivo* methods are successfully adopted to assess the potential toxicity of chemicals. The standard Bovine Cornea Opacity and Permeability (BCOP) test provides information on permeability and opacity, but histomorphometric analysis of the cornea has been recommended as an additional parameter to better categorize irritant products for the eyes. **Objective:** To suggest a platform, associating *in vitro* and *ex vivo* methods, based on mechanistic parameters of ocular toxicity evaluation for C & L of agrochemical formulations commercialized in Brazil. As well as measuring the depth of bovine corneal injury induced by eye irritants from all categories of the United Nations Globally Harmonized System for Classification and Labeling of Chemicals (UN GHS) and associating it with the severity of the damage. **Material and Methods:** For the platform, 86 agrochemical formulations of different categories of ocular toxicity were selected in the categorization system of the National Agency of Sanitary Surveillance (ANVISA). First, the potential for ocular toxicity was assessed through the cytotoxicity endpoint using the Short Time Exposure (STE) test. In the second step, the non-classified samples and those classified as non-irritating by the STE were evaluated for the opacity, permeability and histopathological changes of the cornea through the BCOP test. The third step was to evaluate the potential for induction of vascular damage through coagulation and hemorrhage outcomes using the Hen egg Chorion-allantoic Membrane test (HET-CAM). For proficiency, 12 substances belonging to the categories UN GHS (Category 1, 2A and 2B) were selected. The BCOP assay was performed to determine the *in vitro* irritation index (IVIS). After the fluorescein permeability assay, the corneas used were sectioned in a 5 µm thick cryostat, stained with Hoechst 33342 and analyzed by fluorescence microscopy. Five measurements of depth of permeation of fluorescein were obtained in relation to the total thickness of the epithelium. **Results and Discussion:** From the platform, of the 86 formulations of agrochemicals, after the STE test, 68 were highly cytotoxic and were categorized as Category 1 by UN GHS; 13 not classified and 5 non-irritating. These 18 agrochemical formulations were evaluated at the second level of the platform by the BCOP test followed by histopathological analysis, and the irritation profile of these agrochemical formulations was confirmed by the HET-CAM assay. Thus, 7 presented opacity, damage to the cornea in the epithelial portion and in the stroma, coagulation and hemorrhage, and therefore were categorized in Category 2 A of the UN GHS. 11 caused only coagulation and hemorrhage and were categorized into Category 2 B of the UN GHS. In the proficiency, the results showed that the permeation depth of fluorescein was directly proportional to the degree of irritation of the substances tested. **Conclusion:** Since C&L of agrochemical formulations in Brazil is not based on the UN GHS, this tier platform could be useful to harmonize the categorization of agrochemical formulations in Brazil, providing regulatory subsidies for ANVISA. As well as, refinement of BCOP by analysis of lesion depth through epithelial permeation of fluorescein can be considered a useful quantitative parameter to better categorize eye irritants. **Key-words:** Agrochemical; Alternative methods to animal experimentation; Eye Irritation; Draize test; National Health Surveillance Agency **Acknowledgement:** Toxin, Faculty of Pharmacy, UFG, CAPES, CNPq and FAPEG.

## 1.1 Formulações agrotóxicas no Brasil e seus aspectos legais

A partir de 1970, o governo brasileiro adotou como política agrícola de modernização no campo, a prática da monocultura e o uso acentuado de formulações agrotóxicas. Tal cenário foi incentivado por isenções fiscais fornecidas às indústrias agrotóxicas, e desde então, observa-se um crescente aumento na quantidade de formulações comercializadas no Brasil, bem como nos hectares de área plantada no país (ALMEIDA, et al., 2017).

O setor agropecuário influencia de forma importante o Produto Interno Bruto (PIB) nacional. Em 2010, o país foi o terceiro maior exportador de produtos agrícolas do mundo, atrás apenas dos Estados Unidos e da União Europeia, e à frente do Canadá, Austrália e China (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2017). Em 2016, as exportações do agronegócio totalizaram aproximadamente US\$ 80 bilhões, sendo os cultivos de soja, cana-de-açúcar e milho as principais monoculturas do país (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2017). Somente a soja, a qual ocupa mais de 30 milhões de hectares de solo brasileiro, deteve o destino de mais da metade do volume de agrotóxico comercializado no país (BOMBARDI, 2017).

Nos últimos anos, o aumento no consumo de agrotóxicos é uma realidade mundial. Porém, no Brasil, entre os anos de 2000 a 2010, houve um aumento acentuado no consumo de agrotóxicos sem aumentar os hectares de área plantada. Este perfil permaneceu até o ano de 2014, correspondendo a um consumo de 500 mil toneladas de ingrediente ativo e afins por área plantada (PALAEZ et al., 2015; BOMBARDI, 2017).

Entre os anos de 2012 a 2014, o Brasil apresentou um consumo usual médio de 8,33 Kg por hectare de agrotóxicos, havendo variações regionais especialmente nos estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, São Paulo e Goiás, os quais apresentaram média de uso entre 12 a 14 Kg por hectare (BOMBARDI, 2017). O agrotóxico mais consumido foi o glifosato e seus sais, equivalente a 173.150.75 toneladas de ingrediente ativo comercializado no país apenas no ano de 2015 (IBAMA, 2017). De forma relevante, tal ingrediente ativo é líder de consumo no país. Existem inúmeras formulações agrotóxicas no país contendo este ativo (IBAMA, 2017).

Esses aspectos, dentre outros de relevância social e econômica, ilustram a importância da avaliação da toxicidade das formulações agrotóxicas no país para que possam ser comercializados (ALMEIDA et al., 2017).

A Lei nº 7.802/1989, regulamentada pelo Decreto nº 4.074/2002 e conhecida por “Lei dos Agrotóxicos”, fornece as bases legais relacionadas às formulações agrotóxicas no Brasil. Essa normativa, além de conceituar tais substâncias, também contempla os critérios para realização dos registros no órgão Regulador Federal, envolvendo fatores ambientais, de saúde pública e de desempenho agrônomo (BRASIL, LEI Nº 7.802, 1989; ALMEIDA et al., 2017).

Para os efeitos desta Lei, consideram-se agrotóxicos e afins:

Os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e

inibidores de crescimento (BRASIL, LEI Nº 7.802, 1989, BRASIL, DECRETO Nº 4.074, 2002 ).

Neste contexto, para que uma nova formulação agrotóxica possa ser comercializada é necessário realizar a investigação da eficiência agronômica do produto formulado agrotóxico, bem como da periculosidade da formulação ao meio ambiente e à saúde humana. No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) compreendem, respectivamente, os órgãos responsáveis por analisar o pleito de registro das formulações agrotóxicas.

Tendo como base legal e suas regulamentações a lei nº 7.802 (1989), a Portaria SNVS/MS nº 3 de 16 de janeiro de 1992, estabeleceu as diretrizes e exigências do Ministério da Saúde as quais os agrotóxicos devem obedecer para obtenção de registro, renovação de registro e extensões de uso. Quanto aos critérios para categorização toxicológica, é estabelecida a possibilidade de classificação em quatro classes toxicológicas definidas pela DL50 dos produtos, dados relacionados a danos na córnea, lesões na pele, concentração letal inalatória para ratos (CL50) e genotoxicidade. A caracterização final do produto após a avaliação dos desfechos acima é definida pela observância do evento de maior toxicidade (gravidade). Sendo assim, as classificações variam em extremamente tóxico (classe I), altamente tóxico (classe II), medianamente tóxico (classe III) ou pouco tóxico (classe IV) (**Quadro 1**) (BRASIL, PORTARIA SNVS Nº 3, 1992; RIOS, 2014).

**Quadro 1:** Critérios para a classificação toxicológica de praguicidas segundo a Portaria SNVS/MS nº 3 de 16 de janeiro de 1992

Classificação Toxicológica	DL50 oral (mg/Kg)		DL50 dérmica (mg/Kg)		CL50 inalatória (mg/L ar 1h de exposição)			Irritação Dérmica	Irritação Ocular
	sólido	líquido	sólido	líquido	Gás (ppm)	vapor	aerossol		
<b>Classe I</b>	≤ 5	≤ 20	≤ 10	≤ 40	≤ 0,2			Ulceração ou Corrosão	Opacidade da córnea reversível ou não dentro de 7 dias ou irritação persistente nas mucosas oculares
<b>Classe II</b>	> 5 ≤ 20	> 20 ≤ 200	> 10 ≤ 100	> 40 ≤ 400	> 0,2 ≤ 2			Irritação severa (score 5 segundos)	Sem opacidade da córnea e com irritação reversível das mucosas oculares dentro de 7 dias
<b>Classe III</b>	> 50 ≤ 500	> 200 ≤ 2000	> 100 ≤ 1000	> 400 ≤ 4000	> 2 ≤ 20			Irritação moderada (score 3 a 5 segundos)	Sem opacidade da córnea e com irritação reversível das mucosas oculares dentro de 72 h
<b>Classe IV</b>	> 500	> 2000	> 1000	> 4000	> 20			Irritação leve (score < 3)	Sem opacidade da córnea e com irritação leve e reversível das mucosas oculares dentro de 24 h

Legenda: DL50: dose necessária para levar ao óbito 50% da população de estudo exposta à substância teste. CL50: concentração letal média necessária para levar ao óbito 50% da população de estudo que inalou a substância teste. Classe I: Extremamente tóxico; Classe II: Altamente tóxico; Classe III: Medianamente tóxico; Classe IV: Pouco tóxico.

Fonte: Adaptado da Portaria SNVS/MS nº 3 de 16 de janeiro de 1992.

Os testes toxicológicos agudos dimensionam o potencial de periculosidade de uma formulação agrotóxica, permitindo estabelecer uma classificação quanto ao risco de exposição. As informações geradas a partir dos testes toxicológicos são avaliadas e, então, divulgadas para o público (comunicação do perigo) com o intuito de informar e proteger a população dos efeitos nocivos desse novo produto (BRASIL, PORTARIA SNVS Nº 3, 1992; RIOS, 2014).

Para a ANVISA, conforme mencionado anteriormente, o dossiê toxicológico de um produto formulado agrotóxico para fins de registro, categorização, rotulagem e comunicação do perigo ao homem, deve atender às diretrizes determinadas pela Portaria SNVS/MS nº 3 (1992), e para isto, o dossiê deve conter oito testes toxicológicos agudos: DL50 oral e dérmica; CL50 inalatória; irritação e corrosão dérmica e ocular; sensibilização dérmica; teste de AMES e Micronúcleo (**Quadro 1**). Todos estes testes são realizados em animais (BRASIL, PORTARIA SNVS Nº 3, 1992).

Dentre os oito testes toxicológicos agudos, o teste de Draize, realizado em olhos de coelhos vivos, refere-se ao ensaio de irritação e corrosão ocular considerado padrão ouro desde o seu desenvolvimento na década de 30. Este ensaio ainda é preconizado pela ANVISA para avaliar o perigo de um produto formulado agrotóxico aos olhos humanos, embora a aceitação dos métodos não animias esteja em discussão.

O Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), por meio das Resoluções Normativas (RN) nº 18 de 24 de setembro de 2014 e nº 31 de agosto de 2016 reconhece o uso no país de métodos alternativos validados por centros internacionais de validação que tenham por finalidade a redução, a substituição ou o refinamento do uso de animais em atividades de pesquisa. Pela RN nº 18 (2014), o CONCEA reconhece dezessete métodos alternativos agrupados em sete desfechos distintos (Irritação e corrosão dérmica; irritação e corrosão ocular; fototoxicidade; absorção cutânea; sensibilização cutânea; toxicidade aguda e genotoxicidade); (**Quadro 2**) e pela RN 31 (2016) o CONCEA reconhece mais sete métodos alternativos agrupados em quatro desfechos distintos (irritação e corrosão ocular; sensibilização cutânea; toxicidade reprodutiva e avaliação da contaminação pirogênica em produtos injetáveis) (**Quadro 3**) . Após 5 anos da publicação dessas Resoluções normativas, haverá a substituição obrigatória do método original (animal) pelo método alternativo, e a ANVISA reconhece esta decisão.

Ou seja, a partir de 2019, para fins de registro e renovação do mesmo, a ANVISA irá exigir e reconhecer no dossiê toxicológico dos produtos a utilização de metodologias alternativas recomendadas pelas normativas do CONCEA. Tal situação trará uma perspectiva diferenciada com relação à maneira de determinar o perfil toxicológico de um produto, ou seja, a determinação será baseada em diferentes desfechos (*endpoints*) observados pelas diferentes metodologias alternativas utilizadas de forma integrada.

**Quadro 2** – Métodos alternativos reconhecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal e seus respectivos desfechos através da Resolução Normativa nº 18 de 24 de setembro de 2014.

<b>Desfecho</b>	<b>Método alternativo reconhecido</b>
Para avaliação do potencial de irritação e corrosão da pele	Método OECD TG 430 - Corrosão dérmica <i>in vitro</i> : Teste de Resistência Elétrica Transcutânea;
	Método OECD TG 431 - Corrosão dérmica <i>in vitro</i> : Teste da Epiderme Humana Reconstituída
	Método OECD TG 435 - Teste de Barreira de Membrana <i>in vitro</i>
	Método OECD TG 439 - Teste de irritação Cutânea <i>in vitro</i>
Para avaliação do potencial de irritação e corrosão ocular	Método OECD TG 437 - Teste de Permeabilidade e Opacidade de Córnea Bovina
	Método OECD TG 438 - Teste de Olho Isolado de Galinha
	Método OECD TG 460 - Teste de Permeação de Fluoresceína
Para avaliação do potencial de Fototoxicidade	Método OECD TG 432 - Teste de Fototoxicidade <i>in vitro</i> 3T3 NRU
Para avaliação da absorção cutânea	Método OECD TG 428 - Absorção Cutânea método <i>in vitro</i>
Para avaliação do potencial de sensibilização cutânea	Método OECD TG 429 - Sensibilização Cutânea: Ensaio do Linfonodo Local
	Método OECD TG 442A e 442B - Versões não radioativas do Ensaio do Linfonodo Local
Para avaliação de toxicidade aguda	Método OECD TG 420 - Toxicidade Aguda Oral – Procedimento de Doses Fixas
	Método OECD TG 423 - Toxicidade Aguda Oral – Classe Tóxica Aguda
	Método OECD TG 425 - Toxicidade Aguda Oral – procedimento "Up and Down"
	do OECD TG 129 - estimativa da dose inicial para teste de toxicidade aguda oral sistêmica
Para avaliação de genotoxicidade	Método OECD TG 487 - Teste do Micronúcleo em Célula de Mamífero <i>in vitro</i>

**Quadro 3** – Métodos alternativos reconhecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal e seus respectivos desfechos através da Resolução Normativa nº 31 de agosto de 2016.

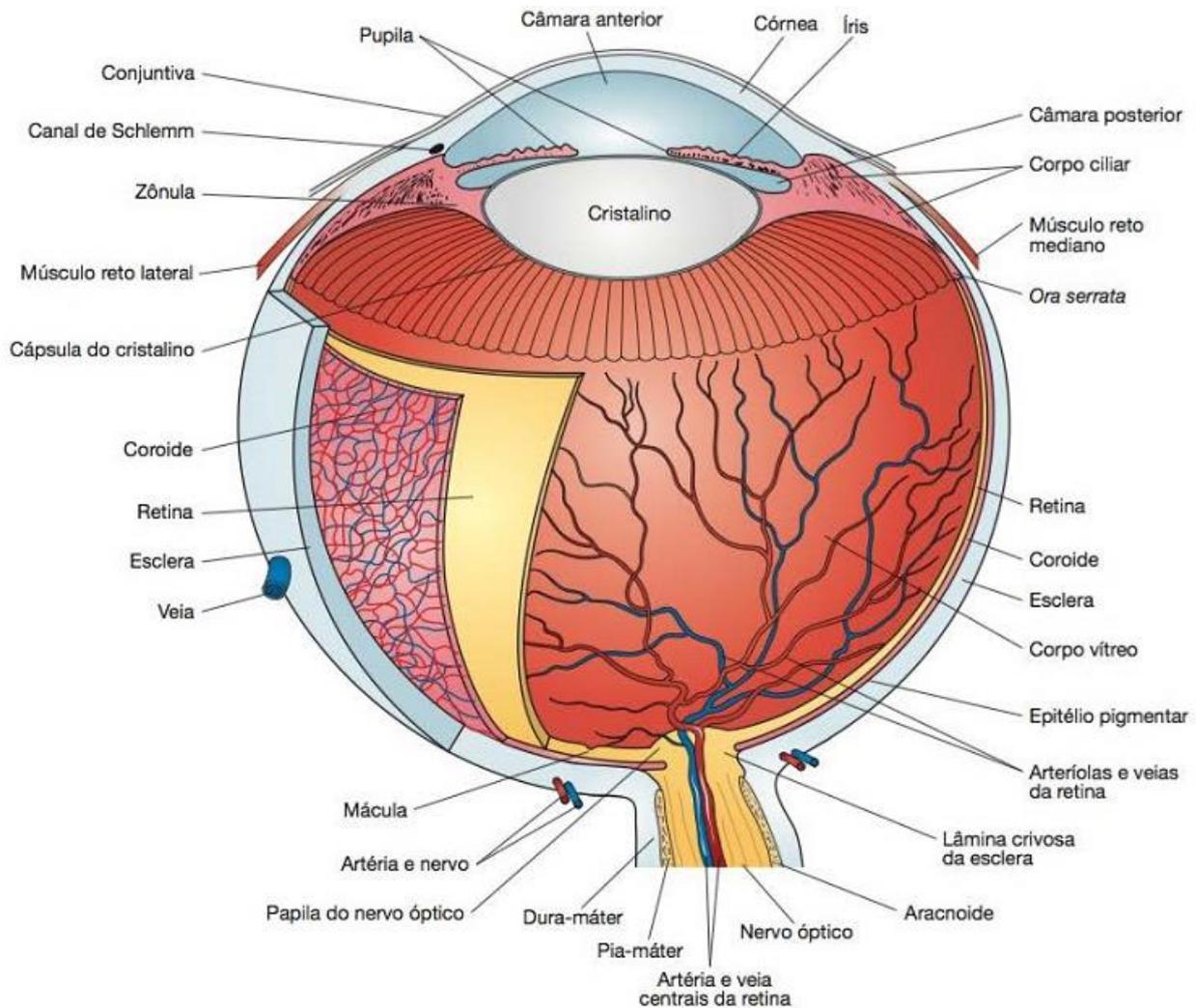
<b>Desfecho</b>	<b>Método alternativo reconhecido</b>
Para avaliação do potencial de irritação e corrosão ocular	Método OECD TG 491 - Teste <i>in vitro</i> de curta duração para danos oculares
	Método OECD TG 492 - Epitélio corneal humano reconstruído
Para avaliação do potencial de sensibilização cutânea	Método OECD TG 442C - Sensibilização cutânea <i>in vitro</i>
	Método OECD TG 442D - Sensibilização cutânea <i>in vitro</i>
Para avaliação de toxicidade reprodutiva	Método OECD TG 421 - Teste de triagem para toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento
	Método OECD TG 422 - Estudo de toxicidade repetida combinado com teste de toxicidade reprodutiva
Para avaliação da contaminação pirogênica em produtos injetáveis	Teste de Endotoxina Bacteriana (Farmacopeia Brasileira)

## 1.2 Toxicidade ocular

### 1.2.1 Estrutura ocular

O globo ocular é um órgão sensorial que funciona como uma câmara, pois capta a luz do ambiente, a lente (cristalino) a focaliza na retina gerando impulsos nervosos os quais são conduzidos ao Sistema Nervoso Central (SNC) para serem convertidos em impulsos neurais e, assim, gerarem as imagens visuais. É composto por três camadas principais, sendo que cada camada é constituída de outros componentes: a camada mais externa formada pela córnea e a esclera, a camada mediana chamada de vascular ou túnica média formada pela íris e corpo vascular, e a camada mais interna, a qual comunica com o nervo óptico, formada pela retina. Abaixo da córnea localiza-se uma lente biconvexa transparente (o cristalino) a qual é envolta pela íris. Entre a córnea e o cristalino há a presença do humor aquoso o qual promove a nutrição das estruturas avasculares da região anterior do olho. O corpo vítreo, composto basicamente por ácido hialurônico e água, preenche a cavidade ocular interna (**Figura 1**) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

**Figura 1** – Esquema da estrutura ocular e seus componentes.



Fonte: JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013.

A íris, por ser uma estrutura músculo-fibrosa, promove a regulação do diâmetro da pupila de acordo com o comando oriundo do SNC, evita a entrada excessiva de luz, bem como fornece a cor dos olhos por possuir uma camada de melanócitos produtores de melanina (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A conjuntiva é uma estrutura acessória que recobre a parte externa do olho, responsável pela manutenção da umidade na superfície ocular e nutrição. Por ser rica em vasos sanguíneos, é um elemento importante durante a resposta inflamatória de processos

patológicos ou à agentes irritantes (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; FUKUDA; FUKUSHIMA, 2017).

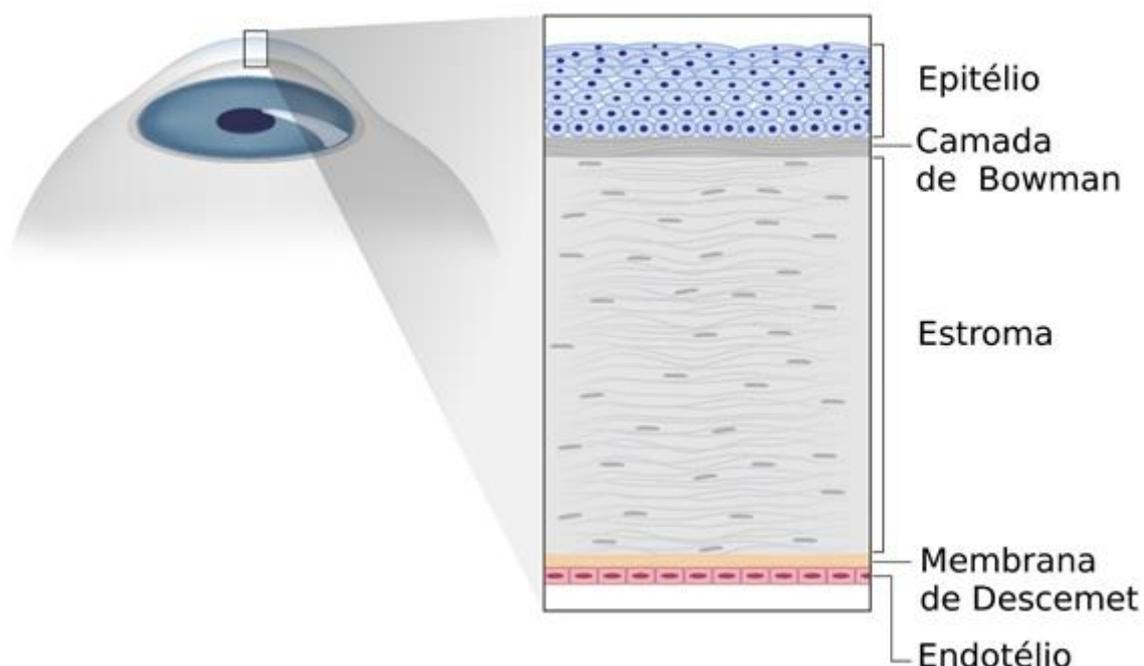
Dentre todos os constituintes oculares, a córnea (ou túnica fibrosa) é o componente mais estudado para avaliar as alterações patológicas ocorridas durante uma injúria, pois o componente que separa o ambiente externo do interior ocular. Apresenta-se transparente, avascular e é composta por 5 regiões: epitélio anterior, membrana de Bowman, estroma, membrana de Descemet e epitélio posterior ou endotélio (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; EGHRARI, RIAZUDDIN, GOTTSCH, 2015).

A região epitelial anterior é composta por células não queratinizadas, estratificadas e pavimentosas, sendo a parte superficial composta por células pavimentosas mais achatadas, a região intermediária (*wing cell*) composta por 2 a 3 camadas e a parte basal (inserida na lâmina basal) composta por células com alta capacidade regenerativa (pois a cada 7 dias todas as células do epitélio anterior são renovadas). A membrana de Bowman, logo abaixo da camada basal, é constituída por delgadas fibras colágenas (Tipo IV) cruzadas em todas as direções, formando uma camada homogênea e relativamente espessa (7 a 12  $\mu\text{m}$ ), que garante resistência a córnea. O estroma é constituído por fibroblastos e inúmeras camadas paralelas de fibras colágenas (Tipo I e V) firmemente unidas. A membrana de Descemet é uma estrutura tridimensional constituída de fibrilas colágenas (Tipo VIII), com 5 a 10  $\mu\text{m}$  de espessura e situada entre o estroma e o endotélio. O epitélio posterior é do tipo pavimentoso simples (uma camada celular) e responsável por manter o equilíbrio hídrico e a nutrição da córnea (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; EGHRARI, RIAZUDDIN, GOTTSCH, 2015; LOTZ et al., 2016) .

Considerando a estrutura morfológica do epitélio corneano, espera-se que a toxicidade ocular das substâncias corresponda aos danos induzidos em diferentes estratos epiteliais (Ashby, Garret e Willcox, 2014; Dua, Gomes e Singh, 1994) (**Figura 2**). Ou seja,

sabendo da relação existente entre a profundidade da lesão na córnea e a gravidade do dano, a análise da profundidade de permeação também pode ser usada para distinguir entre dano ocular e irritação (ADRIAENS et al., 2014; Furuka, et al, 2015; Furukava 2017).

**Figura 2** – Esquema da estrutura morfológica da córnea.



Fonte: Estrutura da córnea. Ilustração: Alila Medical Media / Shutterstock.com

### 1.2.2 Reações adversas oculares

Em geral, os mecanismos de injúria ocular (danos ou irritação) compreendem citotoxicidade em células epiteliais e do estroma, saponificação de fosfolípidos de membrana e precipitação proteica, assim como instauração de processo inflamatório e eventos vasculares na conjuntiva. Além do mecanismo da lesão, a profundidade do dano induzido na córnea pode se correlacionar com a gravidade da resposta tóxica ocular. Sendo assim, o potencial de toxicidade ocular de produtos químicos ou misturas pode ser verificado por meio da avaliação das injúrias nos diferentes componentes da córnea e a localização (GRANT, 1974; MAURER et al., 2001; MAURER, PARKER AND JESTER, 2002).

Sob esse aspecto, as consequências danosas às estruturas do olho, sobretudo à córnea, podem ser diferentes de acordo com a natureza química do toxicante. Por exemplo, as substâncias alcalinas provocam saponificação de fosfolípidos de membrana com consequente ruptura da mesma, as substâncias ácidas ocasionam coagulação e precipitação proteica, produtos oxidantes induzem a lise das células epiteliais, os surfactantes (iônicos e não-iônicos) promovem precipitação de proteínas e, às vezes, lise celular, e os solventes orgânicos provocam descamação parcial ou total das células epiteliais sem interferir no estroma (GRANT, 1974; MAURER et al., 2001; MAURER, PARKER AND JESTER, 2002; ESKES, 2005).

Um estudo recente do nosso grupo de pesquisa mostrou um mecanismo para avaliação da toxicidade ocular utilizando as ferramentas citometria de fluxo e ELISA para avaliar o perfil de citocinas inflamatórias produzidas por queratinócitos humanos após exposição à substâncias químicas com diferentes classificações de toxicidade ocular. Com este estudo, foi obtida uma correlação entre parâmetros inflamatórios e toxicidade ocular (dano / irritação), uma vez observado que as concentrações intracelulares de IL-1 $\beta$  aumentaram nas células expostas às substâncias de maior perfil tóxico ocular, enquanto as substâncias não irritantes não induziram este aumento. Sendo assim, a medição dessa interleucina pode ser considerada um biomarcador importante para identificar o potencial de toxicidade ocular de produtos químicos, diferenciando do potencial de irritação (SILVA et al., 2018).

### 1.2.3 Avaliação in vivo do potencial de irritação ocular de substâncias químicas e misturas

As substâncias ou misturas com capacidade de causarem injúrias reversíveis a uma ou mais das estruturas oculares – córnea, conjuntiva e íris – são caracterizadas como irritantes; e àquelas substâncias ou misturas capazes de provocar alterações irreversíveis

são consideradas corrosivas de acordo com o Guia Teste nº 405 da OCDE (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico) (2017), que dispõe sobre o teste *in vivo* de irritação/corrosão ocular aguda (OECD, 2017b).

Em 1944, John Draize, um estudioso farmacologista e toxicologista, publicou um trabalho sobre a avaliação do potencial de irritação e corrosão dérmica e de Membranas mucosas. Em 1964, a Administração de Alimentos e Medicamentos (*Food and Drug and Administration - FDA*) adotou tal estudo como protocolo padrão para a investigação de tais parâmetros, e o método passou a ser denominado teste de Draize. Desde então, obteve aceitação internacional com a publicação do Guia Teste nº 405 da OECD (1981), sendo o método de escolha para análises toxicológicas oculares e dérmicas, amplamente utilizado para cosméticos, medicamentos, agroquímicos, produtos de limpeza, entre outros (WILHELMUS, 2001).

Neste modelo, inicialmente é administrado analgésicos e anti-inflamatórios nos animais utilizados, e posteriormente, 0,1 mL ou 0,1 g da substância-teste é administrada no saco conjuntival de um dos olhos de coelhos albinos, permanecendo em contato por até 24 horas. Em seguida são feitas avaliações (uma hora após a exposição e diariamente durante 21 dias) atribuindo numericamente o grau de lesão à córnea (opacidade, ulcerações), à íris (edema, hemorragia) e à conjuntiva (hiperemia, hemorragia, eventos vasculares). As pontuações oferecidas a cada lesão permitem a determinação da pontuação e, conseqüentemente, a classificação da substância (DRAIZE; WOODARD; CALVERY, 1944; OECD, 2017b).

A classificação toxicológica ocular das substâncias é realizada de acordo com sistemas distintos adotados pelos diferentes países. O esquema de classificação de toxicidade ocular da ANVISA é diferente dos demais sistemas, em especial ao esquema do Sistema Globalmente Harmonizado das Nações Unidas (*United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals – UN GHS*).

O esquema UN GHS utiliza uma única categoria de perigo harmonizada (Categoria 1) para as substâncias que causam danos oculares graves (irreversíveis dentro de 21 dias), e outra categoria (Categoria 2, reversível) com a possibilidade de subcategorização (2A: injúrias reversíveis dentro de 21 dias; ou 2B: injúrias reversíveis dentro de 7 dias), dependendo do tempo para reverter os efeitos irritantes. As substâncias não irritantes são denominadas como Não Categorizadas, de acordo com esse sistema. Além disso, são pontuadas em diferentes escalas numéricas os eventos relacionados a opacidade, irite, vermelhidão conjuntival e quimose (inchaço da conjuntiva) **(Quadro 4)** (WILSON; AHEARNE; HOPKINSON, 2015).

**Quadro 4** - Visão geral dos critérios de classificação da ANVISA e UN GHS para irritação ocular de produtos químicos e misturas

	<b>Classe toxicológica I</b>	<b>Classe toxicológica II</b>	<b>Classe toxicológica III</b>	<b>Classe toxicológica IV</b>
<b>Brasil ANVISA</b>	<b>Opacidade da córnea reversível ou não em 7 dias ou irritação persistente na mucosa ocular</b>	Sem opacidade da cornea e com irritação reversível da mucosa ocular em <b>7 dias</b>	Sem opacidade da cornea e com irritação reversível da mucosa ocular em <b>72 horas</b>	Sem opacidade da cornea e com irritação reversível da mucosa ocular em <b>24 horas</b>
<b>UN GHS</b>	<b>Categoria 1</b> <b>Opacidade da córnea</b> ( $\geq 3$ ), ou irite ( $> 1.5$ ) ou irritação persistente por <b>21 dias</b> . Dano irreversível na córnea, iris ou conjuntiva	<b>Categoria 2 A</b> <b>Opacidade da córnea</b> ( $\geq 1$ ) ou irite ( $\geq 1$ ) ou vermelhidão conjuntival ( $\geq 2$ ) ou quemose ( $\geq 2$ ) reversível em <b>21 dias</b>	<b>Categoria 2 B</b> <b>Opacidade da córnea</b> ( $\geq 1$ ) ou irite ( $\geq 1$ ) ou vermelhidão conjuntival ( $\geq 2$ ) ou quemose ( $\geq 2$ ) reversível em <b>7 dias</b>	<b>Sem Categoria</b> Efeitos mínimos

**Fonte:** Adaptado da Portaria SNVS/MS nº 3 de 16 de janeiro de 1992 e Test Guideline N.405 da OECD (*Organization for Economic Cooperation and Development*) (2017).

Os critérios brasileiros para classificação de toxicidade ocular compreendem quatro classes, dependendo da injúria (dano ou irritação) produzida no olho: Classe I, II, III e IV (BRASIL, PORTARIA SNVS Nº 3, 1992). Sendo assim, as formulações agrotóxicas comercializadas no Brasil são atribuídas à Toxicidade Classe I (extremamente tóxico)

quando causam opacidade reversível ou não em 7 dias ou irritação persistente, e Toxicidade nas Classes II, III ou IV quando não há opacidade e há reversibilidade da irritação dependendo do tempo, 7 dias, 72 horas e 24 horas, respectivamente. No esquema da ANVISA, a opacidade e a irite não são medidas quantitativamente, ou seja, uma vez observada a opacidade, a substância é considerada causadora de dano ocular grave **(Quadro 4)** (BRASIL, PORTARIA SNVS Nº 3, 1992; KOLLE et al., 2015).

Apesar da sua aceitação internacional e aplicabilidade, o teste de Draize é frequentemente criticado pela comunidade científica especialmente sob os aspectos éticos e sua baixa capacidade preditiva (ADRIAENS et al. 2014). As principais limitações estão relacionadas à sua natureza subjetiva e demorada, falta de repetibilidade, utilização de doses elevadas, resultados variáveis e com relevância insuficiente para distinguir a aplicabilidade/toxicidade ocular de produtos químicos, e por, muitas vezes, fornecer previsões super-estimadas de respostas humanas principalmente devido as diferenças anatomofisiológicas dos olhos entre as duas espécies (MAURER et al. 2002; PRINSEN, 2006; SCOTT et al., 2010; ADRIAENS et al., 2014; WILSON; AHEARNE; HOPKINSON, 2015; BARROSO et al., 2016).

Contudo, vale a pena mencionar que os métodos *in vivo* ainda são considerados padrão-ouro, especialmente para avaliar a toxicidade ocular, mesmo o Teste de Draize (OECD 405, 2017b), o qual não foi formalmente validado e apresenta capacidade limitada para prever o potencial de toxicidade ocular para humanos (WILSON; AHEARNE; HOPKINSON, 2015).

No que tange o cenário brasileiro, o perfil de toxicidade ocular das substâncias puras (composto ativo) muitas vezes não prevalece no produto formulado (componentes ativos e inertes) pois a composição com diferentes tensoativos, por exemplo, muda o efeito da mistura, pois pode mudar sua permeabilidade. Sendo assim, é comum encontrar no mercado formulações agrotóxicas com o mesmo composto ativo, mas com toxicidade

diferente e, conseqüentemente, Categorização e Rotulagem (C&L) distintas. Ainda, a não adoção de outros métodos validados científicos e / ou regulatórios, assim como a falta de harmonização para os requisitos de testes toxicológicos são fatores limitantes para a caracterização de riscos oculares no setor agrotóxico. Além disso, a C & L dos produtos existentes foi feita usando dados de animais, o que também pode contribuir para as inconsistências encontradas na C & L de agrotóxicos (KOLLE et al., 2015).

Como exemplo de produto formulado agrotóxico registrado no MAPA e com classificações toxicológicas oculares divergentes, pode ser citada as formulações contendo o ativo glifosato, as quais totalizam-se em 106 formulações registradas e com classificações toxicológicas variando entre as quatro classes possíveis (classe I a IV) (ANVISA, 2017; AGROFIT, 2017; RIOS, 2014).

Sendo assim, é essencial que todas as esferas de governo adotem medidas, de acordo com as suas respectivas competências estabelecidas na Lei no 7.802/1989 e no Decreto no 4.074/2002 para garantir o cumprimento da legislação e, principalmente, para garantir a proteção à saúde humana, animal e ao meio ambiente. Afinal, há 504 ingredientes ativos agrotóxicos com registro autorizado no Brasil, ou seja, de uso permitido, porém, curiosamente, destes, mais de uma centena (149 – 30%) deles são proibidos na União Europeia (MAPA 2017; ANVISA 2017, BOMBARDI 2017). Portanto, é necessária uma ação mais eficaz dos órgãos que atuam nas áreas da saúde, do meio ambiente e da agricultura que são responsáveis pelo registro, avaliação e fiscalização da cadeia produtiva dos agrotóxicos no Brasil. Principalmente porque na contramão deste cenário de necessidade de maior cuidado, encontra-se um projeto de lei (PL), “a PL dos venenos” (PL 6.299, de 2002) que prevê mudanças nos critérios de aprovação, na análise de riscos e no nome que será dado aos produtos agrotóxicos.

Tal PL pretende mudar o nome dos agrotóxicos para "defensivos agrícolas" e "produtos fitossanitários", liberar licenças temporárias, e também prevê que a análise dos

produtos proíba apenas as substâncias que apresentem "risco inaceitável". Os favoráveis ao PL dizem que o processo para avaliação e liberação dos agrotóxicos é muito caro e demorado, ou seja, levam de 6 a 8 anos. Do lado contrário ao PL encontra-se Organizações Não Governamentais (ONGs) da área do meio ambiente, a ANVISA, a Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), o Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador (Ministério da Saúde), o Instituto Nacional do Câncer (INCA), o IBAMA, entre outras instituições. Eles apresentam estudos científicos e argumentam que as mudanças podem trazer riscos à saúde e ao meio ambiente.

Ainda, inserido neste contexto de limitações e necessidade de mudanças em prol da correta C & L e da saúde humana quando o objeto de estudo são formulações agrotóxicas, encontram em fase de análise as Consultas Públicas (CP) nº 260, 261 e 262/2016.

A CP nº 260/2016 refere-se a discussão sobre a elaboração de uma “proposta de Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) que dispõe sobre os critérios para a avaliação toxicológica de agrotóxicos, componentes, afins e preservativos de madeira no âmbito da Anvisa e outras providências”. Tem como objetivo principal estabelecer os procedimentos para a avaliação toxicológica para fins de registro e pós-registro de tais produtos. Expõe, como um dos principais aspectos, a proposta de apresentação e utilização de métodos alternativos para fins de avaliação toxicológica, desde que o método alternativo: possua protocolo Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) ou de outras autoridades que tenham similaridade de requisitos de validação; ter sido validado; ter sido reconhecido internacionalmente como substituto à experimentação animal ou visando a redução do uso de animais em experimentação; ter aplicação regulatória; e ter sido reconhecido no Brasil pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), nos termos da Resolução RDC nº35 de 7 de agosto de 2015 e suas atualizações (BRASIL, 2016a).

A CP nº 261/2016 discute a proposta para elaboração de uma nova Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) sobre as diretrizes relacionadas às informações toxicológicas para rótulos e bulas de agrotóxicos, afins e preservativos de madeira no âmbito da ANVISA. Tal proposta objetiva estabelecer as informações mínimas obrigatórias relativas à proteção à saúde humana que devem constar em rótulos e bulas; e a adoção das diretrizes de rotulagem do Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS) (BRASIL, 2016b).

E a CP nº 262/2016 também discute a proposta de elaboração de uma nova RDC, porém, sobre os critérios para classificação toxicológica de agrotóxicos, componentes, afins e preservativos de madeira; e para comparação da ação tóxica de agrotóxicos e afins no âmbito da ANVISA. Sendo assim, a nova proposta de legislação estabelecerá a adoção dos critérios estabelecidos pelo GHS para fins de classificação toxicológica, e estabelece que a classificação dos agrotóxicos, afins e preservativos de madeira em uma das cinco categorias (I, II, III, IV, V) e o Não Classificado será feita com base na categoria mais restritiva atribuída aos resultados dos estudos de toxicidade oral aguda (DL50 oral), toxicidade cutânea aguda (DL50 cutânea) ou toxicidade inalatória aguda (CL50 inalatória). Em relação a comunicação do perigo, necessária no rótulos e bulas, será realizada de acordo com os resultados dos estudos toxicológicos de corrosão/irritação cutânea e ocular, de sensibilização cutânea e inalatória. E de forma complementar, as informações em relação à mutagenicidade, à carcinogenicidade e à toxicidade reprodutiva também deverão constar na comunicação do perigo (BRASIL, 2016c).

Sendo assim, na tentativa de fornecer subsídios científicos para uma melhor avaliação da irritação/corrosão ocular de formulações agrotóxicas e ainda contribuir com a melhoria dos critérios regulatórios, diferentes testes *in vitro* e *ex vivo* tem sido utilizados em combinação por pesquisadores (OLIVEIRA, 2015).

#### 1.2.4 Metodos substitutivos a avaliação da toxicidade ocular:

Como já mencionado anteriormente, as principais metodologias tidas como referências mundiais para avaliar a exposição humana a xenobióticos, em grande parte, possuem inúmeras limitações preditivas e baseiam-se na utilização de animais (HARTUNG, 2009). Além disso, a toxicologia, em relação aos outros campos da ciência, permaneceu sem avanços metodológicos por um período mais longo, conforme menciona o pesquisador Thomas Hartung (2009) do Centro de Alternativas a Testes Animais (CAAT - *Center for Alternatives to Animal Testing*) da universidade americana John Hopkins.

Sendo assim, continuar utilizando metodologias de avaliação tradicional que podem fornecer respostas insatisfatórias e insustentáveis torna-se incoerente mediante os avanços tecnológicos distribuídos nos diversos campos da ciência, bem como perante a crescente necessidade de investigações mecanísticas dos toxicantes, as quais, na maioria dos casos, não podem ser feitas em modelos animais (KREWSKI et al. 2010).

Neste contexto, as limitações preditivas do método de Draize o tornou uma metodologia insustentável, favorecendo, nas últimas décadas, o desenvolvimento, a validação e a adoção por agências reguladoras internacionais de diversos métodos substitutivos baseados em ensaios *in vitro*, *ex vivo* e *in silico* (LOTZ et al., 2016).

Dessa forma, diversos métodos não-animais validados ou em processo de validação têm sido aceitos pelos órgãos reguladores para avaliação da toxicidade ocular visando a substituição do teste *in vivo* de Draize. Estes métodos compreendem técnicas com base na avaliação de diferentes parâmetros na córnea e na conjuntiva, tais como citotoxicidade, opacidade, permeabilidade (OECD 438, 2017; OECD 437, 2017) e parâmetros inflamatórios vasculares. Nessas metodologias são utilizadas abordagens baseadas em células bi ou tridimensionais, bem como tecidos *ex vivo* (OECD 491, 2015; OECD 492, 2017). Neste cenário, o ensaio *Hen Chorion-Allantoic Membrane Assay* (HET-CAM) (STEILING, 1994)

está sendo validado como um teste alternativo à toxicidade ocular pelo Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos (BraCVAM).

No entanto, sabendo que a utilização de apenas um único teste de irritação ocular é inadequado para substituir o quantitativo de injúrias que podem ser medidas utilizando o olho de coelho (teste de Darize), autores têm demonstrado que a utilização estratégica de métodos alternativos em uma abordagem em camadas ou *tiered approach* tem melhorado a precisão em distinguir o perfil tóxico ocular de substâncias e misturas (HAYASHI et al., 2012; VERSTRAELEN et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2015; VERSTRAELEN; ROMPAY, 2017).

Diante essa premissa, a combinação de testes com sensibilidades distintas bem como parâmetros mecanísticos diferentes tem sido utilizada com sucesso para avaliar a toxicidade ocular de toxicantes, pois permitem uma otimização da resolução dos resultados permitindo predições e classificações corretas de amostras desconhecidas (OLIVEIRA et al., 2015; VERSTRAELEN; ROMPAY, 2017). Essa combinação estratégica é realizada de forma que as limitações de cada método possam ser supridas pelas vantagens de outro método, de acordo com a necessidade imposta pelas características do objeto de estudo (substância ou mistura-teste), bem como pelo desfecho particular de cada metodologia, o qual justifica ser investigado (VERSTRAELEN; ROMPAY, 2017).

Dentre os testes de irritação ocular já validados e adotados pelas agências reguladoras internacionais e seus respectivos parâmetros comumente avaliados, tem-se o teste *in vitro* Exposição à curto prazo (*Short Time Exposure* - STE) que avalia a morte de células da córnea, o teste *ex vivo* Opacidade e Permeabilidade da Córnea Bovina (*Bovine Corneal Opacity and Permeability* – BCOP) que avalia os eventos de opacidade e permeabilidade provocados na córnea e o teste *in vitro* teste Membrana Corioalantóide do

Ovo de Galina Embrionado (*Hen egg Chorion-allantoic Membrane test* - HET-CAM) o qual avalia os eventos inflamatórios vasculares (LOTZ et al., 2016).

O STE é um ensaio de citotoxicidade *in vitro* realizado em monocamadas de células de córnea de coelho (*Statens Seruminstitut Rabbit Cornea* - SIRC). Este ensaio fornece baixo índice de resultados falso positivo, e por isso, é utilizado com êxito em situações experimentais em que o objeto de estudo possui propriedades citotóxicas conhecidas, propiciando uma abordagem “de cima para baixo” (*Top-down*) (OECD TG 491, 2015; WILSON, 2015; OEDC TG 491, 2017). O OECD TG 491/2017, referente ao teste STE, foi submetido a dois estudos prospectivos de validação, um conduzido pelo Comitê de Validação da Sociedade Japonesa de Metodologias Alternativas a Experimentação Animal (JSAAE) (SAKAGUCHI et al., 2011) e outro pelo Centro Japonês de Validação de Metodologias Alternativas (JaCVAM) (KOJIMA et al., 2013). Uma revisão pelos pares foi conduzida pela *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods* nos Estados Unidos (US ICCVAM) (ICCVAM, 2013) e, a partir dessas avaliações, concluiu-se que o STE pode identificar corretamente substâncias ou misturas químicas com potencial tóxico ocular capazes de provocar dano grave aos olhos (Categoria 1), bem como os produtos químicos (excluindo substâncias altamente voláteis e sólidos que não sejam surfactantes) que não provocam danos oculares (Sem Categoria).

O OECD 437/2017, referente ao método *in vitro* denominado Teste de Permeabilidade e Opacidade da Córnea Bovina (*Bovine Corneal Opacity and Permeability* – BCOP), trata-se de um modelo organotípico que fornece dados, a curto prazo, relacionados a fisiologia e bioquímica da córnea bovina. Os danos causados à córnea por substâncias químicas são avaliados quantitativamente por meio da opacidade e da permeabilidade utilizando-se um opacitômetro e um espectrofotômetro de luz visível, respectivamente. O método foi avaliado em conjunto pelos centros de validação de métodos alternativos europeu e japonês, ECVAM e JaCVAM, em 2006 e 2010, respectivamente.

Primeiramente o teste foi avaliado quanto a sua capacidade de identificar produtos químicos (substâncias e misturas) que induzem danos oculares graves; e posteriormente, quanto a sua capacidade de identificar produtos químicos classificados como não irritantes oculares ou que não causam sérios danos aos olhos. A partir da avaliação por pares dos resultados obtidos concluiu-se que o método BCOP é capaz de identificar substâncias que induzem sérios danos oculares, bem como àquelas que não exige classificação para irritação ocular ou dano ocular grave, conforme definido pelo Sistema Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos das Nações Unidas (UN GHS). Sendo assim, em 2013, o método foi aprovado como cientificamente válido para ambos os propósitos (OECD 437, 2013) e em 2017 o guideline foi novamente atualizado (OECD 437, 2017).

O ensaio HET-CAM é um teste que permite detectar o potencial irritante de produtos pela observância de alterações adversas que podem ocorrer na membrana corioalantóide (CAM) dos ovos após a exposição ao produto testado. Está descrito no protocolo INVITTOX 47 (1992) (SPIELMANN, 1992; LUEPKE, 1985; ICCVAM, 2010) e, atualmente, passa por processo de validação pelo BraCVAM.

As estratégias seguidas durante a elaboração de uma abordagem em camadas podem ser “De cima para baixo” ou “De baixo para cima” (*Bottom-up*). A primeira é utilizada quando se espera que a substância ou mistura teste apresente uma resposta de injúria ocular acentuada (irritante severa ou corrosiva) devido informações toxicológicas pré-existent das amostras na literatura. A segunda abordagem, em contra-partida, é utilizada quando não se espera um perfil de injúria toxicológica ocular, ou apresente uma resposta leve ou moderada (irritante leve ou moderado). Essas associações metodológicas aumentam a capacidade preditiva do estudo, contribuindo para a correta classificação e rotulagem de produtos (ESKES et al., 2014; VERSTRAELEN; ROMPAY, 2017).

Em corroboração a essa associação estratégica de métodos, em 2017 a OECD publicou um Guia de Teste e Avaliação em Abordagem Integrada (*Integrated Approach on Testing and Assessment - IATA*) para a avaliação do potencial de irritação ocular de substâncias e misturas. Ficou preconizado que o planejamento da avaliação da toxicidade ocular deve ser executado em três partes sequenciais, considerando todas as informações científicas disponíveis sobre a amostra (OECD, 2017a).

Em síntese, na primeira etapa é realizada a avaliação dos dados existentes sobre a amostra, incluindo informações sobre as propriedades físico-químicas, estudos previamente realizados em animais ou *in vitro* e dados humanos oriundos de exposições acidentais. Caso as informações levantadas na primeira parte sejam inconclusivas, segue-se para a segunda parte da IATA que inclui avaliações sobre as evidências de risco do produto-teste, as quais fornecem subsídio para a realização da terceira parte. Nesta última etapa, diante as informações obtidas durante a análise de evidências, é traçada uma estratégia de testes (com abordagem *Top-down* ou *Bottom-up*) para avaliar o perfil tóxico ocular da amostra (ESKES et al., 2014; OECD, 2017a; VERSTRAELEN; ROMPAY, 2017). Essa avaliação deve incluir, de preferência, métodos não-animais preconizados nos guias de testes da OECD. Entretanto, nas situações em que tais testes não forneçam resultados suficientes para a classificação da amostra, devem ser utilizados métodos alternativos não aceitos pela OECD, mas validados, e em última circunstância, o teste de Draize (OECD, 2017a) em um número reduzido de animais ou em um único animal.

Diante este cenário, com relação às formulações agrotóxicas, o trabalho teve uma abordagem estratégica utilizando métodos substitutivos ao uso de animais para avaliar a toxicidade ocular de formulações agrotóxicas comercializadas no Brasil. E além disso, o trabalho também propôs um parâmetro quantitativo, associado ao ensaio BCOP, para avaliar a severidade do dano ocular, mesurando a profundidade da lesão na córnea bovina induzida por substâncias irritantes para os olhos.

### **2. 1 Objetivo geral:**

O objetivo deste trabalho foi propor uma plataforma de abordagem estratificada baseada em parâmetros mecanísticos utilizando metodologias substitutivas ao modelo animal que possa ser útil para avaliar a toxicidade ocular de formulações agrotóxicas comercializadas no Brasil. Bem como, propôr um parâmetro quantitativo ao ensaio BCOP para avaliar a gravidade do dano ocular induzida por substâncias irritantes para os olhos.

### **2.2 Objetivos específicos:**

#### 2.2.1 Quanto às formulações agrotóxicas comercializadas no Brasil:

- Avaliar e selecionar formulações das diferentes classes toxicológicas preconizadas pela ANVISA (classe I, II III e IV);
- Avaliar o potencial de irritação ocular por meio do método de citotoxicidade de Exposição de Curta Duração (STE);
- Avaliar o potencial de irritação ocular pelo método de Opacidade e Permeabilidade da Córnea Bovina (BCOP) daquelas que foram não irritantes e das que não puderam ser classificados pelo STE;
- Realizar a análise histopatológica das córneas que foram expostas às formulações que não puderam ser classificados pelo teste BCOP;

- Avaliar o potencial de irritação vascular ocular pelo teste da Membrana Corioalantóide do Ovo de Galinha Embrionado (HET-CAM) das formulações que foram não irritantes e das que não puderam ser classificados pelo teste STE;

- Fornecer subsídios para adoção de um sistema de categorização harmonizado no Brasil baseados nos critérios GHS que utilizem testes substitutivos ao modelo animal para avaliação da toxicidade ocular;

### 2.2.2 Quanto ao refinamento do ensaio BCOP:

- Avaliar e selecionar substâncias das diferentes categorias toxicológicas preconizadas pelo GHS (Categoria 1, 2A, 2B e sem categoria);

- Propôr um parâmetro quantitativo ao ensaio BCOP para avaliação da profundidade do dano às córneas por meio da análise da permeação epitelial de fluoresceína.

Este trabalho envolveu a elaboração de uma plataforma com abordagem estratégica baseada em metodologias substitutivas ao uso de animal para avaliar a toxicidade ocular de formulações agrotóxicas comercializadas no Brasil. E paralelamente, também foi desenvolvida uma proposta de refinamento do ensaio BCOP afim de estabelecer um parâmetro quantitativo adicional para uma melhor categorização de toxicantes oculares.

### **3.1 Abordagem em camadas para avaliar a irritação ocular com base em parâmetros mecanísticos**

Foi elaborada uma plataforma com abordagem em camadas para avaliar a toxicidade ocular de formulações agrotóxicas combinando três metodologias não animais (**Figura 3**). Considerando as informações existentes sobre as formulações agrotóxicas, bem como as vantagens do STE, previsto na OECD 491/2017, em ser um método relativamente fácil, rápido e ter baixa taxa de falsos positivos, este método foi escolhido como primeiro nível de pesquisa. Sendo assim, no primeiro nível de avaliação, foi verificado o perfil citotóxico das formulações agroquímicas frente às células de córnea de coelhos (linhagem SIRC).

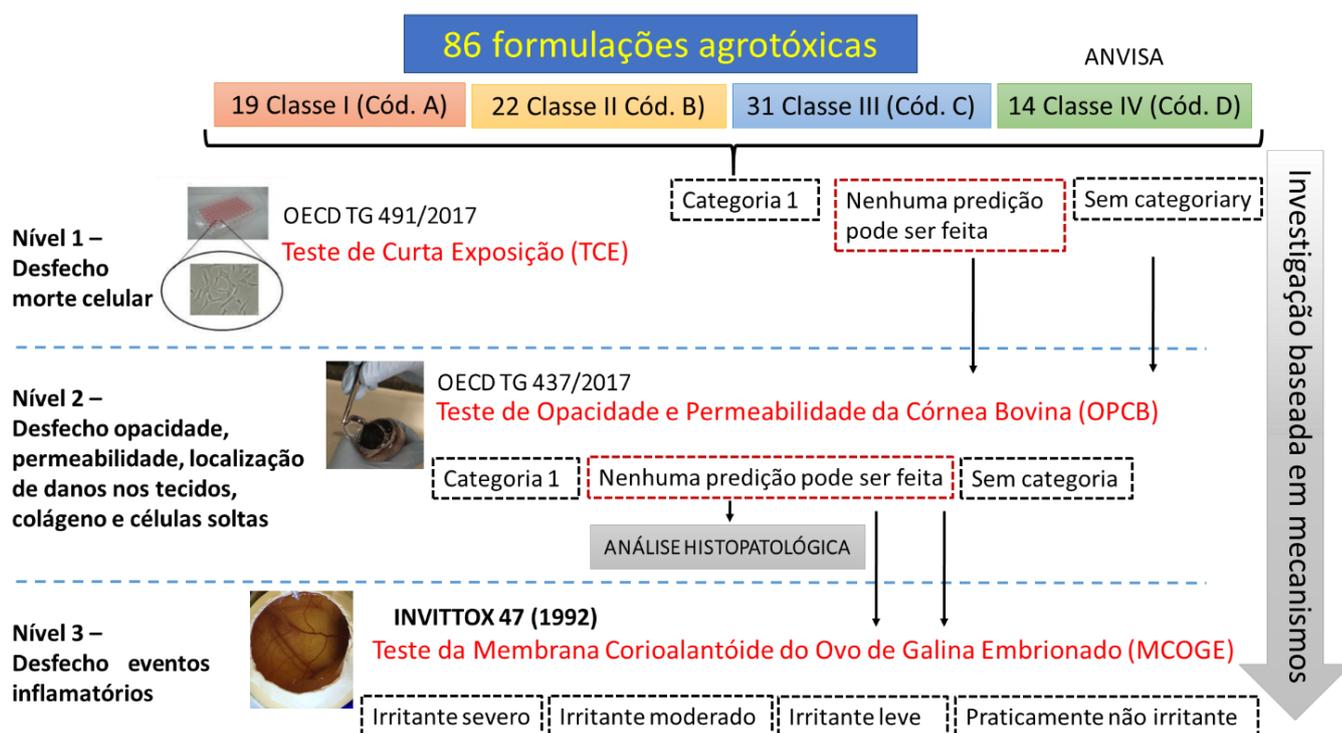
Em um segundo nível de avaliação, foi utilizada uma metodologia mais sensível e com baixo índice de falso negativo para avaliar os danos provocados à córnea. Diante tais características foi realizado o ensaio BCOP com análise histopatológica previsto na OECD 437, 2017. A avaliação histopatológica seguiu os critérios propostos nos documentos de orientações revisados: “Documento de Orientação sobre Abordagem Integrada de Testes e Avaliação para Sérios Danos e Irritação Ocular” publicado em 20 de julho de 2017 (OECD, 2017a) e “Documento de Orientação Revisado sobre Opacidade e Permeabilidade da

Cornea Bovina (BCOP) e Teste Isolado de Olhos de Galinha (ICE): Coleta de Tecidos para Avaliação Histológica e Coleta de Dados” publicado em 28 de julho de 2017 (OECD, 2017g)

A fim de confirmar os dados obtidos no segundo nível, o ensaio HET-CAM (SPIELMANN, 1992; LUEPKE, 1985; ICCVAM, 2010) foi realizado como um terceiro nível.

As formulações agrotóxicas categorizadas como “Nenhuma previsão pode ser feita” ou “Sem categoria” no primeiro nível da plataforma (ensaio STE) foram submetidas ao segundo nível (BCOP seguido de análise histopatológica) para serem classificadas. No terceiro nível (ensaio HET-CAM) os dados obtidos com as formulações agrotóxicas submetidas ao BCOP foram avaliados sob o aspecto vascular.

**Figura 3:** Fluxograma referente a combinação dos ensaios não animais que compõem a plataforma de níveis para avaliar a toxicidade ocular de formulações agrotóxicas.



### 3.1.1 Seleção das formulações agrotóxicas

As formulações agrotóxicas utilizadas neste trabalho foram obtidas no comércio brasileiro, por meio de doações realizadas por professores da Faculdade de Agronomia da

Universidade Federal de Goiás, por agrônomos da cidade de Rio Verde – Goiás e pela empresa produtora de formulações agrotóxicas chamada Syngenta®. Foram inclusas no estudo amostra com diferentes classes biológicas, tipos de formulações e grupos químicos. As amostras foram separadas e catalogadas de acordo com a sua classificação toxicológica ocular registrada na ANVISA, sendo 19 Classe I (extremamente tóxico), 22 Classe II (altamente tóxico), 31 Classe III (medianamente tóxico) e 14 Classe IV (pouco tóxico), totalizando 86 formulações, as quais foram aliqüotadas em tubos cônicos tipo falcon e identificados de acordo com um código específico (**Quadro 5**).

**Quadro 5:** Formulações agrotóxicas selecionados para o estudo de irritação ocular comercializados no Brasil e registrados na Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Classe de toxicidade ocular	Código	Classe Biológica	Princípio Ativo (Grupo Químico)	Formulação
Classe I	A-1	Herbicida seletivo, de ação sistêmica	Acetato de Dimetilamonio, sal de dimetilamina, Equiv. ácido do 2,4-D (Ácido Ariloxialcanoico)	SC
	A-2	Herbicida não seletivo não sistêmico e de contato	Paraquate (Bipiridílio)	SC
	A-3	Fungicida sistêmico	Difenoconazol (Triazolól)	CE
	A-4	Inseticida-acaricida de contato e ingestão	Clorpirifós (Organofosforado)	CE
	A-5	Inseticida de contato e ingestão	Fentoato (Organofosforado)	SC
	A-6	Inseticida	Dimetoato (Organofosforado)	CE
	A-7	Herbicida seletivo não sistêmico	Oxifluorfem (Éter difenílico)	CE
	A-8	Inseticida sistêmico e de contato	Metomil e etanol (Metilcarbamato de oxima)	SL
	A-9	Fungicida sistêmico e de contato	Carboxina / Tiram (Dimetilditiocarbamato)	SC
	A-10	Herbicida seletivo	S-metalaclo (Cloroacetanilida)	CE
	A-11	Fungicida de contato	Clorotalonil (Isoftalonitrilas)	SC
	A-12	Inseticida e acaricida de contato e ingestão	Fenpropatrina (Piretróides)	SC
	A-13	Fungicida translaminar	Piriproxifem / Xileno (Piridiloxipropílico)	CE
	A-14	Inseticida acaricida	Abamectina (Avermectina)	CE
	A-15	Fungicida sistêmico e de contato	Metalaxil-M / Clorotalonil (Acilalaninato / Isoftalonitrila)	SC
	A-16	Herbicida seletivo	Fonoxaprop-P-etílico (Ácido ariloxifenoxipropiônicos)	EW
	A-17	Herbicida não seletivo sistêmico	Diquate (Bipiridílio)	CS
	A-18	Herbicida seletivo sistêmico	Imazetapir sal amônio/Imazetapir (ambos imidazolina)	SL
	A-19	Inseticida sistêmico e de contato	Metomil (Metilcarbamato de oxima)	SL
Classe II	B-1	Herbicida pré-emergente, seletivo e sistêmico	Sufentrazone (Triazolona)	SC
	B-2	Inseticida sistêmico/Inseticida de contato e ingestão	Imidacloprido e Tiodicarbe (Neonicotinóide / Metilcarbamato de oxima)	SC
	B-3	Acaricida de contato e ingestão	Fenpiroximato (Pirazol)	SC
	B-4	Fungicida de contato	Iprodiona (Dicarboximida)	SC
	B-5	Herbicida	Clomazina (Isoxazolidinonas)	CE
	B-6	Herbicida sistêmico não seletivo	Glifosato, equivalente ácido de glifosato (Glicina substituída)	CS
	B-7	Inseticida de contato e ingestão	Beta-Ciflutrina (Piretróide)	CE
	B-8	Inseticida sistêmico	Tiacloprido (Neonicotinóide)	SC
	B-9	Inseticida inibidor da síntese de quitina	Triflumurm (Benzoiluréia)	SC
	B-10	Adjuvante	Alquil éster etoxilado do ácido fosfórico	CE
	B-11	Herbicida seletivo	Metribuzim (Triazinona)	SC
	B-12	Fungicida de contato	Mandipropamida (Éter mandelamina)	SC
	B-13	Inseticida e acaricida sistêmico	Carbosulfano (Matilcarbamato de banzofuranila)	SC
	B-14	Fungicida sistêmico e translaminar	Cloridrato de propamocabe / Fenomidona (Carbamato / Imidazolinona)	SC
	B-15	Inseticida de contato, ingestão e fisiológico	Profenofós / Lufenuron (Organofosforado / Benzoiluréias)	CE
	B-16	Inseticida sistêmico	Imidacloprido / Beta-ciflutrina (Neonicotinóide / Piretróide)	SC
	B-17	Inseticida de contato e ingestão	Lambda-Cialotrina / Clorantraniliprole (Piretróide / Antranilamida)	SC
	B-18	Inseticida de contato e ingestão	Lambda-cialotrina / solvente nafta / Alquifenol etoxilado (Piretróide)	CE

	B-19	Herbicida seletivo sistêmico	Diurum (Uréia)	SC
	B-20	Herbicida não seletivo sistêmico	Sal de potássio de glifosato/Glifosato (ambos Glicina substituída)	CS
	B-21	Fungicida-Inseticida protetor/sistêmico/contato e ingestão	Piraclostrobina/Tiofanato metílico/Fipronil (Estrobilurinas/Benzimidazol/Pirazol)	pronta
	B-22	Fungicida sistêmico	Piraclostrobina/Epoxiconazol (Estrobilurina/Triazol)	SE
Classe III	C-1	Herbicida sistêmico não seletivo	Sal de Glifosato e equivalente ácido de glifosato (Glicina substituída)	CS
	C-2	Herbicida seletivo sistêmico	Fluazifope-p-butílico (ácido arilox-fenoxipropiônico)	EW
	C-3	Fungicida e bactericida	Casugamicina (Antibiótico)	CS
	C-4	Fungicida sistêmico	Azoxistrobina / Difenconazol (Estrobilurina / Triazol)	SC
	C-5	Inseticida de contato e ingestão	Clorantranilprole (Diamina antranilica)	SC
	C-6	Inseticida acelerador de ecdise	Metoxifenzida (Hidrazida)	SC
	C-7	Inseticida de contato e ingestão	Iloxarabe (Oxadiazina)	EC
	C-8	Herbicida sistêmico não seletivo	Sal de Glifosato e equivalente ácido de glifosato (Glicina substituída)	SL
	C-9	Herbicida sistêmico e seletivo	Fomesafem / Fluazifope-P-Butílico (Difenil éter / Fenoxi propionato)	SL
	C-10	Inseticida fisiológico	Novalurum (Benzoiluréia)	SC
	C-11	Inseticida sistêmico	Tiametoxam (Neonicotinóide)	SC
	C-12	Inseticida não sistêmico	Espinitoram (Espinósinas)	SC
	C-13	Inseticida de contato e ingestão	Alfacipermetrina / Teflubenzurom (Piretróide / Benzoiluréia)	SC
	C-14	Inseticida sistêmico	Imidacloprido (Neonicotinóide)	SC
	C-15	Herbicida seletivo sistêmico	Tembotriona (Benzoilciclohexanodiona)	SC
	C-16	Inseticida de contato e ingestão	Alfacipermetrina (Piretróide)	SC
	C-17	Inseticida mesosistêmico e sistêmico	Trifloxistrobina / Tebriconazol (Estrobilurina / Triazol)	SC
	C-18	Fungicida sistêmico	Propiconazol (Triazol)	EC
	C-19	Fungicida sistêmico	Ciproconazol (Tiazol)	SL
	C-20	Inseticida sistêmico de ingestão e contato	Tiametoxam / Lambda-cialotrina (Neonicotinóide / Piretróide)	SC
	C-21	Fungicida sistêmico	Azoxistrobina / Ciproconazol (Estrobilurina / Triazol)	SC
	C-22	Acaricida/Inseticida de contato e ingestão	Diafentiurom (Feniltiuréia)	SC
	C-23	Herbicida seletivo sistêmico	Mesotriona (Tricetona)	SC
	C-24	Inseticida de contato e ingestão	Flubendiamida (Diamida do ácido ftálico)	SC
	C-25	Inseticida/Acaricida de contato e ingestão	Clorfenapir (Análogo de pirazol)	SC
	C-26	Inseticida sistêmico de contato e ingestão	Tiametoxam / Clorantranilprole (Neonicotinóide / Antranilamida)	SC
	C-27	Inseticida de contato e ingestão	Lambda-Cialotrina (Piretróide)	CS
	C-28	Inseticida de contato e ingestão	Lambda-Cialotrina (Piretróide)	CS
	C-29	Inseticida de contato e ingestão	Dietil (Organofosforado)	EW
	C-30	Herbicida seletivo, de ação sistêmica	Tepraloxidim (Oxima ciclohexanodiona)	EC
	C-31	Fungicida sistêmico	Carbendazim/Tebuconazol (Benzimidazol/Triazol)	CS
Classe IV	D-1	Herbicida seletivo sistêmico	Atrazina (Triazina)	CS
	D-2	Herbicida seletivo sistêmico	Diurum (Uréia)	SC
	D-3	Inseticida acelerador de ecdise	Tebufenozida (Diacilhidrazina)	SC
	D-4	Inseticida biológico	Bacillus thuringiensis, var. kurstaki, linhagem HD-1	SC
	D-5	Inseticida inibidor da síntese de quitina	Teflubenzurom (Benzoiluréias)	SC
	D-6	Inseticida sistêmico e de ingestão	Clorantranilprole (Diamina antranilica)	SC

	D-7	Herbicida sistêmico	Sal de Glifosato potássico e equivalente ácido de glifosato (Glicina)	SL
	D-8	Inseticida fisiológico	Lufenuron (Benzoiluréia)	EC
	D-9	Inseticida de contato e espalhante adesivo	Óleo vegetal (Ésteres de ácidos graxos)	EC
	D-10	Adjuvante	Óleo mineral (Hidrocarbonetos alifáticos)	EC
	D-11	Inseticida não sistêmico	Espinosade (Espinosinas)	SC
	D-12	Inseticida microencapsulado	Lambdacialotrina (Piretróide)	SC
	D-13	Adjuvante, acaricida e inseticida de contato	Óleo mineral (Hidrocarbonetos alifáticos)	EC
	D-14	Inseticida	Alfacipermetrina (Piretróide)	SC

**Legenda:** SC: suspensão concentrada; EC ou CE: concentrado emulsionável; CS ou SL: concentrado solúvel; SE: suspoemulsão

### 3.1.2 Método de Exposição de Curta Duração – OECD 491/2017: Primeiro nível – desfecho morte celular

#### 3.1.2.1 Preparo da monocamada celular

A linhagem celular SIRC foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro, Brasil, mantidas em estufa de cultivo celular a 37%, com atmosfera de 5,0% de CO<sub>2</sub> e umidade controlada e cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e 1% de Penicilina/Estreptomicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Após atingida a confluência de 80%, as células foram removidas da superfície da garrafa de cultivo celular usando solução de tripsina/EDTA (0,25% / 0,03%) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO/Proquimios, RJ, Brasil) diluída em PBS na proporção 1:1, centrifugadas a 1500 RPM por 5 minutos e ressuspensas em 1,0 mL de meio DMEM. Em seguida, 10 µL da suspensão celular foi adicionada em 10 µL de azul de tripano 0,2% e transferidos para lâmina de contagem (Bio-Rade, USA) para determinar a viabilidade no contador celular automático (Bio-Rad, TC20™ – Contador celular automático).

Diante o quantitativo de células viáveis, foi realizada a diluição da suspensão celular em meio de cultura suplementado com 10% de SFB para a densidade de  $6,0 \times 10^3$  células

por poço, quando as células foram usadas quatro dias após a semeadura; ou  $3,0 \times 10^3$  células por poço, quando as células foram usadas cinco dias após a semeadura. As células foram cultivadas em microplaca de policarbonato de 96 poços. Nestas condições alcançou-se uma confluência de mais de 80% no momento do teste, ou seja, quatro ou cinco dias após a semeadura.

#### 3.1.2.2 Preparo e Exposição das formulações agrotóxicas

Em capela de exaustão, as formulações agrotóxicas foram diluídas para as concentrações de 5% e 0,05% em solução salina, de acordo com as recomendações da OECD 491/2017.

Em capela de fluxo laminar, foi descartado o meio de cultivo da placa de 96 poços e as células foram expostas à 200 µL das diferentes amostras durante 5 minutos. Em seguida, os praguicidas foram retirados dos poços por inversão da placa. As células foram lavadas, por duas vezes, com 200 µL de salina utilizando-se pipetador automático multicanal. Adicionou-se 200 µL da solução de [brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (MTT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) à 0,5% preparada em meio de cultivo e as células foram novamente incubadas em estufa a 37 °C e 5,0% de CO<sub>2</sub> por 2 horas.

Posteriormente, o sobrenadante dos poços foi descartado por inversão e os cristais de formazan formados foram solubilizados com 200 µL de DMSO P.A. (Vetec, RJ, Brasil) e com agitação de 30 RPM por 20 minutos em agitador de placas. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro de placa (Multiskan Spectrum ThermoScientific®) no comprimento de onda de 570 nm.

O ensaio foi realizado em triplicata, e as amostras das formulações agrotóxicas em sextuplicata.

#### 3.1.2.3 Análise dos dados: Viabilidade celular e Classificação

A citotoxicidade foi medida como a viabilidade relativa das células SIRC. A viabilidade das células expostas às diferentes formulações agrotóxicas foi estabelecida em relação ao controle, sendo calculada conforme mostrado na **Equação 1**. De acordo com a viabilidade celular adquirida após a exposição aos agroquímicos nas concentrações de 5% e 0,05%, as amostras foram classificadas em irritante severo (*Category 1*) ou não irritante (*No category*) ou não puderam ser classificadas pelo método (*no prediction can be made*) (**Quadro 6**). A diminuição da viabilidade celular foi utilizada para prever possíveis efeitos adversos que levam ao dano ocular.

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\left( \begin{array}{l} \text{Média da absorvância correspondente} \\ \text{a cada concentração do composto} \end{array} - \text{Branco} \right) \times 100}{\text{Média da absorvância do controle} - \text{Branco}}$$

**Equação 1:** Cálculo da viabilidade das células SIRC após exposição às formulações agrotóxicas pelo método STE (OECD TG 491/2017).

**Quadro 6:** Modelo de predição para irritação ocular de substâncias químicas e misturas de acordo com a viabilidade celular proposto pelo método STE (OECD TG 491/2017).

Viabilidade celular		UN GHS
5%	0,05%	
> 70%	> 70%	Sem categoria
≤ 70%	> 70%	Nenhuma predição pode ser feita
≤ 70%	≤ 70%	Categoria 1

3.1.3 Teste de Opacidade e Permeabilidade da Córnea Bovina (Bovine Corneal Opacity and Permeability - BCOP) - OECD 437/2017 seguida da análise histopatológica: Segundo nível – desfecho opacidade, permeabilidade, localização de danos no tecido, colágeno e células soltas

#### 3.1.3.1 – Obtenção das córneas e exposição às formulações agrotóxicas

Os olhos bovinos foram fornecidos pelo frigorífico Vale do Cedro, localizado na cidade de Inhumas, Goiás, e coletados no mesmo dia em que os animais entre 12 e 60

meses eram abatidos. Ficaram mantidos, sob refrigeração em caixa térmica com gelo, em tampão HBSS (Sigma-Aldrich H1387) com 100 IU/mL penicilina e estreptomicina 100 µg/mL.

Inicialmente, a integridade dos olhos foi avaliada, sendo selecionado para o ensaio somente àqueles com córneas translúcidas, sem arranhões ou sem qualquer outra alteração perceptível. Os olhos selecionados tiveram as córneas dessecadas e acopladas em aparatos específicos constituídos de duas câmaras, uma anterior, a qual expôs a superfície epitelial da córnea, e outra posterior, que reservou a região endotelial. Em seguida, as duas câmaras foram preenchidas com meio de cultura MEM (Eagle's Minimum Essential Medium, Sigma-Aldrich M3024) sem vermelho de fenol preenchendo-se a câmara posterior antes da anterior para preservar a anatomia da córnea. Após a montagem dos aparato, os mesmos foram mantidos na posição horizontal em estufa a 32 °C durante uma hora para que as córneas mantivessem suas atividades metabólicas normais. Posteriormente, os meios de cultura das câmaras foram renovados, e, então, realizou-se a leitura inicial da opacidade (*baseline*) no opacitômetro (OP KIT Electro Design – Riom, França) para selecionar as córneas que puderam prosseguir no teste. As córneas que apresentaram valores de opacidade até sete (07) foram utilizadas, e as córneas com valores de opacidade maiores de sete, foram descartadas.

As córneas foram expostas às formulações agrotóxicas selecionadas de acordo com o método A do guia, que preconiza o fluxograma de etapas para exposição de substâncias líquidas e não surfactantes. Sendo assim, as córneas foram expostas a 750 µL da formulação agrotóxica e os aparatos incubados horizontalmente por 10 minutos à 32 °C ± 1. Após o período de exposição, as formulações agrotóxicas foram retiradas das câmaras e a superfície epitelial das córneas foram lavadas com MEM contendo vermelho de fenol pelo menos 3 vezes ou até que não houvesse qualquer evidência da formulação agrotóxica no epitélio, e por último realizou-se a lavagem com MEM sem vermelho de fenol. Então, a

câmara anterior foi novamente preenchida com MEM sem vermelho de fenol e os aparatos incubados por mais duas horas à 32 °C ± 1. Transcorrida a incubação, os meios de cultura das câmaras anteriores e posteriores foram substituídos e realizou-se a segunda leitura da opacidade.

Após a finalização do teste de opacidade, iniciou-se o ensaio de permeabilidade, retirando o meio de cultura das câmaras anteriores dos aparatos, adicionando 1 mL de solução de fluoresceína sódica a 4 mg/mL e incubando os aparatos na posição horizontal por 90 minutos ± 5 a 32 °C ± 1. Em seguida, os meios das câmaras posteriores foram retirados e transferidos para tubos corretamente identificados. Posteriormente, 360 µL de cada tubo foram transferidos para placa de 96 poços e realizada a leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 490 nm. O meio MEM sem vermelho de fenol foi usado como branco. Quanto maior o valor gerado da absorbância, mais fluoresceína conseguiu permear a córnea devido alterações (danos) em sua estrutura.

A representação esquemática das etapas no teste está na **Figura 4**.

### 3.1.3.2 – Análise dos resultados de opacidade e permeabilidade

Com os valores numéricos de opacidade e permeabilidade foi realizado o cálculo do Índice de Irritação *In Vitro* (*In Vitro Score* - IVIS) (**Equação 2**), e em seguida realizada a estimativa de irritação ocular UN GHS (**Quadro 7**).

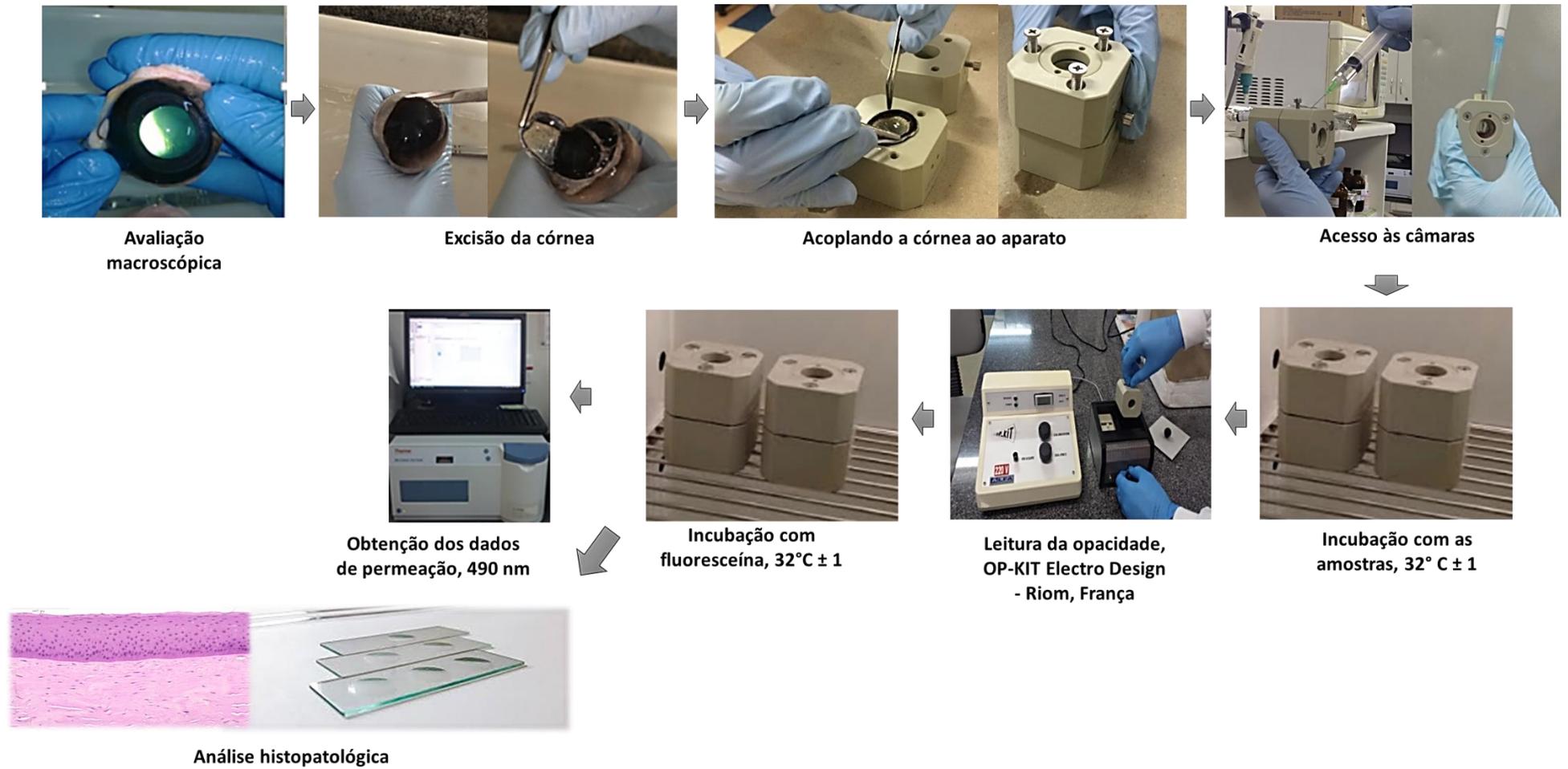
$$\text{IVIS} = \text{Opacidade} + (15 \times \text{Permeabilidade})$$

**Equação 2:** Cálculo do Índice de Irritação *In Vitro* (IVIS). Opacidade: cálculo da média da opacidade final e inicial de cada córnea. Permeabilidade: cálculo da média das absorbâncias de cada córnea subtraída da média da absorbância do branco (MEM).

**Quadro 7:** Modelo de predição para irritação ocular de substâncias químicas e misturas de acordo com o *in vitro score* (IVIS) proposto pelo OECD TG 437/2017.

IVIS	UN GHS
≤ 3	Sem categoria
> 3 ≤ 55	Nenhuma predição pode ser feita
> 55	Categoria 1

**Figura 4:** Representação das etapas sequenciais envolvidas na execução do ensaio de Opacidade e Permeabilidade da Córnea Bovina segundo as orientações da OECD TG 437/2017



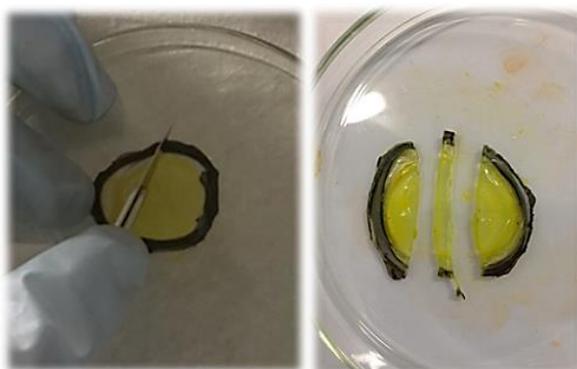
### 3.1.3.3 Avaliação Histopatológica das córneas bovinas

As formulações agrotóxicas que não puderam ser classificadas após a execução do teste BCOP previsto no OECD 437/2017, passaram por outra avaliação, na qual as córneas respectivas a exposição de tais formulações foram submetidas à avaliação histopatológica, cuja intenção foi permitir a classificação dessas formulações de acordo com a observância de diferentes eventos histopatológicos nas diferentes camadas do epitélio.

3.1.3.3.1 – Processamento das córneas, confecção dos cortes histológicos e coloração das lâminas com Hematoxilina/Eosina (HE)

Os aparatos foram desmontados após a finalização do BCOP e as córneas foram retiradas com cuidado e transferidas para um recipiente contendo salina para retirada do excesso de fluoresceína. Logo em seguida, com auxílio de bisturi, foi realizado cortes transversais na região central da córnea, de forma a ser obtido duas seções, e a porção central foi fixada em formaldeído 10% (**Figura 5**). Durante o processamento, as porções foram desidratadas em soluções crescentes de etanol (70%, 80%, 95%, 100%) durante 30 minutos em cada solução. Em sequência, foi realizada a diafanização dos tecidos em dois banhos de 30 minutos em solução de xilol, seguido do processo de infiltração em parafina a 60 °C e por fim, a inclusão das porções em parafina também a 60 °C.

**Figura 5:** Cortes transversais realizados na região central da córnea para obtenção da porção central da qual realizou-se o processamento para obtenção dos cortes histológicos.



Em outro momento, a partir do bloco de parafina com tecido incluso, realizou-se vários cortes histológicos, com espessura de 3 µm, que foram aderidos em lâminas histológicas para posterior coloração. Par isso, inicialmente, os tecidos foram desparafinizados em três banhos de 10 minutos em solução de xilol, e posteriormente hidratados em concentrações graduais decrescentes de Álcool Etílico (100%, 95%, 80% e 70% - 5 minutos cada), seguido por hidratação em água corrente, por 5 minutos. Então, os cortes foram corados com Hematoxilina mediante incubação por 8 minutos, com posterior lavagem em água corrente por 10 minutos. Em sequência, os cortes foram corados com Eosina por 30 segundos e novamente desidratados em três banhos de Álcool Etílico Absoluto, seguidos por três banhos de Xilol. Por fim, as lâminas foram montadas com meio de montagem (Enthelan) e analisadas em microscópio óptico.

#### 3.1.3.3.2 – Análise dos eventos histopatológicos e classificação da irritação ocular

Foram investigadas alterações histopatológicas do epitélio corneano, estroma e endotélio.

As lesões do epitélio da córnea foram classificadas de acordo com a descrição em FURUKAWA et al., (2015). As pontuações (*score* histopatológico – SH) foram atribuídos de acordo com a localização da lesão, da seguinte forma: 0 (nenhuma lesão); 1, suave (em células escamosas); 2, leve (entre células escamosas e asas superiores); 3, moderado (de células escamosas a inferiores); e 4, severo (sobre células basais).

O potencial de irritação das formulações agrotóxicas no estroma corneano foi avaliado com base na extensão dos feixes de colágeno soltos e inchaço dos queratócitos, de acordo com os critérios de decisão histopatológica da Academia de Administração em Cuidados Farmacêuticos (*Academy of Managed Care Pharmacy Back-ground Review Document - AMCP BRD*) (US Environmental Protection Agency of Pesticide Programs. Non-

animal testing approach to EPA labeling for eye irritation. May 11 2009) da seguinte forma: irritante leve (quando o dano da matriz de colágeno não se estende além do terço superior do estroma corneano), irritante moderado (estendendo-se não mais do que dois terços do caminho através do estroma da córnea e irritante grave (estendendo-se para o terço inferior do estroma da córnea e / ou causando danos às células endoteliais.

3.1.4 - Ensaio da Membrana Corioalantóide do Ovo Embrionado de Galinha (Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane - HET-CAM) – adaptado do INVITTOX 47 (1992): Terceiro nível – desfecho eventos inflamatórios

O ensaio da Membrana Corioalantóide do Ovo Embrionado de Galinha (CAM) foi realizado de acordo com o protocolo INVITTOX 47 (1992) (SPIELMANN, 1992; LUEPKE, 1985; ICCVAM, 2010) com adaptações.

3.1.4.1 – Obtenção dos ovos embrionados e exposição às formulações agrotóxicas

Os ovos fertilizados de galinha foram doados pelo incubatório São Salvador Alimentos localizado na cidade de Itaberaí – Goiás. No laboratório, os ovos foram numerados, pesados e colocados em incubadora (modelo IP35D, Premium Ecológica, MG, Brazil) a  $37,8 \pm 1$  °C e 50 a 60% de umidade por 10 dias. Os ovos foram incubados na posição horizontal para garantir que o embrião se posicionasse distante da CAM, e foram rotacionados em 180° de forma automática a cada duas horas para assegurar o desenvolvimento e viabilidade do embrião. No nono dia de incubação (24 horas antes do início do experimento), a rotação foi estagnada e os ovos foram colocados na posição vertical, com a câmara de ar na posição superior, para que o embrião ficasse o mais distante possível da CAM.

No décimo dia de incubação o experimento foi iniciado. Cada ovo foi retirado individualmente da incubadora e a câmara de ar foi demarcada com grafite. Em seguida, com bisturi e tesoura, a casca do ovo delimitada pelo grafite foi retirada e a membrana da câmara de ar foi exposta. Esta membrana foi umedecida com 5 mL de solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9% (salina) e retirada cuidadosamente com auxílio de uma pinça, expondo a CAM.

A CAM foi visualizada no microscópio para verificação de sua integridade e para demarcação visual do local de exposição das amostras (controle negativo – salina, controle positivo – Dodecil Sulfato de Sódio 1% (SDS) e as formulações agrotóxicas). Logo, com auxílio de uma micropipeta e um cronômetro, 300 µL da amostra foi colocada sobre a CAM por 20 segundos. Transcorrido o tempo de exposição, a amostra foi retirada da CAM com três lavagens de 5,0 mL de salina ou até que toda amostra fosse retirada. Durante cinco minutos a CAM foi monitorada, e a cada observação de eventos como hiperemia, hemorragia e/ou coagulação, o tempo exato foi anotado, bem como a intensidade de ocorrência do evento, se leve, moderado ou intenso. Todas as avaliações foram realizadas pelo mesmo analista. Toda exposição foi gravada em computador pelo software ISCapture para eventual confirmação de algum dado. O ensaio foi realizado em triplicata, e as formulações agrotóxicas foram testadas puras e na concentração de 5% (porque esta concentração também foi utilizada no ensaio STE).

#### 3.1.4.2 – Elaboração da pontuação final e classificação do potencial de irritação das amostras

A elaboração da pontuação de irritação foi realizada a partir da média do somatório dos tempos iniciais referentes a ocorrência dos diferentes eventos vasculares (Hiperemia, Hemorragia e Coagulação) (**Quadro 8**). De acordo com o valor da pontuação de irritação

as amostras foram classificadas, em relação a gravidade das reações adversas à CAM, em irritante severo, moderadamente irritante, fracamente irritante e praticamente não irritantes (**Quadro 8**).

**Quadro 8:** Esquema de pontuação do teste HET-CAM para classificar o perfil de irritação ocular.

Amostra (Quadruplicata)	Pontuação para Hiperemia			Pontuação para Hemorragia			Pontuação para Coagulação			Somatório	MSc
	≤30": 5	30" a 2': 3	≥2': 1	≤30": 7	30" a 2': 5	≥2': 1	≤30": 9	30" a 2': 7	≥2': 5		

Legenda: MSc: Pontuação média de irritação da triplicata. MSc < 1: Praticamente não irritante; 1 ≤ MSc < 5: Fracamente irritante; 5 ≤ MSc < 9: Moderadamente irritante; MSc > 9: Irritante severo.

Fonte: adaptado do protocolo IVITTOX 47(1992).

### 3.2 Análise da profundidade da lesão

A realização da proposta de refinamento do ensaio BCOP foi realizada por meio da mensuração da profundidade de permeação do corante fluoresceína à córnea, com o intuito de fornecer informações adicionais importantes por meio de um parâmetro quantitativo para uma melhor caracterização das substâncias frente a irritação ocular.

O estudo piloto contemplou substâncias utilizadas na proficiência do BCOP, STE, ICCVAM e pertencentes à base de dados do Centro Europeu de Ecotoxicologia e Toxicologia de Produtos Químicos (*European Center for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals* - ECETOC). Foram selecionadas 3 substâncias pertencentes às diferentes categorias de irritação ocular UN GHS – OECD 405 (*Category 1, Category 2A, Category 2B e No Category*). O ensaio BCOP foi realizado em triplicata e utilizado PBS como controle negativo (**Quadro 9**).

**Quadro 9:** Substâncias utilizadas no refinamento do ensaio BCOP para averiguação da profundidade de dano à córnea através da permeação de fluoresceína

Classificação <i>in vivo</i> (OECD 405/2017)	Substância	Característica física	Proficiência do teste <i>in vitro</i>
Categoria 1	Cloreto de benzalcônio 5%	líquida	BCOP
	Ácido tricloroacético 30%	líquida	BCOP
	Imidazol	sólida	BCOP
Categoria 2A	2,6 diclorobenzoil	líquida	BCOP
	Octanol	líquida	STE
	Hidróxido de sódio 1%	líquida	ECETOC
Categoria 2B	Etil-2-metilacetoacetato	líquida	BCOP
	Ácido glicólico 10%	líquida	ICCVAM
	Ciclopentanol	líquida	STE
Sem categoria	Tween 20 10%	líquida	BCOP
	Glicerol	líquida	ECETOC
	Poli(etilenoglicol)-400 (PEG-400)	líquida	ECETOC

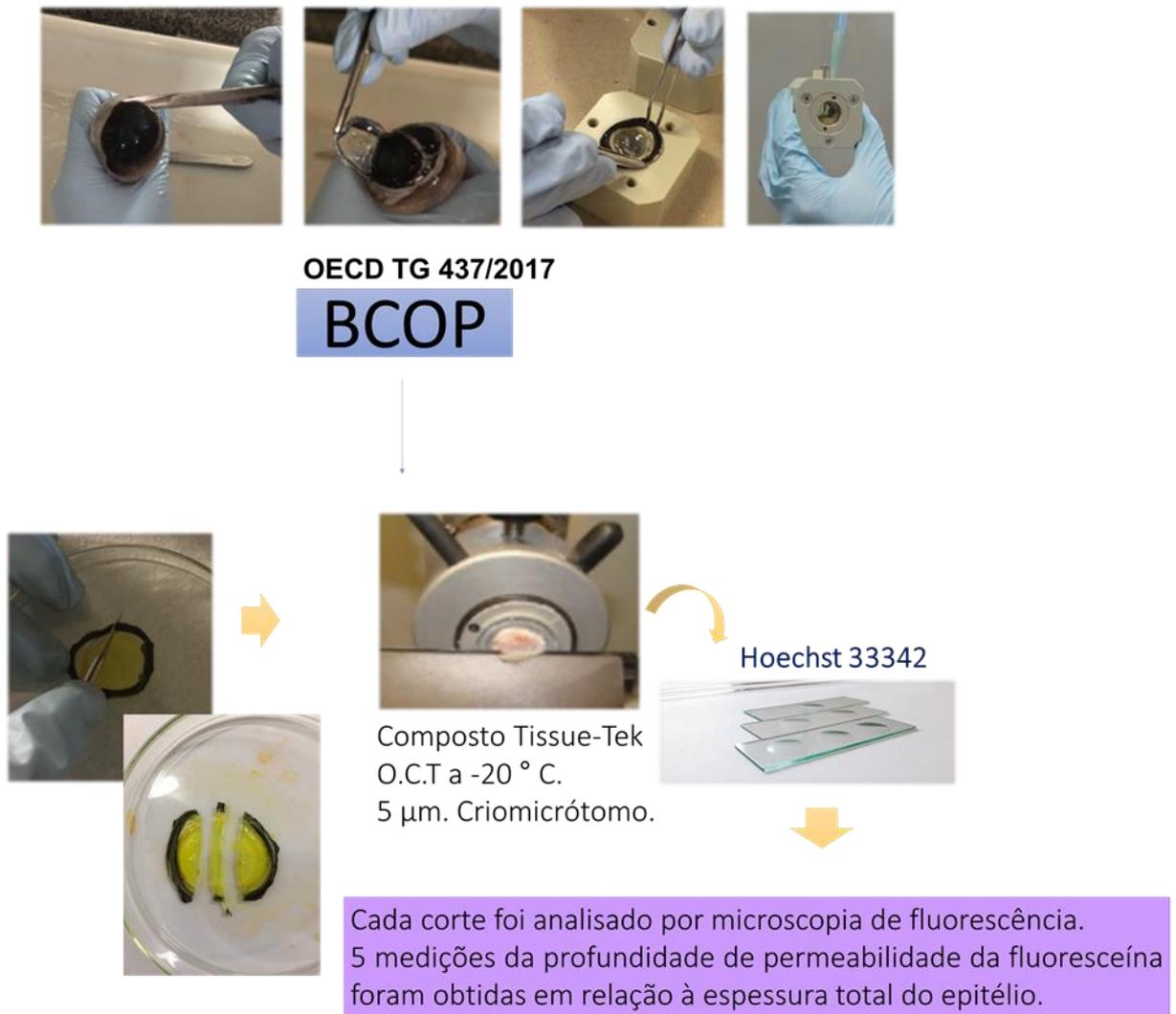
Legenda: *Categoria 1*: irritante ocular severo; *Categoria 2A*: Irritante ocular moderado; *Categoria 2B*: Irritante ocular fraco; *Sem categoria*: Não irritante; ECETOC: Centro Europeu de Ecotoxicologia e Toxicologia e Produtos Químicos (*European Center for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals*)

### 3.2.1 Processamento das córneas, confecção dos cortes histológicos e coloração das lâminas com o corante Hoescht

Os aparatos foram desmontados após a finalização do BCOP e as córneas foram retiradas com cuidado e transferidas para um recipiente contendo salina para retirada do excesso de fluoresceína. Logo em seguida, com auxílio de bisturi, foi realizado cortes transversais na região central da córnea, de forma a ser obtido duas secções, e a porção central foi fixada em meio Tissue-Tek O.C.T. a -20°C. Em seguida, foram obtidos cortes de 5 µm em criostato, os quais foram posicionados nas lâminas histológicas e submetidos a marcação do núcleo celular com o corante Hoescht a 1µg/mL por 5 minutos. Transcorrido este tempo, o tecido passou por duas lavagens de 5 minutos com água destilada e as

lâminas foram montadas com Glicerol acrescido de 10% de PBS. Sequencialmente, os cortes foram analisados em microscópio de fluorescência utilizando os filtros L5 (verde - fluoresceína) e A4 (Azul - Hoescht) (**Figura 6**).

**Figura 6:** Representação esquemática das etapas sequenciais da análise da profundidade da lesão nas córneas através da permeação de fluoresceína.



### 3.2.2 Análise da profundidade da lesão

A análise da lesão na córnea teve como parâmetro de avaliação a mensuração da profundidade do dano causado ao tecido através da permeação da fluoresceína em relação ao epitélio de cada corte histológico. Para isto, o epitélio foi corado com Hoescht, para permitir sua melhor delimitação, e em seguida, foram realizadas mensurações do tamanho do tecido e da fluoresceína permeada em cinco campos distintos de cada tecido exposto

às diferentes substâncias. Os valores foram registrados em planilha para posterior análise estatística.

Em seguida, tais valores relativos as profundidades das permeações de fluoresceína das diferentes substâncias foram agrupadas de acordo com a categoria de irritação ocular GHS UN (*Category 1, Category 2A, Category 2B e No category*), e realizada ANOVA e Teste Tukey para comparação estatística entre os grupo.

---

Artigo 1

### INNOVATIVE STRATEGY BASED ON MECHANISMS TO SUBSTITUTE ANIMAL TESTING FOR OCULAR TOXICITY ASSESSMENT OF AGROCHEMICAL FORMULATIONS MARKET IN BRAZIL

Wanessa Machado Andrade<sup>a</sup>; Artur Christian Garcia da Silva<sup>a</sup>; Larissa Cleres Moreira<sup>a</sup>; Thaisângela Rodrigues Lopes e Silva Gomes<sup>a</sup>; Aline Batista Carvalho<sup>b</sup>; Marize Campos Valadares<sup>a\*</sup>,

<sup>a</sup>Laboratory of Education and Research in In Vitro Toxicology, ToxIn, Faculty of Pharmacy, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil

<sup>b</sup>Laboratory of Oral Pathology, Dental School, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil

\*Corresponding author: Faculdade de Farmácia - Universidade Federal de Goiás, Rua 240 esquina com 5<sup>a</sup> Avenida, s/n, Setor Universitário, Goiânia, GO 74605.170, Brazil. E-mail address: marizeufg@gmail.com (M.C. Valadares).

#### ABSTRACT

Ocular toxicity of chemicals has been investigated assessing damage to different components of the eye, mainly cornea. There have been few advances in the regulatory requirements of agrochemical formulations in Brazil, and lack of global harmonization has limited implementation of alternative methods. During the last years, however, *in vitro* methods have been successfully adopted to assess the ocular toxicity of chemicals and mixtures. Considering that one *in vitro* test alone is not possible Classify & Labelling (C&L) products, the present study aimed to address the applicability of a non-animal platform for eye toxicity assessment of agrochemical formulations. It were investigated the opacity, depth and location of corneal injury in bovine cornea, extent of cytotoxicity, and inflammation events in chorioallantoic membrane induced of different Brazilian agrochemicals using a tiered *in vitro* approach. Cytotoxicity induced by the agrochemical formulations was evaluated by Short Time exposure (STE) (OECD TG 491, 2018) assay (tier 1), corneal injury was investigated by standard Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) (OECD TG 437, 2017) followed by histopathological evaluation (tier 2), and Hen Chorionic-allantoic Membranes (HET-CAM) was used to evaluate vascular injury (tier 3). The results demonstrated that the *in vitro* approach to the assessment of ocular toxicity based on mechanisms enabled a classification corresponding UN GHS classification of agrochemical formulations, while minimizing use of live animals. Therefore, this layered approach may be useful for categorization agrochemical in Brazil with the UN Globally Harmonized System.

**Keywords:** Alternative methods; eye irritation; agrochemical formulations; United Nations Globally Harmonized System (UN GHS); Draize test; ocular injury; Shot Time Exposure (STE); bovine corneal opacity and permeability (BCOP); Hen egg chorion-allantoic membrane (HET-CAM)

## 1. Introduction

Historically, Brazil has been one of the largest producer and user of agrochemicals compounds and commercial end-use products (agrochemical formulations) in the world. In the last few years, the use of agrochemical formulations in Brazil has increased drastically in total consumption, production, and the tonnage per planted area/hectares of crops. The agrochemical market in Brazil is estimated to be equivalent to billions of US dollars (Almeida et al., 2017).

In order to register a new agrochemical product, the Brazilian Health Surveillance Agency (*Agência Nacional de Vigilância Sanitária* or ANVISA) requires toxicological testing of the active agrochemical compound, inert compounds and commercial formulation in order to arrive at appropriate classification and labeling (C&L). Standard Brazilian toxicological testing requirements for agrochemical formulations include a set of acute endpoints (eye irritation/damage, skin irritation/corrosion/sensitization, mutagenesis, lethal dose/concentration 50%) after exposure to different via, such as oral, dermal, inhalation and ocular (Brazil, 1992). To evaluate these toxicological endpoints, ANVISA still accepts/recommends *in vivo* methods, although *in vitro* methods acceptance are ongoing in discussion. It worth to mention, that *in vivo* methods in Brazil are still considered gold standard, in special to evaluated eye toxicity, i.e. Draize Test (OECD 405, 2017) . In contrast, this assay was not submitted to an official validation process and has shown unreliable capability to predict eye toxicity potential of chemicals to humans (Wilson, Ahearnes and Hopkinson, 2015; Scott et al., 2010; Adriaens et al., 2014; Barroso et al., 2016).

Depending on the regulatory requirement, the C&L of agrochemical formulations can be performed based only on the toxicity profile of the isolated components. In Brazil, the agrochemical formulation (active compound plus inert components) is also evaluated, however it is common to find in the market agrochemical formulations with the same active compound but different toxicity and, consequently different C&L. The non-adoption of non-animal validated methods, evaluation of only pure chemicals, lack of global harmonization regarding toxicological testing requirements are major limiting factors for ocular hazard characterization in the agrochemical sector. Moreover, the C&L of products has been done based on animal testing data, which could contribute, at least in part, to inconsistencies found in the C&L of agrochemicals.

To date, several non-animal methods have been or are in the process of being validated and accepted by regulatory agencies worldwide for ocular toxicity assessment with the aim of replacing the *in vivo* Draize test. These methodologies include 2- or 3-dimensional cell-based approaches, *ex vivo* tissues (OECD 491, 2018; OECD 492, 2018), and techniques that evaluate different endpoints in the cornea and conjunctiva, such as cytotoxicity, opacity, permeability, and vascular inflammation (OECD 438, 2018; OECD 437, 2017). In particular, the Hen Egg Chorion-Allantoic membrane (HET-CAM) assay (Steiling, 1994) is currently undergoing validation as an alternative test of ocular toxicity, for evaluating vascular alterations induced by chemicals, by the Brazilian Center for Validation of Alternative Methods. In this context, in the last years our group focused on the application of such techniques for eye toxicity assessment of different test materials, including isolated chemicals and complex mixtures (Oliveira et al., 2015; Ávila et al., 2017a; Moreira et al., 2017; Silva et al. 2018).

In general, ocular injury involves damage or irritation to epithelial and stromal cells, membrane phospholipid saponification, protein precipitation, inflammation, and aberrant vascular events in the conjunctiva. In addition to these ocular injury mechanisms, the depth of damage induced in the cornea often correlates with the severity of the ocular toxicity response. Thus, the potential ocular toxicity of chemicals or mixtures can be evaluated through assessment of damage to different corneal components (Grant, 1974; Maurer et al., 2001; Maurer, Parker and Jester, 2002).

In order to support regulatory discussion and decision, the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) has developed a science-based approach for C&L using existing information associated with evaluation of toxicological testing strategies called the Integrated Approach Testing Assessment (IATA). Although the IATA approach recommends animal testing only be performed as the last option for evaluation of ocular toxicity (OECD 263, 2017), as mentioned before, *in vivo* testing is currently a legal main requirement in ANVISA's regulation for registration of agrochemical formulations.

ANVISA's scheme for classification of ocular toxicity is different from other systems, especially the Globally Harmonized System (GHS). These classification schemes were built using animal data, specifically using the Draize test in rabbits (OECD 405, 2017). In principle, the Draize test distinguishes between irreversible and reversible ocular lesions in rabbits, providing a scoring system to relatively categorize

severity 1, 24, 48, and 72 h and 7, 14, and 21 d after test substance application (OECD 405, 2017). Local damage and its reversibility are parameters used in the classification of ocular toxicity responses evaluated by several regulatory agencies. The United Nations (UN) GHS scheme uses a single harmonized hazard category (Category 1) for substances that cause serious, irreversible ocular damage and another for reversible damage (Category 2) that includes subcategories (2A or 2B) related to the time taken to reverse irritant effects. The Brazilian criteria for classification of ocular toxicity is comprised of four categories (Classes I-IV) related to the injury, damage, or irritation produced (Brazil, 1992). Class I agrochemical formulations are considered extremely toxic according to this classification scheme, causing irreversible or reversible corneal opacity within 7 d or persistent irritation, while Classes II-IV do not elicit opacity and cause reversible irritation for different period of time (Class II, 7 d; Class III, 72 h; Class IV, 24 h). In the Brazilian scheme, opacity and iritis are not quantitatively measured, that is, once opacity is observed, the substance is considered to cause severe ocular damage (**Table 1**).

**Table 1:** Overview of ANVISA and UN GHS classification criteria for chemical-induced ocular irritation

	<b>Toxicity class I</b>	<b>Toxicity class II</b>	<b>Toxicity class III</b>	<b>Toxicity class IV</b>
<b>Brazil ANVISA</b>	<b>Corneal opacity</b> reversible or not within <b>7 days</b> or persistent irritation of the ocular mucosa	No corneal opacity and with reversible irritation of the ocular mucosa within <b>7 days</b>	No corneal opacity and reversible irritation of ocular mucosa within <b>72 hours</b>	No corneal opacity and reversible irritation of ocular mucosa within <b>24 hours</b>
	<b>Category 1</b>	<b>Category 2 A</b>	<b>Category 2 B</b>	<b>No Category</b>
<b>UN GHS</b>	<b>Corneal opacity</b> ( $\geq 3$ ), iritis ( $> 1.5$ ) or irritation persistent for <b>21 days</b> . Irreversible damage to the cornea, iris, or conjunctiva	<b>Corneal opacity</b> ( $\geq 1$ ), iritis ( $\geq 1$ ), conjunctival redness ( $\geq 2$ ) or chemosis ( $\geq 2$ ) reversible within <b>21 days</b>	<b>Corneal opacity</b> ( $\geq 1$ ), iritis ( $\geq 1$ ), conjunctival redness ( $\geq 2$ ) or chemosis ( $\geq 2$ ) reversible within <b>7 days</b>	Minimal effects

ANVISA, Brazilian Health Surveillance Agency (Agência Nacional de Vigilância Sanitária); UN GHS, United Nations Globally Harmonized System.

Given the information mentioned above, and considering that using a single *in vitro* test alone is not possible C&L products, the present study aimed to address the applicability of a non-animal platform for eye toxicity assessment of agrochemical formulations. In particular, this tiered strategy was designed to allow the classification

of agrochemicals commercialized in Brazil based on a mechanistic approach, minimizing the use of live animals.

## 2. Material and Methods

### 2.1 Materials

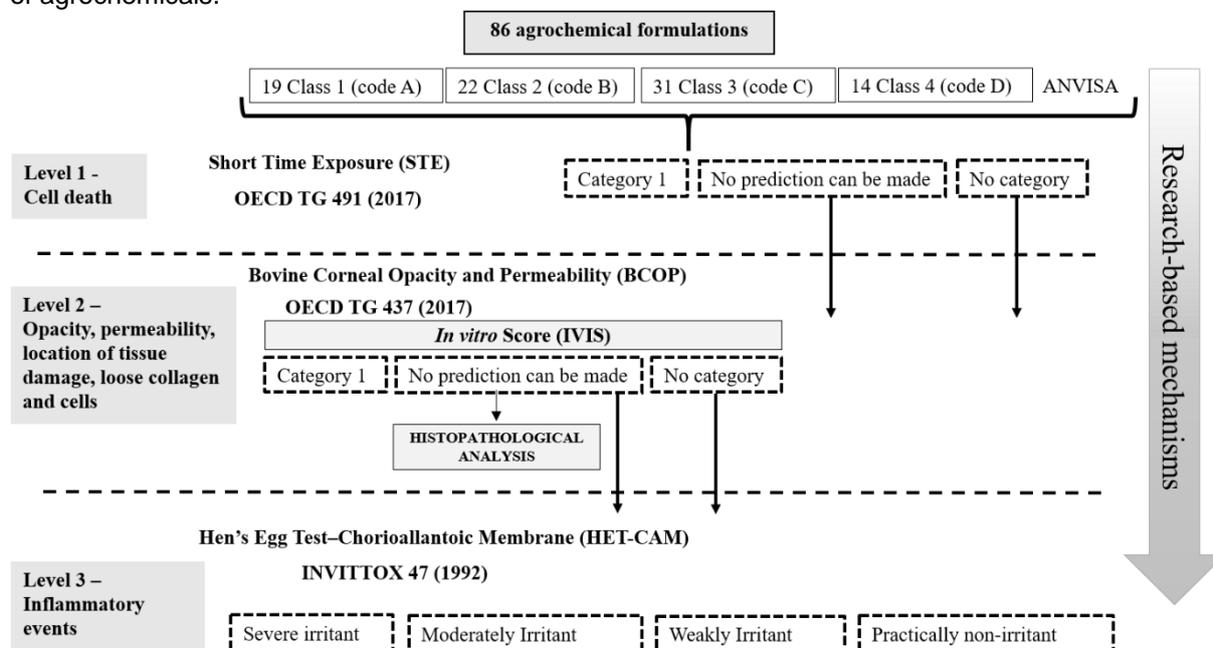
The agrochemical formulations used were obtained from the commercial Brazilian market. Eighty-six agrochemical formulation samples were separated and cataloged according to their ANVISA-registered ocular toxicological class (from 86 formulations: 19 Class I, 22 Class II, 31 Class III, and 14 Class IV). Agrochemical formulations used in this study were liquid and belonging to different formulation types, including soluble concentrate (SO), emulsifiable concentrate (EC), concentrated suspension (CS) and oil in water emulsion (EW). Since these formulations are in Brazilian market, the *in vivo* data regarding toxicological assessment with their UN GHS classification were not available to provide. All formulations were aliquoted into tapered tubes and identified according to a specific code (A-D) corresponding to their classification (A = I, B = II, C = III, and D = IV). This procedure was performed to facilitate the handling and codification of samples. Benzalkonium chloride, imidazole, trichloroacetic acid, 2,6-dichlorobenzoyl chloride, ethyl-2-methylacetoacetate, sodium hydroxide, glycolic acid, cyclopentanol, polyethylene glycol-400, glycerol, dimethyl sulfoxide, sodium fluorescein, Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS), Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM), Dulbecco's Modified Eagle's Medium, fetal bovine serum (FBS), penicillin, streptomycin, sodium chloride, and formaldehyde were acquired from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Octanol and Tween-20 were obtained from Avantor Performance Materials (Center Valley, PA, USA), Vetec (Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brazil), and Invitrogen (Gibco, New York, USA), respectively.

### 2.2 Tiered approach for assessing ocular irritation based on mechanistic endpoints

The tiered approach was used to assess the range of ocular irritation classifications of agrochemical formulations by combining three *in vitro* methodologies. Short Time Exposure (STE) analysis was used as the first tier because it is relatively easy, fast, and has a low false-positive rate (OECD 491, 2018). For the second tier, the standard Bovine Cornea Opacity and Permeability (BCOP) assay was performed followed by an additional histopathological analysis (OECD 437, 2017). Finally, the HET-CAM assay was performed (third tier) to confirm data obtained in the second tier [Fig. 1] (Spielmann, 1992; Luepke, 1985; ICCVAM, 2010). Agrochemical formulations categorized as "No Prediction Can Be Made" or "No Category" in the first

tier (STE assay) were submitted to second tier analysis (BCOP with histopathology) in order to be classified. In the third tier (HET-CAM assay), BCOP data were confirmed regarding the vascular aspects (hyperemia, coagulation, and hemorrhage).

**Fig. 1.** Flowchart of the *in vitro* tests that make up the 3-tiered platform for evaluating the ocular toxicity of agrochemicals.



### 2.2.1 Tier 1: STE, endpoint: analysis of cell death

SIRC cells (rabbit corneal cell line), originally from ATCC, were obtained from the Cell Bank of Rio de Janeiro, Brazil, and maintained in a cell culture oven at 37 °C, with an atmosphere of 5.0% CO<sub>2</sub> and controlled humidity. Cells were cultivated in Dulbecco's Modified Eagle's Medium supplemented with 10% fetal bovine serum (Invitrogen) and 1% penicillin/streptomycin. When the cells reached 80% confluence, they were lifted with trypsin-EDTA solution (Sigma-Aldrich) and collected.

The STE test was carried out according to OECD test guideline No. 491 (2018) (OECD 491, 2017). The proficiency of test was performed by our lab using the substances of reference according to the guideline, reaching values of cytotoxicity similar to those of the literature. Cells were seeded onto 96-well plates at  $6.0 \times 10^3$  or  $3.0 \times 10^3$  cells/well and cultured at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, and 96% relative humidity for 4 or 5 d, respectively, before being exposed to 200 µL of 0.05% or 5% of each agrochemical formulation dissolved in saline solution for 5 min. Exposures were performed in sextuplicate, and three independent tests were conducted for each

formulation. After agrochemical formulation exposure, the cells were washed twice with 200  $\mu$ L of saline solution, and 200  $\mu$ L of MTT solution (at 0.5 mg/mL) was added. After a 2 h incubation at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> in a humidified atmosphere, the MTT-formazan (produced by viable cells) was extracted with dimethyl sulfoxide for 15 min, and the absorbance of the solution was measured at 570 nm with an ultraviolet plate reader (Multiskan Spectrum, ThermoScientific). The same steps were performed with the control group (saline solution) and positive control (5% benzalkonium chloride, UN GHS Category 1).

Cell viability was compared to the solvent control (relative viability) to estimate the potential for serious ocular damage or irritation caused by each tested agrochemical formulation. Then, each formulation was classified according to cell viability as follows: UN GHS Category 1 (serious eye damage), both 0.05% and 5% agrochemical formulation exposure concentrations resulted in less than 70% cell viability; No Category (not classified for serious ocular damage or irritation), both 0.05% and 5% treatment concentrations resulted in greater than 70% cell viability; No Prediction Can Be Made, both 0.05% and 5% treatment concentrations resulted in less than or equal to 70% and greater than 70% cell viability.

#### *2.2.2 Tier 2: BCOP, endpoint: opacity, permeability, histopathological changes, location of tissue damage, and loose collagen*

The BCOP assay was used because ocular irritation mechanisms include alterations in corneal tissue, such as protein precipitation, phospholipid saponification, and epithelial stratum. The BCOP assay was performed according to OECD test guideline No. 437 [2017] (OECD 437, 2017) and its proficiency was performed in our lab prior the execution of this test. Briefly, bovine eyes (of animals aged between 12 and 60 months) were collected in a slaughterhouse immediately after slaughter, immersed completely in Hank's Balanced Salt Solution with 100 IU/mL penicillin and 100  $\mu$ g/mL streptomycin, and refrigerated in an ice-cold box. The integrity of the eyes was evaluated, and only those with translucent corneas without scratches or any other noticeable change were selected for analysis. The corneas from selected eyes were desiccated and coupled in specific BCOP holders consisting of an anterior chamber, which was exposed to the epithelial surface of the cornea, and a posterior chamber, which was exposed to the endothelial region. The two chambers were then filled with EMEM without phenol red and the BCOP device equilibrated at 32  $\pm$  1°C for at least 1

h. An opacitometer (OP KIT, Electro Design, Riom, France) was calibrated at 74, 150, and 224 opacity units, and the initial opacity reading (baseline) was performed. Only corneas showing up to 7 opacity units were used; corneas with more than 7 opacity units were discarded.

Corneal tissues were exposed to pure agrochemical formulations according to method A of guideline OECD 437/2017, which recommends the flowchart of steps for exposure of liquid substances and nonsurfactants. After 10 min of exposure, agrochemical formulations or controls (negative control, phosphate-buffered saline; positive control, 5% benzalkonium chloride) were removed from the anterior chamber, and the epithelium was washed at least three times to eliminate excess agrochemical. After a 2-h incubation at  $32^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , the EMEM in the anterior and posterior chambers were removed (in that order) and replaced with fresh EMEM. Corneal effects were measured by decreased light transmission (corneal opacity) using an opacitometer resulting in opacity values measured on a continuous scale. Then, EMEM was again removed from the anterior and posterior chambers and replaced by 1 mL of sodium fluorescein solution (at 4 mg/mL; anterior chamber) or fresh EMEM (posterior chamber). Holders were then incubated horizontally for  $90 \pm 5$  min at  $32^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . The amount of sodium fluorescein that crossed into the posterior chamber was measured with a spectrophotometer at 490 nm. Opacity and permeability values were determined by calculating the *In vitro* Irritancy Score [IVIS = opacity + (15 × permeability)]. The IVIS was used to classify the irritancy level of each agrochemical formulation as follows: UN GHS Category 1 (corrosive or severe irritant), IVIS > 55; No Category, IVIS ≤ 3; No Prediction Can Be Made,  $3 < \text{IVIS} \leq 55$ .

In addition, histopathology was performed to characterize the degree of corneal damage caused by each agrochemical formulation that could not be classified after performing the BCOP assay. After measurement of opacity and permeability, corneas were fixed in 10% phosphate-buffered formalin (pH 7.4) at room temperature then dehydrated in graded ethanol (70%–100%), cleared in xylene, embedded in paraffin, cut into 5- $\mu\text{m}$  sections using a microtome (Leica RM 2155, Heidelberg, Germany), and stained with hematoxylin and eosin. Histopathological slices were analyzed using a light microscope (Axio Scope A1 Carl Zeiss, Jena, Germany) at 20 $\times$  magnification. Images (AxioCam MRc Carl Zeiss camera) of each cornea exposed to each agrochemical and control were obtained, and histopathological changes of the corneal epithelium, stroma, and endothelium were investigated. Lesions of the corneal

epithelium were graded as described previously (Furukava et al., 2017). Numerical Histopathological score were assigned according to the location of the lesion as follows: 0, unremarkable; 1, slight: squamous cells; 2, mild: between squamous and upper wing cells; 3, moderate: from squamous to underneath wing cells; 4, severe: over basal cells. The irritation potential of each agrochemical in the corneal stroma was evaluated based on the extent of loose collagen bundles and swelling of keratocytes according to the histopathological decision criteria of the Academy of Managed Care Pharmacy Background Review Document: mild irritant, collagen matrix damage extending no further than the upper third of the corneal stroma; moderate irritant, collagen matrix damage extending no further than two-thirds of the way through the corneal stroma; severe irritant, collagen matrix damage extending into the lower third of the corneal stroma and/or causing damage to the endothelial cells.

### *2.2.3. Tier 3: HET-CAM assay, endpoint: vascular injury*

The HET-CAM assay was performed according to INVITTOX 47 [1992] (Spielmann, 1992; Luepke, 1985; ICCVAM, 2010) with adaptations. Reference substances to demonstrate technical proficiency were 0.9% (w/v) sodium chloride and 1% (w/v) sodium dodecyl sulfate in deionized water. Pure agrochemical formulations at 5% (w/v) were used. Briefly, fertile chicken eggs (Cobb 500) were kindly donated by São Salvador Alimentos (Itaberaí, GO, Brazil), cleaned, and then placed in an egg incubator (model IP35D, Premium Ecológica, MG, Brazil) with a rotating tray for 8 days at  $37.8^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  with 50%–60% relative humidity. On incubation day 9, rotation ceased and eggs were placed in the upright position with the air cell chamber facing up. The air cell of each egg (3 eggs/substance) was marked and cut off without cracking the outer shell. CAM surfaces were directly exposed to each agrochemical (0.3 mL) for 20s, washed at least three times with saline solution (5.0 mL), and observed for an additional 5 min. The exact onset time of observed vascular events (hyperemia, hemorrhage, and coagulation) were recorded, and a score was generated for each event based on the time it took to occur. Events occurring within 30 s of exposure were given hyperemia, hemorrhage, and coagulation scores of 5, 7, and 9, respectively. Those occurring between 30 s and 2 min were given hyperemia, hemorrhage, and coagulation scores of 3, 5, and 7, respectively, and those taking more than 2 min to occur scored a 1, 3, and 5, respectively. Summation of these scores resulted in a Mean Irritation Score (MSc) by which the data were evaluated: Severe irritant, MSc > 9;

moderate irritant,  $5 \leq \text{MSc} < 9$ ; weak irritant,  $1 \leq \text{MSc} < 5$ ; non-irritant,  $\text{MSc} < 1$ . The results were evaluated in association with all assays, and then related to the official ANVISA toxicological class for each agrochemical formulation.

#### *2.4 Statistical analysis*

Results were expressed as mean value  $\pm$  standard deviation in all experiments performed. For experiments related to the analysis of depth of injury by BCOP, the comparison between the groups was performed by analysis of variance (one-way ANOVA, 95% confidence interval) and Tukey tests, where  $P < 0.05$  was considered to be statistically significant. All analyses were performed using Graphpad Prism 5.0 software.

### 3. Results

#### 3.1 STE: assessment (Tier 1) of cytotoxicity

According to the OECD guideline n<sup>o</sup> 491, the STE test has a false-positive rate of 1% and a false-negative rate of 51% compared to the *in vivo* Draize test, when used to identify isolated chemicals inducing ocular damage (UN GHS Category 1) (OECD 491, 2018). In this work, all agrochemical formulations tested are known to be toxic to eyes (all has ability to induce ocular damage or irritation to eye), according to ANVISA classification, then, the STE was select as the first tier of the platform, in a Top Down approach. This choice was based on features of this test, such as faster and easier to perform in 86 samples, when compared to BCOP. Prior carry out the STE test method, our laboratory demonstrated technical proficiency correctly classifying the substances recommended for the method (data not shown). The benzalkonium chloride was used as positive control and saline solution as negative control. From the 86 agrochemical formulations, the investigation of cytotoxicity against rabbit corneal cells (SIRC) allowed categorize 73 products. Among them, 68 showed severe cytotoxic effects (cell viability <70%) for both, low and high concentrations, which consisting in 19 formulations from Class I, 17 from Class II, 24 from Class III and 8 from Class IV. Then these 68 products were assigned using *in vitro* method to UN GHS Category 1 (serious ocular damage). According to OECD TG 491 (2018), such chemicals can be classified without further testing.

Five formulations showed cell viability greater than 70% for both, low and high concentrations, and were categorized as “No Category”, including 2 products from Class III and 3 from Class IV. On the other hand, 13 products were categorized to the “No prediction can be made” category, including 5 formulations from Class II, 5 from Class III and 3 Class IV (**Table 2**). Considering the limitations of the STE method for identifying chemicals that do not require classification and its high false-negative rate, further tests are needed to confirm products categorized as “No Category” or “No Prediction Can be Made”, according to the OECD TG 491 (2018). Therefore, these 18 substances were further evaluated by BCOP followed by histopathological analysis.

**Table 2:** Short Time Exposure (STE) assessment of agrochemical-induced ocular cytotoxicity

Exposure	Cell Viability (%)		UN GHS <sup>a</sup>
	5%	0.05%	
NC	100	100	No category
PC	0.97 ± 0.2	1,5 ± 0.3	Category 1
A1	0.2 ± 0.3	48.77 ± 3.6	Category 1
A2	5.73 ± 3.5	45.36 ± 7.7	Category 1
A3	1.53 ± 1.9	2.4 ± 1.2	Category 1
A4	2.13 ± 2.3	37.24 ± 7.8	Category 1
A5	2.63 ± 1.4	48.14 ± 9.8	Category 1
A6	1.38 ± 1.1	49.84 ± 7.1	Category 1
A7	0.13 ± 0.1	35.66 ± 10	Category 1
A8	33.74 ± 9.0	42.09 ± 3.1	Category 1
A9	1.21 ± 0.4	6.41 ± 1.8	Category 1
A10	0.43 ± 0.3	4.84 ± 2.3	Category 1
A11	8.64 ± 2.5	17.68 ± 4.9	Category 1
A12	0.23 ± 2.1	17.32 ± 3.1	Category 1
A13	1.35 ± 0.4	9.41 ± 6.2	Category 1
A14	0.92 ± 0.7	43.42 ± 0.9	Category 1
A15	1.71 ± 0.14	32.96 ± 3.5	Category 1
A16	0.47 ± 0.1	44.44 ± 2.1	Category 1
A17	29.1 ± 2.3	41.85 ± 0.7	Category 1
A18	10.32 ± 0.9	39.14 ± 2.9	Category 1
A19	16.21 ± 3.1	32.39 ± 0.4	Category 1
B1	13.72 ± 2.3	71.22 ± 4.6	No prediction can be made
B2	41.71 ± 6	66.11 ± 2.8	Category 1
B3	0.29 ± 0	45.28 ± 8.9	Category 1
B4	32.8 ± 7.8	75.32 ± 5.8	No prediction can be made
B5	0.31 ± 0.3	44.51 ± 12	Category 1
B6	0.38 ± 0	36.97 ± 5.0	Category 1
B7	0.10 ± 0	43.22 ± 6.9	Category 1
B8	38.87 ± 5.2	56.17 ± 0.8	Category 1
B9	7.19 ± 3.9	57.15 ± 0.8	Category 1
B10	2.45 ± 0.3	54.53 ± 2.9	Category 1
B11	0.45 ± 0.2	57.07 ± 5.3	Category 1
B12	20.64 ± 4.3	48.77 ± 0.5	Category 1
B13	41.22 ± 0.2	70.61 ± 4	No prediction can be made
B14	8.82 ± 5.8	55.3 ± 3.4	Category 1
B15	0.77 ± 0.2	39.49 ± 1.5	Category 1
B16	46.3 ± 7.8	76.38 ± 2.2	No prediction can be made

B17	$51.78 \pm 8.1$	$70.42 \pm 3.1$	No prediction can be made
B18	$2.27 \pm 2.0$	$33.76 \pm 2.5$	Category 1
B19	$40.53 \pm 3.1$	$50.98 \pm 0.8$	Category 1
B20	$2.12 \pm 0.1$	$12.25 \pm 4.8$	Category 1
B21	$14.45 \pm 3.6$	$39.14 \pm 5.3$	Category 1
B22	$17.89 \pm 2.5$	$28.17 \pm 2.2$	Category 1
C1	$1.48 \pm 0.3$	$5.31 \pm 1.5$	Category 1
C2	$26.40 \pm 1.1$	$38.8 \pm 1.9$	Category 1
C3	$1.74 \pm 0.4$	$38.24 \pm 3.9$	Category 1
C4	$0.82 \pm 0.5$	$18.11 \pm 0.7$	Category 1
C5	$34.13 \pm 5.2$	$54.49 \pm 2.8$	Category 1
C6	$1.89 \pm 1.8$	$42.55 \pm 3.5$	Category 1
C7	$0.58 \pm 0.4$	$33.96 \pm 1.9$	Category 1
C8	$1.93 \pm 1.1$	$12.80 \pm 1.0$	Category 1
C9	$1.83 \pm 0.8$	$40.70 \pm 3.5$	Category 1
C10	$27.48 \pm 9.7$	$46.76 \pm 3.9$	Category 1
C11	$35.35 \pm 6.2$	$54.01 \pm 3.9$	Category 1
C12	$45.22 \pm 5.2$	$71.48 \pm 0.3$	No prediction can be made
C13	$40.87 \pm 10$	$58.15 \pm 5.2$	Category 1
C14	$45.99 \pm 7.8$	$61.69 \pm 2.3$	Category 1
C15	$9.86 \pm 2.9$	$51.76 \pm 5.4$	Category 1
C16	$50.26 \pm 0.9$	$99.82 \pm 0.4$	No prediction can be made
C17	$16.27 \pm 7.6$	$34.80 \pm 6.5$	Category 1
C18	$0.26 \pm 0.3$	$15.42 \pm 4.1$	Category 1
C19	$3.63 \pm 4.6$	$38.89 \pm 9.2$	Category 1
C20	$37.90 \pm 6.7$	$83.34 \pm 10$	No prediction can be made
C21	$2.71 \pm 0.2$	$10.69 \pm 6.9$	Category 1
C22	$8.38 \pm 0.7$	$15.18 \pm 4.5$	Category 1
C23	$33.83 \pm 2.6$	$55.91 \pm 8.6$	Category 1
C24	$64.76 \pm 2.1$	$94.93 \pm 0.8$	No prediction can be made
C25	$79.22 \pm 3.2$	$98.3 \pm 1.1$	No category
C26	$26.82 \pm 0.1$	$60.51 \pm 8.6$	Category 1
C27	$81.75 \pm 0.2$	$97.89 \pm 0.2$	No category
C28	$51.68 \pm 0.7$	$73.39 \pm 7.2$	No prediction can be made
C29	$0.99 \pm 0.4$	$43.73 \pm 4.9$	Category 1
C30	$0.19 \pm 0.1$	$48.22 \pm 6.3$	Category 1
C31	$20.87 \pm 2.9$	$42.19 \pm 3.1$	Category 1
D1	$0.65 \pm 0.3$	$79.72 \pm 0$	No prediction can be made
D2	$1.48 \pm 0.5$	$34.80 \pm 3.5$	Category 1

D3	25.33 ± 3.5	49.16 ± 3.2	Category 1
D4	70.34 ± 0.2	92.75 ± 3.4	No category
D5	36.11 ± 9.4	52.15 ± 4.3	Category 1
D6	72.71 ± 0.5	95.79 ± 0.8	No category
D7	1.36 ± 1.3	37.24 ± 2.1	Category 1
D8	0.23 ± 0.1	65.61 ± 2.3	Category 1
D9	43.06 ± 1.7	82.17 ± 0.3	No prediction can be made
D10	17.33 ± 4.7	79.35 ± 4.8	No prediction can be made
D11	26.36 ± 0.3	44.82 ± 5.7	Category 1
D12	77.82 ± 2.2	92.18 ± 2.6	No category
D13	35.04 ± 0.2	50.30 ± 4.5	Category 1
D14	27.29 ± 4.2	44.82 ± 5.8	Category 1

Data represent the mean ± standard deviation of three independent assays.

A-D, agrochemical codes corresponding to their Brazilian Health Surveillance Agency (ANVISA) ocular toxicological classification (A = Class I, B = Class II, C = Class III, and D = Class IV); NC, negative control (saline); PC, positive control (5% benzalkonium chloride).

<sup>a</sup>Classification according to United Nations Globally Harmonized System (UN GHS) classification.

### 3.2 BCOP Plus histopathological: assessment (Tier 2) of opacity, permeability, tissue damage, and loose collagen

BCOP followed by histopathological analysis was carried out on the 18 agrochemicals classified as “No Prediction Can Be Made” ( $n = 13$ ) and “No Category” ( $n = 5$ ) by STE testing. Excluding the alcohols and solid compound tests, conventional BCOP (without histopathology) has a false-positive rate of 20% and a false-negative rate of 8% compared to the *in vivo* Draize test. Prior to carrying out BCOP testing, our laboratory demonstrated technical proficiency in this technique (Data not shown). From the 18 agrochemicals investigated, 11 were assigned as “No Category” and 7 were classified as “No Prediction Can be Made” (**Table 3**).

**Table 3:** Bovine corneal opacity and permeability (BCOP)-histopathological assessment of depth and location of ocular injury induced by uncategorized agrochemicals

Exposure	Opacity	Permeability	IVIS	UN GHS <sup>a</sup>	Histopathological (epithelium/stroma) Score <sup>b</sup>
NC	2.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	2.0 ± 0.2	No Category	0
PC	74.0 ± 0.0	2.0 ± 0.2	92.5 ± 0.2	Category 1	4
B1	0.5 ± 0.7	0.0 ± 0.0	0.0 ± 1.1	No Category	-
B4	3.0 ± 1.4	0.0 ± 0.0	2.0 ± 0.7	No Category	-
B13	3.3 ± 0.7	0.0 ± 0.0	4.0 ± 0.3	No prediction can be made	1
B16	2.0 ± 1.4	0.0 ± 0.0	4.0 ± 0.8	No prediction can be made	3
B17	1.5 ± 1.0	0.0 ± 0.0	2.0 ± 0.2	No Category	-
C12	2.0 ± 1.4	0.0 ± 0.0	0.0 ± 1.4	No Category	-
C16	3.5 ± 2.1	0.0 ± 0.0	4.0 ± 0.5	No prediction can be made	3
C20	1.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	1.0 ± 1.9	No Category	-
C24	7.5 ± 2.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 2	No Category	-
C25	1.0 ± 1.4	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.7	No Category	-
C27	5.5 ± 2.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.1	No Category	-
C28	27.0 ± 1.4	0.0 ± 0.0	27 ± 2.4	No prediction can be made	0
D1	13.5 ± 3.5	0.1 ± 0.1	1.0 ± 0.9	No Category	-
D4	5.0 ± 1.4	0.0 ± 0.0	5.0 ± 1.6	No prediction can be made	1
D6	3.5 ± 0.7	0.0 ± 0.0	4.0 ± 0.5	No prediction can be made	4
D9	1.5 ± 0.7	0.0 ± 0.0	1.0 ± 0.3	No category	-
D10	10.0 ± 1.4	0.0 ± 0.0	10.0 ± 1.7	No prediction can be made	1
D12	5.5 ± 0.7	0.4 ± 0.0	0.0 ± 1.3	No category	-

Data represent the mean ± standard deviation of three independent assays.

IVIS, *In vitro* Irritancy Score; NC, negative control (phosphate-buffered saline); PC, positive control (5% benzalkonium chloride); B-D, agrochemical codes corresponding to their Brazilian Health Surveillance Agency (ANVISA) ocular toxicological classification (B = Class II, C = Class III, and D = Class IV)

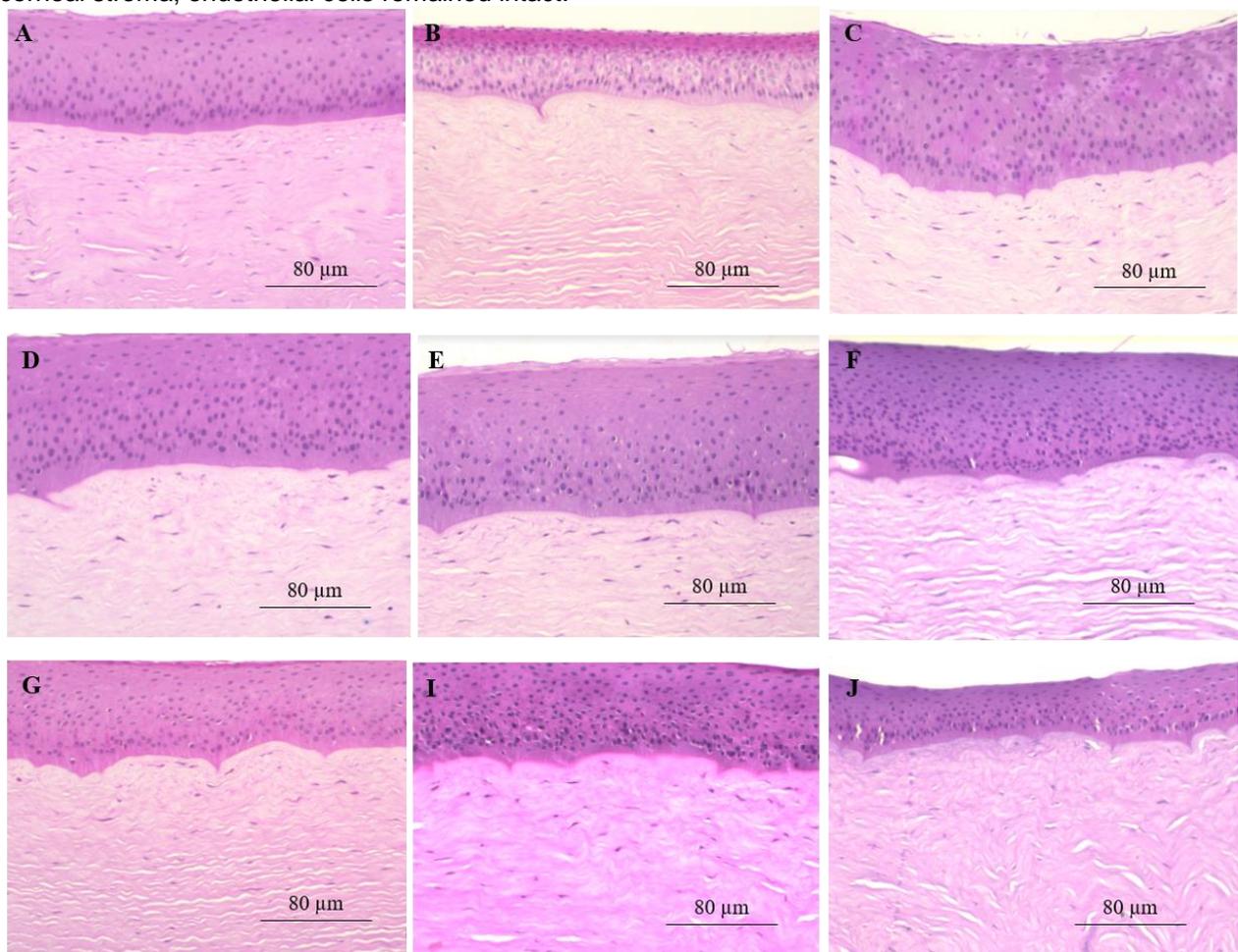
<sup>a</sup>Classification according to United Nations Globally Harmonized System (UN GHS) classification.

<sup>b</sup>Histopathological Score calculated according to the proposed by Furukawa *et al.* (2017). (-) means histopathological analysis was not performed.

Of the 11 formulations classified as “No Category” using conventional BCOP, 3 were given the same classification by STE testing. Moreover, 5 of the 7 formulations classified as “No Prediction Can be Made” by BCOP were assigned to this same category by STE test. Considering the 7 agrochemicals classified as “No Prediction Can be Made” by BCOP testing had an IVIS > 3, these samples were submitted to histopathological evaluation. Histopathological analysis enabled classification of the degree of damage induced by agrochemical exposure by considering the location of the lesion in the epithelium/stroma. Two of the 7 “No Prediction Can be Made”

formulations had histopathological scores of 0, meaning no important histological alterations were present, while 3 caused slight damage (crude matrices and slightly swollen nuclei) to cells of the squamous and wing layers of the epithelium (histopathological score = 1). The remaining 2 formulations caused vesicular damage and pyknotic nuclei in all basal cells of the epithelium and superior/medial portion of the stroma (loose collagen bundles) [histopathological score = 4] (**Fig. 2**).

**Fig. 2:** Histopathology of the bovine cornea. Hematoxylin and eosin staining; 20× magnification. **(A)** Negative control. Histopathological score = 0, unremarkable. The epithelium exhibited normal squamous, wing, and basal cell layers. The upper half of the corneal stroma showed normal collagen bundles and keratocytes. **(B)** Positive control. Histopathological score = 4, severe. Epithelial cells with various vesicles and pyknotic nuclei were prominent in squamous, wing, and basal cell layers. Basal cells exhibited spindle formations in the extracellular space. Loose collagen bundles are seen in the upper half of the corneal stroma, while endothelial cells remained intact. Samples B16 **(C)** and C28 **(D)** had a histopathological score = 0, unremarkable. The outermost squamous cells exhibited a slightly crude cell matrix causing desquamation of superficial cells. The epithelium exhibited normal squamous, wing, and basal cell layers. The upper half of the corneal stroma showed normal collagen bundles and keratocytes; endothelial cells remained intact. Samples B13 **(E)**, D4 **(F)**, and D10 **(G)** had a histopathological score = 1, slight. Crude matrices and slightly swollen nuclei were observed in the outermost squamous cells. No pathological changes were observed in the other elements of the corneal epithelium or stroma; corneal endothelial cells remained intact. Samples C16 **(H)** and D6 **(I)** had a histopathological score = 4, severe. Epithelial cells with vesicles and marked pyknotic nuclei were present in wing and basal cell layers. Loose collagen bundles were observed in the upper half of the corneal stroma; endothelial cells remained intact.



### 3.3 HET-CAM: assessment (Tier 3) of vascular injury

Since HET-CAM testing is highly sensitive (Gilleron et al., 1997; McKenzie et al., 2015), with a low rate of false-negatives, it was used to confirm BCOP results, especially for those agrochemicals classified as “No Category”. All 18 agrochemical formulations (pure and 5%) classified as “No Category” or “No Prediction Can be

Made” by STE testing had an MSc  $\geq 9$  and were categorized as severe irritants (**Table 4**). Moreover, all 18 agrochemicals showed coagulation and hemorrhage by CAM (**Fig. 3**).

**Table 4:** Hen egg chorion-allantoic membrane assessment of ocular inflammation induced by uncategorized agrochemicals

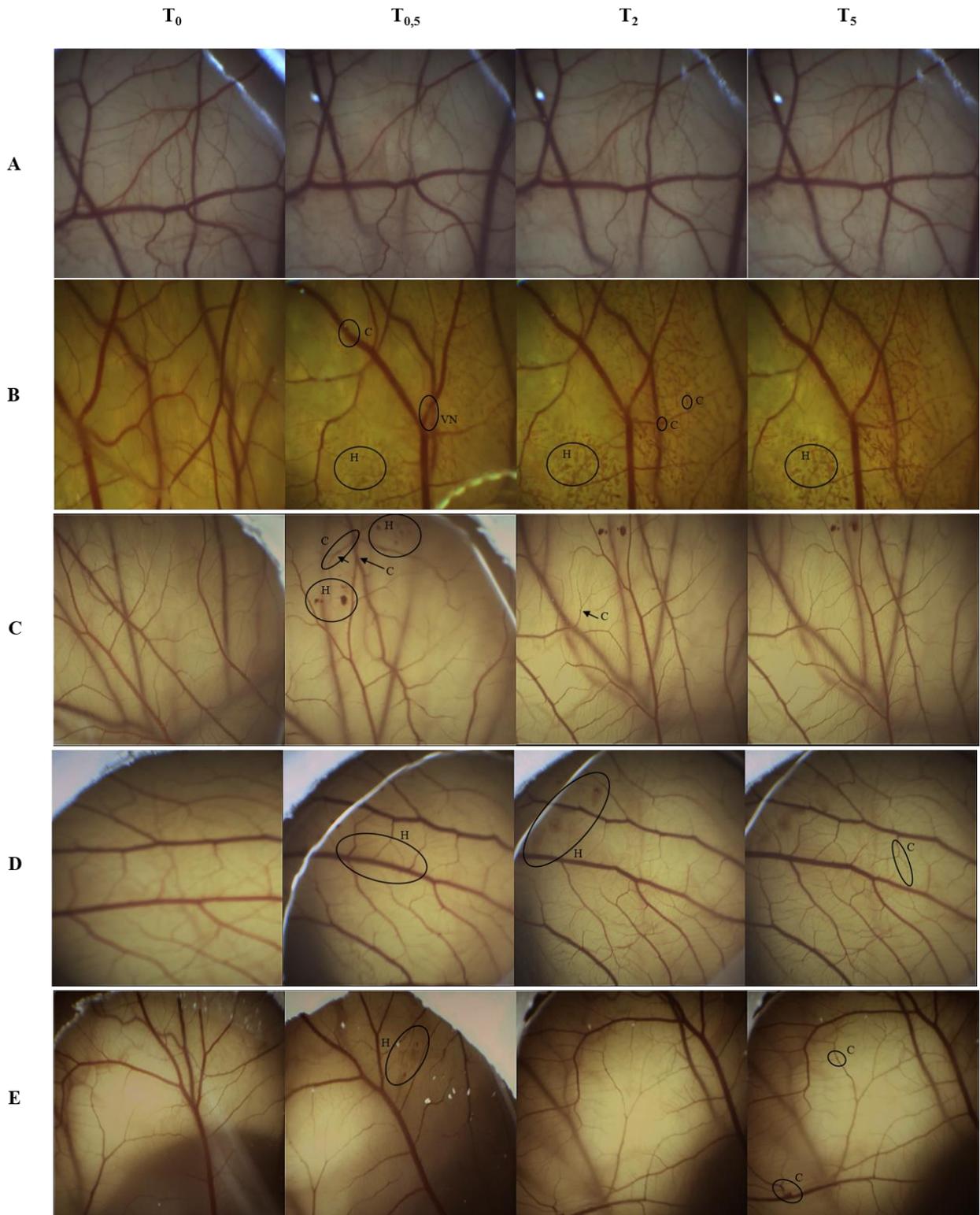
Exposure	Hyperemia	Hemorrhage	Coagulation	MSc	Classification
NC	-	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	Severe Irritant
PC	-	7.0 $\pm$ 0.0	9.0 $\pm$ 0.0	14.0 $\pm$ 0.0	Severe Irritant
B1	-	5.0 $\pm$ 0.0	7.0 $\pm$ 0.0	12.0 $\pm$ 0.0	Severe Irritant
B4	-	5.7 $\pm$ 1.2	7.0 $\pm$ 0.0	12.0 $\pm$ 0.0	Severe Irritant
B13	-	5.0 $\pm$ 0.0	6.3 $\pm$ 1.2	12.0 $\pm$ 0.0	Severe Irritant
B16	-	5.0 $\pm$ 0.0	7.0 $\pm$ 0.0	12.0 $\pm$ 0.0	Severe Irritant
B17	-	5.0 $\pm$ 0.0	7.0 $\pm$ 0.0	12.0 $\pm$ 0.0	Severe Irritant
C12	-	5.0 $\pm$ 0.0	7.0 $\pm$ 0.0	12.0 $\pm$ 0.0	Severe Irritant
C16	-	5.0 $\pm$ 0.0	7.0 $\pm$ 0.0	12.0 $\pm$ 0.0	Severe Irritant
C20	-	5.0 $\pm$ 0.0	7.0 $\pm$ 0.0	12.0 $\pm$ 0.0	Severe Irritant
C24	-	5.0 $\pm$ 0.0	7.0 $\pm$ 0.0	12.0 $\pm$ 0.0	Severe Irritant
C25	-	5.0 $\pm$ 0.0	7.0 $\pm$ 0.0	12.0 $\pm$ 0.0	Severe Irritant
C27	-	5.7 $\pm$ 1.2	7.0 $\pm$ 0.0	12.6 $\pm$ 0.9	Severe Irritant
C28	-	5.0 $\pm$ 0.0	7.0 $\pm$ 0.0	12.0 $\pm$ 0.0	Severe Irritant
D1	-	5.0 $\pm$ 0.0	7.0 $\pm$ 0.0	12.0 $\pm$ 0.0	Severe Irritant
D4	-	5.0 $\pm$ 0.0	7.0 $\pm$ 0.0	12.0 $\pm$ 0.0	Severe Irritant
D6	-	5.0 $\pm$ 0.0	7.0 $\pm$ 0.0	12.0 $\pm$ 0.0	Severe Irritant
D9	-	7.0 $\pm$ 0.0	7.0 $\pm$ 0.0	12.0 $\pm$ 0.0	Severe Irritant
D10	-	5.0 $\pm$ 0.0	7.0 $\pm$ 0.0	12.0 $\pm$ 0.0	Severe Irritant
D12	-	5.0 $\pm$ 0.0	7.0 $\pm$ 0.0	12.0 $\pm$ 0.0	Severe Irritant

Data represent the mean  $\pm$  standard deviation of three independent assays.

MSc, Mean Irritation Score; NC, negative control (saline); PC, positive control (1% sodium dodecyl sulfate); B-D, agrochemical codes corresponding to their Brazilian Health Surveillance Agency (ANVISA) ocular toxicological classification (B = Class II, C = Class III, and D = Class IV)

-Hyperemia was not visualized for any test material evaluated.

**Fig. 3:** Sequence of images illustrating the effects of 300  $\mu$ L of each agrochemical on the CAM over a 5-min period.  $T_0$ , healthy membrane;  $T_{0.5}$ , membrane at 0.5 min;  $T_2$ , membrane 2 min;  $T_5$ , membrane at 5 min. (A) Negative control (0.9% saline). (B) Positive control (1% sodium dodecyl sulfate). Representative ANVISA Class II (C), III (D), and IV (E) samples. C: coagulation; VN: vessel narrowing; H: hemorrhage.



Comparison of results obtained from the three *in vitro* tests (STE, BCOP, and HET-CAM) with the ANVISA registry revealed that all of the tested agrochemical formulations were listed as toxic to the eyes. Regarding this, STE assay classified formulations from ANVISA Classes I, II, III and IV as UN GHS Category 1, which means that these products led to significant cytotoxicity (<70% in both concentrations) and, consequently eye injury. On the other hand, BCOP associated with histopathology and HET-CAM methods classified products from Classes II, III and IV, demonstrating alterations in cornea functionality and structure, as well as vascular abnormalities. Association of these results allowed us to assign formulations into the different UN GHS categories considering the severity of the damage evaluated by *in vitro* methods, where formulations that induced only vascular alterations (HET-CAM) we suggest addressed as mild irritants (Category 2B) and products that induced vascular alterations associated with histopathological changes (BCOP) were addressed as moderate irritants (Category 2A). Based on this, we suggest that agrochemical formulations tested in this platform could be classified according to UN GHS system, where 68 of the agrochemical formulations tested could be assigned into UN GHS Category 1, 7 could be classified as Category 2A, and 11 could be assigned to Category 2B (**Table 5**).

**Table 5:** Comparison between ANVISA classification and the tiered method of the agrochemicals tested

		Brazil ANVISA toxicity class				
		Class I	Class II	Class III	Class IV	Total
<b>Tiered Method Based on Adverse Effect Found</b>	<b>Cytotoxicity</b>	<b>19</b>	17	24	8	68
	<b>Low opacity, corneal damage*, Coagulation, and hemorrhage</b>	-	2	2	3	7
	<b>Coagulation and hemorrhage</b>	-	3	5	5	11
	<b>No Effects Found</b>	0	0	0	0	0
	<b>Σ</b>	<b>19</b>	<b>22</b>	<b>31</b>	<b>14</b>	<b>86</b>

\*epithelial/stroma lesions; (-) means no parameter investigated since Class I formulations were categorized at tier 1 of the investigation.  
ANVISA, Brazilian Health Surveillance Agency (Agência Nacional de Vigilância Sanitária)

## 4. Discussion

Recently, the Consortium for *In Vitro* Eye Irritation, which developed tiered testing strategies for evaluation of ocular irritation to replace the Draize test, considered STE to be satisfactory for the assessment of liquids, nonsurfactants, and non volatile chemicals in a top-down or bottom-up approach (Adriaens et al., 2018). This notion was corroborated by Abo *et al.* (2018) who demonstrated good interlaboratory predictive performance and reproducibility with the STE test, concluding it to be a suitable alternative for predicting the ocular irritation potential of both substances and mixtures. Therefore, STE testing was used in the present study as the first tier of our *in vitro* testing platform due to its satisfactory predictive ability for mixtures and ease of execution. From 86 agrochemical formulations tested, 68 were categorized as UN GHS Category 1, 5 were classified as No Category, and 13 as No Prediction Can Be Made, according to UN GHS and based on *in vivo* studies. Since the endpoints adopted by ANVISA for classifying products for ocular irritation do not follow the UN GHS recommendations, it is not possible to establish, in an applied manner, the predictive performance of the STE test against the agrochemical formulations used in the present study. As shown, STE method classified as severe irritants (Category 1) formulations classified *in vivo* according to ANVISA scheme as moderately or slightly irritants. Similar results were obtained by Saito *et al.* (2015) who observed that mixtures, including agrochemicals, classified as non-irritant (No Category) using OECD TG 405 were classified as severe irritants (UN GHS Category 1) by the STE test.

The BCOP test provides the IVIS to predict the *in vitro* ocular irritation potential of a test substance from two primary endpoints (corneal opacity and fluorescein permeability) to indirectly measure the damage caused by topically applied substances (Gautheron et al., 1994). The histopathological analysis following the standard BCOP was done to classify lesions in the corneal epithelium and has been shown to be useful in predicting ocular injury induced by substances (Furukawa, 2015). In the present study, BCOP followed by histopathological analysis was chosen as the second tier of our *in vitro* testing platform. Of the 18 agrochemicals investigated, this method enabled assignment of 11 formulations as No Category and 7 as No Prediction Can Be Made. In addition, histopathological analysis of corneas exposed to agrochemicals classified as No Prediction Can Be Made facilitated classification of

the degree of damage induced, considering the location of tissue alterations in the corneal tissue. Similarly, Kolle *et al.* (2012) demonstrated that BCOP performed according to OECD TG 437 followed by histopathological evaluation enabled better prediction of their ocular irritant profile, especially those that could not be classified by BCOP alone (using only the IVIS), and could be applied to different classification schemes. In contrast, these authors reported that although association of BCOP and histopathology increased the sensitivity of the method, this parameter remains considerably limited for prediction of eye toxicity potential of products for the identification of ocular irritants (GHS Category 2) (Kolle *et al.*, 2015). These limitations reinforces the importance of using these alternative methods in an integrated manner and considering mechanistic endpoints for predicting irritation/damage profile.

The HET-CAM test has advantages, such as fast, ease to perform, low false negative rate, very important in toxicological assessment, and low cost. In contrast, the disadvantages includes the high sensitivity (over prediction of adverse effects) and the subjective nature, which require an expert to execute this assay. This assay is considered an appropriate alternative for evaluating ocular irritation potential of aqueous substances, especially surfactants and solvents, of non-detectable toxicity, considered, as that do not show ocular toxicity potential (categorized as non-irritants). In addition, in the case of severe irritants, including some agrochemicals the results of this *in vitro* method correlate relatively well with *in vivo* (Draize test) results (Budai *et al.*, 2010; Jang, *et al.*, 2014). In contrast, Schrage and coworkers (2010) reported an accuracy below 50% to predict UN GHS category 1, regarding the assessment of complex mixtures (Schrage *et al.*, 2010). Herein, the HET-CAM assay was used to as the third tier of our *in vitro* testing platform to confirm BCOP-histopathological assay results, especially for those agrochemicals formulations classified as No Category. All 18 No Category agrochemical formulations (pure or 5% diluted) were classified as severe irritants (MSc  $\geq$  9) showing coagulation and hemorrhage in the CAM.

In fact, HET-CAM assay classified as severe irritants samples identified as non-irritants in the other tiers of the platform. Although the subjectivity and high sensitivity of this method, which could contribute for an over prediction, we noticed the importance of this test to investigate possible effects in a vascularized membrane that resembles eye conjunctiva, associated to mild irritants (Gilleron *et al.*, 1997; McKenzie *et al.*, 2015). Thus, regarding the mechanistic approach of the proposed study, this method in conjunction with BCOP plus histopathological analysis allowed us, as a

suggestion, classify agrochemical formulations as moderated and mild irritants, UN GHS Categories 2A and 2B, respectively.

Completion of all three tiers (STE, BCOP+histopathological and HET-CAM) of our *in vitro* testing platform demonstrated that all of the agrochemical formulations tested in the present study were toxic to the eyes with different severities according considering ANVISA scheme. Moreover, this layered approach made it possible to distinguish between damage and irritation caused by commercial agrochemical formulations in Brazil. Similarly, different authors have shown that a tiered evaluation strategy, such as STE, BCOP-histopathology, and HET-CAM, is valid for assessment of chemical ocular toxicity (Hayashi et al., 2012a; Hayashi et al., 2012b; Rovida et al., 2015) and corroborate the cogency of the proposed platform to evaluate mixtures (Oliveira et al., 2015; Corvaro et al., 2017; Ávila, et al., 2017b).

It is well-known that isolated *in vitro* models do not provide exactly the same results as those obtained *in vivo*, and variations are expected (Maurer, Parker and Jester, 2002). It is also important to note that the *in vivo* model (Draize test) used by the Brazilian scheme (OECD TG 405, 2017), despite its applicability and international acceptance, has limitations. In particular, the Draize test has not undergone a formal validation and is often criticized due to its subjective and time-consuming nature, lack of repeatability, over prediction and high dose exposure requirements (Wilson, Ahearnes and Hopkinson, 2015). In addition, the criteria used for classification of ocular injury (damage or irritation) adopted by the Brazil and by UN GHS are not very similar. The Brazilian scheme only uses opacity (reversible or not within 7 days) to categorize the most toxic chemicals (Class 1) and does not establish a correlation between levels of opacity and irritation. On the other hand, UN GHS considers adverse events related to opacity, iritis, and vascular events (irreversible within 21 d) to categorize the most toxic products (Category 1) and sets threshold limits for opacity, iritis, redness, and chemosis.

Such differences in classification criteria contribute to divergence in ocular toxicological information between classification schemes (ANVISA and UN GHS) as demonstrated by Kollé *et al.* (2015) who compared the ocular toxicity of 97 liquid agrochemicals previously classified according to three different schemes [ANVISA, UN GHS, and United States Environmental Protection Agency (US EPA)] based on *in vivo* data. The authors observed that the various characterization criteria used resulted

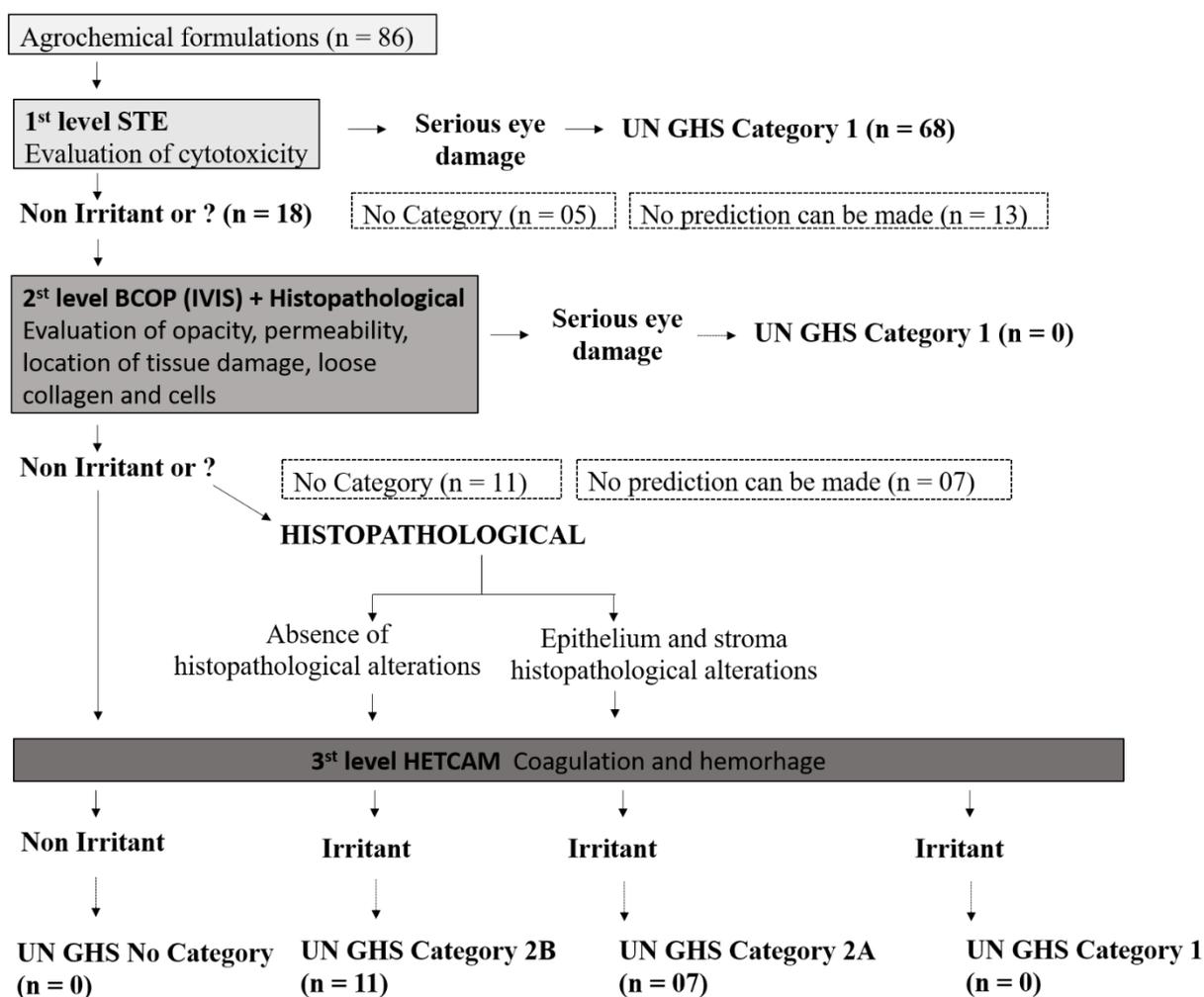
in different designations, especially in the Brazilian scheme (ANVISA). Thus, lack of harmonization is a major factor with immense economic and public health implications.

It is important to note that ANVISA is aware of the problems inherent to the toxicological classification of agrochemical formulations commercialized in Brazil, which are largely mixtures, and understands that its classification scheme requires adjustments in order to provide similar, more compatible results with the UN GHS. As such, in 2016, ANVISA proposed an alteration of in-force regulations regarding harmonization of the classification system, as well as acceptance/adoption of alternative methodologies for assessment of agrochemical formulations, including BCOP and STE, which is undergoing evaluation. This proposal demonstrates Brazil's interest in regulating the use of non-animal methodologies for toxicological evaluation of agrochemical formulations and adopting the C&L guidelines of the UN GHS. In this respect, the tiered approach used in the present study combining different *in vitro* methods may be useful for evaluating the ocular toxicity of agrochemical formulations registered in Brazil corresponding to the UN GHS without the use of live animals. Moreover, this platform can be used to provide necessary information for hazard communication, which should appear on the labels, and safety data sheets for these products.

## 5. Conclusion

Our 3-tiered *in vitro* approach to the assessment of ocular toxicity based on mechanisms enabled a classification corresponding UN GHS classification of agrochemical formulations, while minimizing use of live animals (**Fig. 4**). As a result, this study may provide scientific subsidies for the regulatory agency aimed at toxicological categorization of agrochemical formulation in Brazil and facilitate better global harmonization.

**Fig. 4:** Flowchart of the results of the 3-tiered *in vitro* approach for assessing ocular irritation based on mechanistic endpoints.



## Acknowledgements

The authors are grateful to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Financiadora de Estudos e Projetos, Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Goiás, and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior for their financial support. FAPEG,

## References

Abo, T., Hilbererc, A., Behle-Wagnerd, C., Watanabee, M., Cameronf, D., Kirstg, A., Nukadah, Y., Yukih, T., Arakia, D., Sakaguchih, H., Itagakib, H. 2018. Predictive performance and inter-laboratory reproducibility in assessing eye irritation potential of water- and oil-soluble mixtures using the Short Time Exposure test method. *Toxicology in Vitro*. 48, 78 - 85.

Adriaens E., Barroso J., Eskes C., Hoffmann S., McNamee P., Alépée N., Bessou-Touya S., De Smedt A., De Wever B., Pfannenbecker U., Tailhardat M., Zuang V., 2014. Retrospective analysis of the Draize test for serious eye damage/eye irritation: importance of understanding the in vivo endpoints under UN GHS/EU CLP for the development and evaluation of in vitro test methods. *Arch Toxicol*, 88, 701 - 723.

Adriaens, E., Sr Willoughby J.A., Meyer, B.R., Blakeman, L.C., Alépée, N., Fochtman, P., Guest, R., Kandarova, H., Verstraelen, S., Van Rompay, A.R. 2018. CON4EI: Short Time Exposure (STE) test method for hazard identification and labelling of eye irritating chemicals. *Toxicol In Vitro*. 49, 65-76.

Almeida, M.D., Cavendish, T.A., Bueno, P.C., Ervilha, I.C., Gregório, L.S., Kanashiro, N.B.O., Rohlf, D.B., Carmo, T.F.M., 2017. The flexibilization of the Brazilian legislation on pesticides and the risks to human health: analysis of Bill of Law 3,200/2015. *Reports in Public Health*. 33, 1 -11.

Ávila, R.I, Vieira, M.S., Gaeti, M.P.N., Moreira, L.C., Rodrigues, L.B., Oliveira, G.A.R., Batista, A.C., Vinhal, D.C., Menegatti, R., Valadares, M.C., 2017a. Toxicity evaluation of the photoprotective compound LQFM048: Eye irritation, skin toxicity and genotoxic endpoints. *Toxicol. In vitro*, 376, 83-93.

Ávila, R.I., Teixeira, G.C., Veloso, D.F.M.C., Moreira, L.C., Martins, E.L., Valadares, M.C., 2017b. In vitro assessment of skin sensitization, photosensitization and phototoxicity potential of commercial glyphosate-containing formulations. *Toxicol. In vitro*, 45, 386 – 392.

Barroso J., Pfannenbecker U., Adriaens E., Alépée N., Cluzel M., De Smedt A., Hibatallah J., Klaric M., Mewes K.R., Millet M., Templier M., McNamee P., 2016. Cosmetics Europe compilation of historical serious eye damage/eye irritation in vivo data analysed by drivers of classification to support the selection of chemicals for development and evaluation of alternative methods/strategies: the Draize eye test Reference Database (DRD). *Arch Toxicol*, 841 (91), 521-547

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS). Portaria nº 3, de 16 de janeiro de 1992. Ratifica os termos das "Diretrizes e orientações referentes à autorização de registros, renovação de registro e extensão de uso de produtos agrotóxicos e afins - nº 1, de 9/12/91". Disponível em: <http://www.brasilsus.com.br/legislacoes/anvisa/16889-3.html> Accessed on: March 20, 2017.

Budai, P., Lehel, J., Tavaszi, J. and Kormus, E. 2010. Het-cam test for determining the possible eye irritancy of pesticides. *Acta Veterinaria Hungarica*. 58, 369 – 377.

Corvaro, M., Gehen, S., Andrews, K., Chatfield, R., Macleod, F., Mehta, J., 2017. A retrospective analysis of in vivo irritation, skin irritation and skin sensitization studies with agrchemical formulations: Setting the scene for development of alternative strategies. *Regulatory Toxicol and Pharmacol.*, 89, 131 – 147.

FDA, 2015a. Nonclinical safety evaluation of reformulated drug products and products intended for administration by an alternate route.

FDA, 2015b. S10 Photosafety evaluation of pharmaceuticals - Guidance for industry.

Furukawa, M., Sakakibara, T., Itoh, K., Kawamura, K., Matsuura, M., Kojima, H., 2017. Suggestion of the updated IVIS cut-off values for identifying non-ocular irritants in the bovine corneal opacity and permeability (BCOP) assay. *Toxicol. In vitro*, 45, 19 – 24.

Furukawa, M., Sakakibara, T., Itoh, K., Kawamura, K., Sasaki, S., Matsuura, M. 2015. Histopathological evaluation of the ocular-irritation potential of shampoos, make-up removers and cleansing foams in the bovine corneal opacity and permeability assay. *Journal Toxicology Pathology*. 28, 243 – 248.

Gautheron, P., Giroux, J., Cottin, M., Audegond, L., Morilla, A., Mayordomo-Blanco, L., Tortajada, A., Haynes, G., Vericat, J. A., Pirovano, R., Gillio Toss, E., Hagemann, C., Vanparys, P., Deknudt, G., Jacobs, G., Prinsen, M., Kalweit, S., Spielmann, H., 1994. Interlaboratory assessment of the bovine corneal opacity and permeability (BCOP) assay. *Toxicology In Vitro*. 8, 381-392.

Gilleron, L., Coecke, S., Sysmans, M., Hansen, E., Van Oproy, S., Marzin, D., Van Cauteren, H., Vanparys P., 1997. Evaluation of the HET-CAM-TSA method as an Alternative to the Draize Eye Irritation Test. *Toxicology In Vitro*. 11, 641-644.

Grant, W.M., 1974. *Toxicology of eye*, third edition, Charles C. Thomas Publisher, Springfield.

Hayashi, K., Mori, T., Abo, T., Koike, M., Takahashi, Y., Sakaguchi, H., Nishiyama, N., 2012. A tiered approach combining the short time exposure (STE) test and the bovine corneal opacity and permeability (BCOP) assay for predicting eye irritation potential of chemicals. *J Toxicol Sci*. 37, 269-80a.

Hayashi, K., Mori, T., Abo, T., Ooshima, K., Hayashi, T., Komano, T., Takahashi, Y., Sakaguchi, H., Takatsu, A., Nishiyama, N., 2012. Two stage bottom-up tiered approach combining several alternatives for identification of eye irritation potential of

chemicals including insoluble or volatile substances. *Toxicol. In Vitro*, 989 (26), 1199-208b.

ICCVAM, 2010. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods. ICCVAM-Recommended Test Method Protocol: Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) Test Method. NIH Publication N°: 10 – 7553.

Jang, Y., Kim, J.E., Jeong, S.H., Cho, M.H., 2014. Towards a Strategic Approaches in Alternative Tests for Pesticide Safety. *Toxicol. Res.*, 30, 159 – 168.

Kolle, S.N., Buechse, A., Knieriem, T., Mayer, W., Rey Moreno M., van Cott, A., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R. Predicting eye irritation of agrochemical formulations according to different classification schemes by in vitro methods (bovine corneal opacity and permeability and epioocular eye irritation test). 2012. *Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie*. Conference: 78th Annual Congress of the, Volume: 385.

Kolle, S.N., Moreno, M.C.R., Mayer, W., Cott, A., Ravenzwaay, B., Landsiedel, R., 2015. The EpiOcular™ eye irritation test is the method of choice for the in vitro eye irritation testing of agrochemical formualtions: correlation analysis of epioocular eye irritation test and BCOP and teste dada according to the UN GHS, US EPA and Brazil ANVISA classification schemes. *ATLA*, 43, 181 – 198.

Luepke, N.P., 1985. Hen's Egg Chorioallantoic Membrane Test for Irritation Potencial. *Food and Chemical Toxicology*. 23 (2),287-291.

Maurer, J.K., Molai, A., Parker, R.D., Li, L., Carr, G. J., Petroll, W.M., Cavanagh, H.D., Jester, J.V., 2001. Pathology of Ocular Irritation with Bleaching Agents in the Rabbit Low-Volume Eye Test. *Toxicol. Pathol.* 29, 308-319.

Maurer, J.K., Parker, R.D., Jester, J.V., 2002. Extent of initial corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: Key findings and recommendations for the development of alternative assays, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 36,106 – 117.

McKenzie, B., Kay, G., Matthews, K.H., Knott, R.M., Cairns, D., 2015. The hen's egg chorioallantoic membrane (HET-CAM) test to predict the ophthalmic irritation potential of a cysteamine-containing gel: Quantification using Photoshop® and ImageJ, *Interational Journal of Pharmaceutics*, 490, 1-8.

Moreira, L.C., Ávila, R.I., Veloso, D.F.M.C., Pedrosa, T.N., Lima, E.S., Couto, R.O., Lima, E.M., Batista, A.C., Paula, J.R., Valadares, M.C., 2017. In vitro safety and efficacy evaluations of a complex botanical mixture of *Eugenia dysenterica* DC. (Myrtaceae): Prospects for developing a new dermocosmetic product. *Toxicol. In vitro*, 45, 397-408.

OECD, 2015. OECD Guideline for Testing of Chemical, nº 491: Short Time Exposure In Vitro Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious. Publishing July 2015.

OECD, 2017. OECD Guideline for Testing of Chemical, nº 405: Acute Eye Irritation/Corrosion, OECD Publishing October 2017.

OECD, 2017. OECD Guideline for Testing of Chemical, nº 437: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage. Publishing October 2017.

OECD, 2017. OECD Series on Testing and Assessment n. 263. Guidance Document on an Integrated Approach on Testing and Assessment (IATA) for Serious Eye Damage and Eye Irritation. Publishing Jul 2017.

OECD, 2018. OECD Guideline for Testing of Chemical, nº 438: Isolated Chicken Eye Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage. Publishing June 2018.

OECD, 2018. OECD Guideline for Testing of Chemical, nº 491: Short Time Exposure In Vitro Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage Publishing June 2018.

OECD, 2018. OECD Guideline for Testing of Chemical, nº 492: Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage. Publishing June 2018.

Oliveira, G.A.R., Ducas, R.N, Teixeira, G.C., Batista, A.C., Oliveira, D.P., Valadares, M.C., 2015. Short Time Exposuse (STE) teste in conjunction with Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) assay including histopathology to evaluate correspondence with the Globally Harmonized System (GHS) eye irritation classification ef textile dyes. *Toxicol. In vitro*, 29, 1283 – 1288.

Portaria Nº 3/MS/SNVS, de 16 de janeiro de 1992. Brasília, DF, Brazil: Imprensa Nacional.

Rovida, C., Alépée, N., Api, A., Basketter, D., Bois, F., Caloni, F., Corsini, E., Daneshian, M., Eskes, C., Ezendam, J., Fuchs, H., Hayden, P., Hegele-Hartung, C., Hoffmann, S., Hubesch, B., Jacobs, M.N., Jaworska, J., Kleensang, A., Kleinstreuer, N., Lalko, J., Landsiedel, R., Lebreux, F., Luechtefeld, T., Locatelli, M., Mehling, A., Natsch, A., Pitchford, J.W., Prater, D., Prieto, P., Schepky, A., Schüürmann, G., Smirnova, L., Toole, C., van Vliet, E., Weisensee, D., Hartung, T.. 2015. Integrated Testing Strategies (ITS) for safety assessment. *ALTEX*. 32, 25-40.

Saito, K., Miyazawa, M., Nukada, Y., Ei, K., Abo, T., Sakaguchi, H. 2015. Predictive performance of the Short Time Exposure test for identifying eye irritation potential of chemical mixtures. *Toxicology in Vitro*. 29, 617 – 620.

Schrage, A., Gamer, A. O., Ravenzwaay, B., Landsiedel, R., 2010. Experience with the HET-CAM Method in the Routine Testing of a Broad Variety of Chemicals and Formulations. *ATLA*, 38, 39-52.

Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alepée, N., Bufa, M., Clothier, R., Facchini, D., Falter, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Varlet, R.I., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Plannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielmann, H., Stokes, W., Truuba, K., Berghe, C.V., Guethem, F.V., Vassallo, M., Vinardell, P., Zuang, V., 2010. A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace in vivo studies using Bottom-Up and Top-Down approaches. *Toxicol in vitro* 24, 1 – 9.

Silva, A.C.G.; Chialchia, A.R., Ávila, R.I., Valadares, M.C., 2018. Mechanistic-based non-animal assessment of eye toxicity: Inflammatory profile of human keratinocytes cells after exposure to eye damage/irritant agents. *Toxicol. In vitro*, 292, 1-8.

Spielmann, H., Liebsch, M., 1992. HET-CAM TEST - The potential irritancy of compounds may be detected by observing adverse changes which occur in the chorionallantoic membrane of the egg after exposure to test chemicals. *ECVAM*. (INVITOX 47).

Steiling W., 1994. The Hen's EggTest on the Chorioallantoic Membrane (HET-CAM); *INVITTOX Protocol*, 96.

Verstraelena, S., Maglennonb, G., Hollandersa, K., Boonena, F., Adriaensc, E., Alépéed, N., Drzewieckae, A., Gruszkae, K., Kandarovaf, H., Willoughby Sr, J.A., Guestb, R., Schofieldb, J., Van Rompaya, A.R. 2018. Reprint of "CON4EI: Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) test for hazard identification and labelling of eye irritating chemicals". *Toxicology in Vitro*. 49, 53 – 64).

Wilson, S.L., Ahearnes, M., Hopkinson, A., 2015. An overview of current techniques for ocular toxicity testing. *Toxicol*. 327, 32 – 46.

## HISTOMORPHOMETRIC ANALYSIS OF THE CORNEAS: THE DEPTH OF DAMAGE INDUCED IN THE CORNEA CORRELATES WITH THE SEVERITY OF THE OCULAR TOXICITY

Wanessa Machado Andrade<sup>a</sup>; Artur Christian Garcia da Silva<sup>a</sup>; Marize Campos Valadares<sup>a\*</sup>.

<sup>a</sup>Laboratory of Education and Research in In Vitro Toxicology, Tox In, Faculty of Pharmacy, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil

\*Corresponding author: Faculdade de Farmácia - Universidade Federal de Goiás, Rua 240 esquina com 5<sup>a</sup> Avenida, s/n, Setor Universitário, Goiânia, GO 74605.170, Brazil. E-mail address: marizeufg@gmail.com (M.C. Valadares).

### ABSTRACT

**Introduction:** The *Bovine Corneal Opacity and Permeability* (BCOP) assay is an alternative method widely used to assess the ocular irritation/corrosion potential of chemicals and mixtures. The standard BCOP test provides information about permeability and opacity, however, histomorphometric analysis of the cornea have been recommended as an additional parameter to better categorize eye irritant products, in special to differentiate eye irritants of Category 1 from Category 2A and 2B. However, such analysis associated with analysis of depth of substance-induced corneal injury may provide additional scientific parameters for the refinement of BCOP.

**Objective:** The aim of this study was to measure the depth of injury to the bovine cornea induced by eye irritant substances from all *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals* (UN GHS) categories and associate it with severity of the damage.

**Material and Methods:** For the proficiency, 12 substances belonging to UN GHS categories (Category 1, 2A and 2B) were selected. Bovine Corneal Opacity and Permeability assay was performed according to OECD Guide 437, 2017 for *in vitro* irritancy score (IVIS) determination. Additionally, after the assay of permeability with fluorescein, the corneas used were included in Tissue-Tek O.C.T compound at -20 ° C, sections of 5 µm thickness were obtained in the cryostat, which were stained with the nuclear dye Hoechst 33342 at 0.5 µm/ml. Each section was analyzed by fluorescence microscopy and 5 measurements of permeation depth of fluorescein were obtained relative to the total thickness of the epithelium.

**Results:** the results showed that the fluorescein permeation depth was directly proportional to the degree of irritation of the substances tested. Severe irritants, Cat 1, promoted the highest rates of permeation followed by moderate and mild irritants. Non-irritant substances, in turn, showed similar permeation indexes to negative control.

**Conclusion:** The refinement of BCOP by depth of injury analysis through epithelial permeation of fluorescein can be considered a useful quantitative parameter to better categorize eye irritants.

**Keywords:** Alternative methods; eye irritation; United Nations Globally Harmonized System (UN GHS); Draize test, cornea.

## 1. Introduction

The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) assay is an alternative method widely used to assess the ocular irritation/corrosion potential of chemicals and mixtures. This assay is used to distinguish non-irritants (No category) from severe irritants (Category 1) in the United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (UN GHS) (OECD, 437, 2017). One limitation of this test is not categorize mild-irritating substances (Category 2 A and B). The standard BCOP test provides information about permeability and opacity, however, microscopic analysis of corneal structure of the cornea have been recommended as an additional parameter to better categorize eye irritant products, in special to differentiate eye irritants of Category 1 from Category 2A and 2B.

Furukawa, et al., 2017, suggested an updated of the IVIS cut-off values for identifying non-ocular irritants in the bovine corneal opacity and permeability (BCOP) assay based on analysis of the recovery of corneal lesions histopathologically. However, such analysis associating the depth of corneal damage induced by test substances and severity of damage was not totally scientifically demonstrated as an additional parameter for refinement of the BCOP test. Therefore, the aim of this study was to measure the depth of injury to the bovine cornea induced by eye toxicant substances from all UN GHS. We investigated the depth of fluorescein permeation in bovine cornea as an additional endpoint for a mechanistic approach for eye damage.

## 2. Material and Methods

### 2.1 Materials

Bovine eyes (of animals aged between 12 and 60 months) were collected in a slaughterhouse, benzalkonium chloride, imidazole, trichloroacetic acid, 2,6-dichlorobenzoyl chloride, ethyl-2-methylacetoacetate, sodium hydroxide, glycolic acid, cyclopentanol, polyethylene glycol-400, glycerol, dimethyl sulfoxide, sodium fluorescein, Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS), Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM), Dulbecco's Modified Eagle's Medium, fetal bovine serum (FBS), penicillin, streptomycin, sodium chloride, and formaldehyde were acquired from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Octanol and Tween-20 were obtained from Avantor Performance Materials (Center Valley, PA, USA), Vetec (Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brazil), and Invitrogen (Gibco, New York, USA), respectively.

### 2.2 Bovine corneal opacity and permeability (BCOP) assay: depth of injury analysis

For this assay, BCOP test was conducted according to OECD TG 437 (2017) and was completed by evaluation of fluorescein permeation of corneal tissues after exposure to three substances from different UN GHS categories of ocular irritation (Category 1, 2A, and 2B) compared to one with no category (non-irritant) (**Table 1**). Initially, the holders were disassembled after measurement of opacity and permeability, and corneas were carefully removed and transferred to Petri dishes containing saline to remove excess fluorescein. Transverse cuts were made in the central region of the cornea, and specimens were embedded in Tissue-Tek O.C.T. medium at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Then, 5- $\mu\text{m}$  sections were obtained using a cryostat (Leica, Biosystems), placed on glass slides, and stained with Hoechst dye (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 5 min. After, the tissue was washed with distilled water, and the slides were mounted and analyzed by fluorescence microscopy (Leica 4000 DMI). The depth of injury was assessed by measuring the ratio of fluorescein permeation in a specific region to the total corneal tissue extent. For this, tissue sizes and fluorescein measurements were performed in five different fields of each corneal tissue exposed to the different substances. The depth of the fluorescein permeation values for each substance were analyzed according to the UN GHS ocular irritation classification (Category 1, 2A, 2B, and No Category) and submitted to statistical analysis.

### 2.3 Statistical analysis

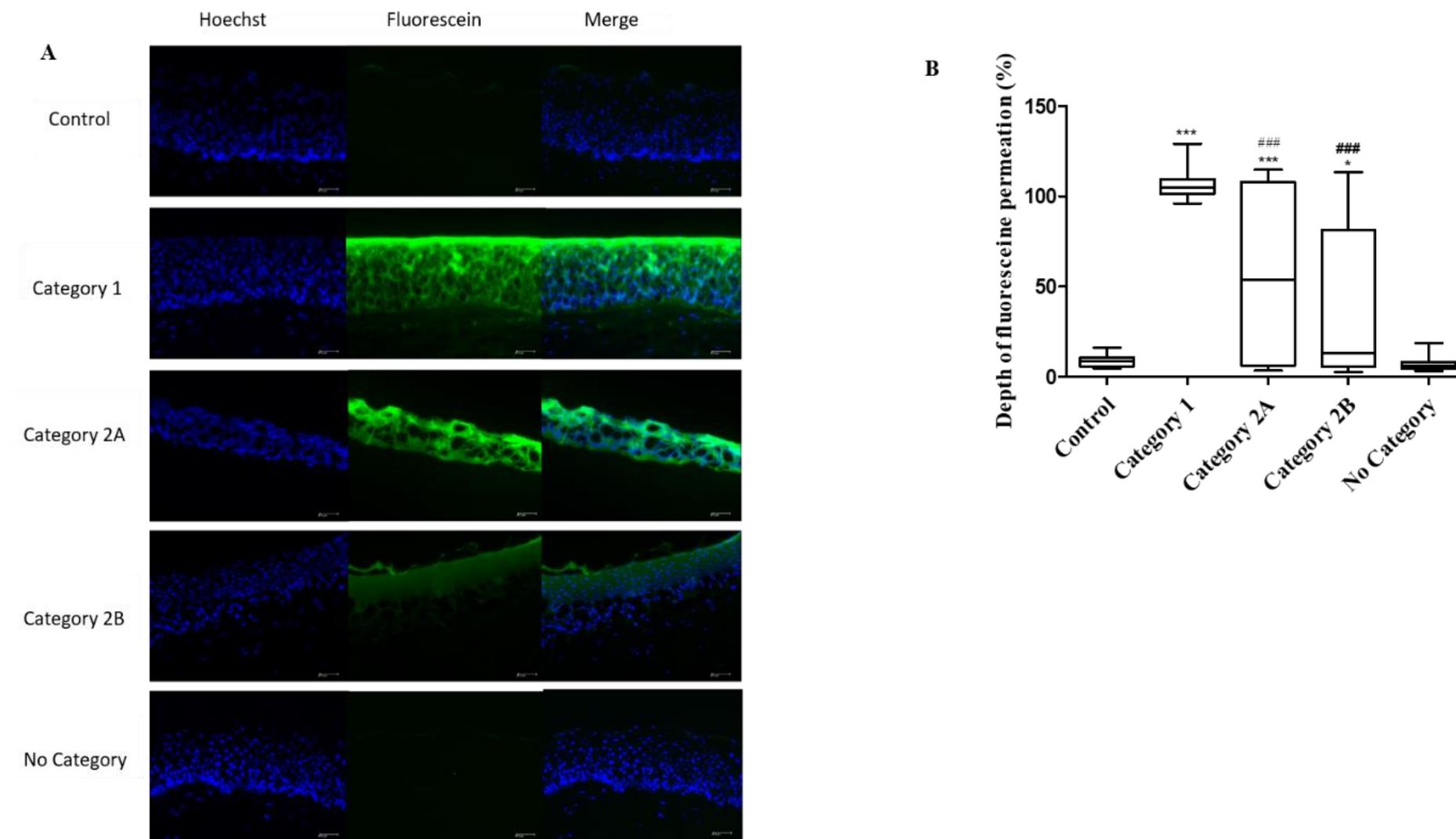
Results were expressed as mean value  $\pm$  standard deviation in all experiments performed. For experiments related to the analysis of depth of injury by BCOP, the comparison between the groups was performed by analysis of variance (one-way ANOVA, 95% confidence interval) and Tukey tests, where  $P < 0.05$  was considered to be statistically significant. All analyses were performed using Graphpad Prism 5.0 software.

### 3. Results

#### 3.1 Bovine corneal opacity and permeability (BCOP) assay: depth of injury analysis

BCOP analysis of the depth of injury induced by UN GHS Category 1, 2A, and 2B chemicals was conducted on bovine corneas. The fluorescein permeation depth into different corneal strata was directly proportional to the degree of injury produced by the substances tested (**Fig. 1**). Category 1 ocular toxicants showed the highest rates of corneal permeation (reaching the epithelium and stroma), followed by Category 2A (permeation of entire epithelium) and 2B (superior epithelium permeation) formulations. Neither the nonirritant substances (No Category) nor the negative control showed any permeation. The epithelium of corneas exposed to octanol could not be evaluated because this chemical caused total epithelium desquamation, preventing its measurement. In this analysis, 10 out of 12 agrochemicals tested (83.3%) were correctly categorized. Only 2,6-dichlorobenzoyl (Category 2A) and cyclopentanol (Category 2B) showed classification disagreement (**Table 1**).

**Fig. 1:** (A) Corneal sections stained with Hoechst dye showing fluorescein permeation throughout the epithelium. (B) Quantitative measurement of fluorescein permeation through epithelium grouped according to UN GHS ocular irritation categories. \* $P < 0.05$  compared to control; \*\*\* $P < 0.0001$  compared to control; ### $P < 0.0001$  compared to Category 1; #### $P < 0.0001$  compared to No Category.



**Table 1:** *In vitro* irritancy scores (IVIS) of reference substances according to the Organization for Economic Cooperation and Development guidelines

Test compound	BCOP		IVIS	Fluorescein permeation	UN GHS Classification (LFTC)	UN GHS Classification <sup>a</sup>	<i>In vivo</i> classification
	Opacity	Permeability					
Trichloroacetic acid (30%)	169.0 ± 1.4	1.7 ± 0.8	193.9 ± 5.3	107.7 ± 3.9	Category 1	Category 1	Category 1
Benzalkonium chloride (5%)	85.0 ± 2.2	2.0 ± 0.4	115.3 ± 1.3	107.3 ± 1.7	Category 1	Category 1	Category 1
Imidazole	67.5 ± 2.1	1.5 ± 0.1	90.3 ± 1.1	102.0 ± 0.3	Category 1	Category 1	Category 1
2,6-dichlorobenzoyl chloride	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.3 ± 0.1	6.7 ± 2.1	No category	No prediction can be made	Category 2A
Sodium hydroxide (1%)	74.5 ± 6.4	2.5 ± 0.0	49.6 ± 0.6	107.5 ± 5.9	No prediction can be made	No prediction can be made	Category 2A
Octanol	23.0 ± 0.0	1.8 ± 0.0	50.2 ± 1.9	*	No prediction can be made	No prediction can be made	Category 2A
Glycolic acid (10%)	17.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	17.2 ± 2.2	16.0 ± 0.1	No prediction can be made	No prediction can be made	Category 2B
Cyclopentanol	33.0 ± 0.7	2.5 ± 0.0	70.8 ± 2.7	95.3 ± 13.4	Category 1	No prediction can be made	Category 2B
Ethyl-2-methylacetoacetate	12.5 ± 2.1	0.0 ± 0.1	17.7 ± 0.1	4.9 ± 1.7	No prediction can be made	No prediction can be made	Category 2B
Glycerol	0.5 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.7 ± 0.1	9.2 ± 3.8	No category	No category	No category
Polyethylene glycol-400	0.5 ± 0.7	0.0 ± 0.0	0.6 ± 0.1	5.5 ± 1.1	No category	No category	No category
Tween-20 (10%)	0.5 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.5 ± 0.1	5.7 ± 0.4	No category	No category	No category

<sup>a</sup>Data obtained in the proficiency of bovine opacity and permeability (BCOP), short time exposure (STE), or European Center for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (ECETOC) database.

\* Octanol induced the complete loss of epithelial stratum not allowing the measurement.

Data represent the mean ± standard deviation of three independent assays.

UN GHS, United Nations Globally Harmonized System; LFTC, Laboratory of Cellular Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal de Goiás.

#### **4. Discussion**

Knowing the relationship between the depth of the corneal lesion and the severity of the damage, permeation depth analysis can also be used to distinguish between eye damage and irritation (Furuka, et al, 2015; Furukava 2017). Considering the morphological structure of corneal epithelium, the ocular toxicity of substances is expected to correspond to the damage induced in different epithelial strata (Ashby, Garret and Willcox, 2014; Dua, Gomes and Singh, 1994). This notion was confirmed by the current results demonstrating that eye toxic substances classified as UN GHS Category 1 showed the highest rates of fluorescein corneal permeation, followed by Categories 2A and 2B. Nonirritant substances showed similar permeation depths as the negative control.

Thus, depth of injury analysis by conventional BCOP after ocular exposure to chemical substances could be a useful quantitative endpoint to better categorize ocular irritants whose damage is potentially reversible

## **5. Conclusion**

Since the depth of the corneal lesion induced by ocular toxic substances is related to the severity of the damage, the quantitative analysis of fluorescein epithelial permeation in the bovine cornea provided optimized information on the toxic ocular profile. Thus, it allowed a better categorization and differentiation of moderate and mild irritants.

## **Acknowledgements**

The authors are grateful to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Financiadora de Estudos e Projetos, Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Goiás, and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior for their financial support. FAPEG.

## References

Ashby, B.D., Garrett, Q., Willcox, M.D.P., 2014. Corneal Injuries and Wound Healing – Review of Processes and Therapies. *Austin Journal of Clinical Ophthalmology*. 1 (4), 1-25.

Dua, H.S., Gomes, J.A., Singh, A., 1994. Corneal epithelial wound healing. *Br Journal Ophthalmol*. 78 (5), 401-408.

Furukawa, M., Sakakibara, T., Itoh, K., Kawamura, K., Matsuura, M., Kojima, H., 2017. Suggestion of the updated IVIS cut-off values for identifying non-ocular irritants in the bovine corneal opacity and permeability (BCOP) assay. *Toxicol. In vitro*, 45, 19 – 24.

Furukawa, M., Sakakibara, T., Itoh, K., Kawamura, K., Sasaki, S., Matsuura, M. 2015. Histopathological evaluation of the ocular-irritation potential of shampoos, make-up removers and cleansing foams in the bovine corneal opacity and permeability assay. *Journal Toxicology Pathology*. 28, 243 – 248.

OECD, 2017. OECD Guideline for Testing of Chemical, nº 437: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage. Publishing October 2017.

O presente trabalho propôs uma nova abordagem baseada em parâmetros mecanísticos utilizando metodologias substitutivas ao modelo animal, a qual foi capaz de avaliar a toxicidade ocular e categorizar no Sistema Globalmente Harmonizado (GHS) formulações agrotóxicas comercializadas no Brasil. E além disso, com a avaliação da profundidade de dano causado na córnea pela mensuração da permeação da fluoresceína foi possível oferecer mais um parâmetro quantitativo útil ao método de Opacidade e Permeabilidade da Córnea Bovina, e assim permitiu uma melhor distinção entre as substâncias irritantes e não irritantes oculares. Sendo assim, o estudo permitiu a obtenção das seguintes conclusões:

- A comparação dos resultados obtidos nos três testes *in vitro* (STE, BCOP e HET-CAM) com o registro da ANVISA revelou que todas as formulações agrotóxicas testadas foram tóxicas para os olhos.

- Usando apenas os ensaios *in vitro* como eventos chave estabelecidos pelo GHS para categorização e rotulagem de substâncias tóxicas oculares: 68 formulações agrotóxicas foram categorizadas na Categoria 1, 7 na Categoria 2A, e 11 na categoria 2B.

- A profundidade da lesão da córnea induzida por substâncias tóxicas oculares está relacionada à gravidade do dano.

ADRIAENS, E. et al. CON4EI: Short Time Exposure (STE) test method for hazard identification and labelling of eye irritating chemicals. **Toxicology In Vitro**, Aalter, v. 44, n. 1, 2017.

ADRIAENS, E. et al. Retrospective analysis of the Draize test for serious eye damage/eye irritation: importance of understanding the in vivo endpoints under UN GHS/EU CLP for the development and evaluation of in vitro test methods. **Archives of Toxicology**, Bellem, v. 88, n. 1, p. 701-723, 2014.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, Glifosato prossegue sob análise na Anvisa. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. 08 de agosto 2017. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/resultado-de-busca?p\\_p\\_id=101&p\\_p\\_lifecycle=0&p\\_p\\_state=maximized&p\\_p\\_mode=view&p\\_p\\_col\\_id=column-1&p\\_p\\_col\\_count=1&\\_101\\_struts\\_action=%2Fasset\\_publisher%2Fview\\_content&\\_101\\_asSetEntryId=3501501&\\_101\\_type=content&\\_101\\_groupId=219201&\\_101\\_urlTitle=glifosato-prossegue-sob-analise-na-anvisa&redirect=http%3A%2F%2Fportal.anvisa.gov.br%2Fresultado-de-busca%3Fp\\_p\\_id%3D3%26p\\_p\\_lifecycle%3D0%26p\\_p\\_state%3Dnormal%26p\\_p\\_mode%3Dview%26p\\_p\\_col\\_id%3Dcolumn-1%26p\\_p\\_col\\_count%3D1%26\\_3\\_groupId%3D0%26\\_3\\_keywords%3Dglifosato%26\\_3\\_currency%3D1%26\\_3\\_struts\\_action%3D%252Fsearch%252Fsearch%26\\_3\\_format%3D%26\\_3\\_year%3D0%26\\_3\\_formDate%3D1441824476958%26\\_3\\_x%3D0&inheritRedirect=true](http://portal.anvisa.gov.br/resultado-de-busca?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&_101_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_asSetEntryId=3501501&_101_type=content&_101_groupId=219201&_101_urlTitle=glifosato-prossegue-sob-analise-na-anvisa&redirect=http%3A%2F%2Fportal.anvisa.gov.br%2Fresultado-de-busca%3Fp_p_id%3D3%26p_p_lifecycle%3D0%26p_p_state%3Dnormal%26p_p_mode%3Dview%26p_p_col_id%3Dcolumn-1%26p_p_col_count%3D1%26_3_groupId%3D0%26_3_keywords%3Dglifosato%26_3_currency%3D1%26_3_struts_action%3D%252Fsearch%252Fsearch%26_3_format%3D%26_3_year%3D0%26_3_formDate%3D1441824476958%26_3_x%3D0&inheritRedirect=true) Acesso em 23 de dezembro de 2017.

ALMEIDA, M.D. et al. The flexibilization of the Brazilian legislation on pesticides and the risks to human health: analysis of Bill of Law 3,200/2015. **Reports in Public Health**, Brasília, v. 33, n. 7, p. 1-11, 2017.

BARROSO, J. et al. Cosmetics Europe compilation of historical serious eye damage/eye irritation in vivo data analysed by drivers of classification to support the selection of chemicals for development and evaluation of alternative methods/strategies: the Draize eye test Reference Database (DRD). **Arch Toxicol**, v. 841, n. 91, p. 521-547, 2016.

BOMBARDI, L.M. **Geografia do uso de agrotóxicos no Brasil e conexões com a União Europeia**. São Paulo: FFLCH – USP, 2017.

BRASIL. Consulta Pública nº 260 de 10 de outubro de 2016. Critérios e exigências para avaliação toxicológica de agrotóxicos, componentes, afins e preservativos de madeira no âmbito da Anvisa **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 11 de outubro de 2016a. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/consultas-publicas#/visualizar/329016> Acesso em: 20 de dezembro de 2017.

BRASIL. Consulta Pública nº 261 de 10 de outubro de 2016. Diretrizes relacionadas às informações toxicológicas para rótulos e bulas de agrotóxicos, afins e preservativos de madeira, no âmbito da Anvisa. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília,

11 de outubro de 2016b. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/consultas-publicas#/visualizar/329016> Acesso em: 20 de dezembro de 2017.

BRASIL. Consulta Pública nº 262 de 10 de outubro de 2016. Critérios para classificação toxicológica de agrotóxicos, componentes, afins e preservativos de madeira e para comparação da ação tóxica de agrotóxicos e afins no âmbito da Anvisa. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 11 de outubro de 2016c. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/consultas-publicas#/visualizar/329016> Acesso em: 20 de dezembro de 2017.

BRASIL, **Decreto nº 4.074 de 4 de janeiro de 2002**. Regulamenta a Lei no 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/decreto/2002/D4074.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/D4074.htm) Acesso em 20 de março de 2017.

BRASIL. **Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989**. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências.

BRASIL. **Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS). Portaria nº 3, de 16 de janeiro de 1992**. Ratifica os termos das "Diretrizes e orientações referentes à autorização de registros, renovação de registro e extensão de uso de produtos agrotóxicos e afins - nº 1, de 9/12/91". Disponível em: <http://www.brasilsus.com.br/legislacoes/anvisa/16889-3.html> Acesso em: 20 de março de 2017.

DRAIZE, J. H.; WOODARD, G.; CALVERY, H. O. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Washington, v. 82, n. 3, p. 377-390, nov. 1944.

EGHRARI, A.O.; RIAZUDDIN, S.A.; GOTTSCH, J.D. Overview of the Cornea: Structure, Function, and Development. **Molecular Biology and Translational Scienc**. Baltimore, Maryland: Elsevier, 2015.

ESKES, C. et al. Eye irritation. **Alternative Laboratory Animals**, v. 33, n. 1, p. 47-81, 2005.

ESKES, C. et al. Validation study on the Ocular Irritation assay for eye irritation testing. **Toxicology In Vitro**, Agno, v. 28, n. 1, p. 1046-1065, mar. 2014.

FUKUDA, T. N. K.; FUKUSHIMA, A. Ocular Surface: Inflammation of the Conjunctiva. In: STAIN, J. **Reference Module in Neuroscience and Biobehavioral Psychology**. Oxford:Elsevier, 2017.

FURUKAWA, M. et al. Histopathological evaluation of the ocular-irritation potential of shampoos, make-up removers and cleansing foams in the bovine corneal opacity and permeability assay. **Journal Toxicology Pathology**, v. 28, p. 243 – 248, 2015.

GRANT, W. M. Survey of types of toxic effects involving the eyes or vision. In: THOMAS, C. C. **Toxicology of the Eye**. Illinois: Springer, 1974, cap. 1, p. 5-71.

HARTUNG, T. Toxicology for the twenty-first century. **Nature**, v. 460, n. 1, p. 208-212, 2009.

HAYASHI, K., et al. A tiered approach combining the short time exposure (STE) test and the bovine corneal opacity and permeability (BCOP) assay for predicting eye irritation potential of chemicals. **J Toxicol Sci**. v. 37, p. 269-80, 2012a.

HAYASHI, K., et al. Two stage bottom-up tiered approach combining several alternatives for identification of eye irritation potential of chemicals including insoluble or volatile substances. **Toxicol. In Vitro**, v. 989, n. 26, p. 1199-208, 2012b.

ICCVAM, Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods. ICCVAM-Recommended Test Method Protocol: Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) Test Method. NIH Publication N<sup>o</sup>: 10 – 7553, 2010.

ICCVAM, Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods. Short Time Exposure (STE) Test Method Summary Review Document, NIH. National Institute of Environmental Health Sciences, Triangle Park, NC NIH Publication, 2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, PAM 2016: valor da produção agrícola nacional foi 20% maior do que em 2015. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Comunicação social**. 21 de setembro de 2017. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/16814-pam-2016-valor-da-producao-agricola-nacional-foi-20-maior-do-que-em-2015> Acesso em 20 de dezembro de 2017

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS, Relatórios de comercialização de agrotóxicos. **Ministério do Meio Ambiente**. 20 de setembro de 2018. Disponível em: <https://www.ibama.gov.br/relatorios/quimicos-e-biologicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#sobreosrelatorios> Acesso em 28 de setembro de 2018.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013, cap. 23, p. 452-470.

KOJIMA H, et al. Second-Phase Validation of Short Time Exposure Tests for Assessment of Eye Irritation Potency of Chemicals. **Toxicol. In Vitro**, v. 27, p.1855-1869, 2013.

KOLLE, S. N. et al. The EpiOcular™ eye irritation test is the method of choice for the in vitro eye irritation testing of agrochemical formulations: correlation analysis of epioocular eye irritation test and BCOP and teste dada according to the UN GHS, US EPA and Brazil ANVISA classification schemes. **ATLA**, Germany, v. 43, p. 181–198, jul. 2015.

KREWSKI, D. et al. Toxicity testing in the 21st century: a vision and a strategy. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, v. 13, n. 1, p. 51-138, fev. 2010.

LOTZ, C. et al. Alternative Methods for the Replacement of Eye Irritation Testing. **ALTEX**, Würzburg, v. 33, n. 1, p. 55-67, 2016.

Luepke, N.P. Hen's Egg Chorioallantoic Membrane Test for Irritation Potencial. **Food and Chemical Toxicology**, v. 23, n. 2, p. 287-291, 1985.

MAURER, J. K. et al. Pathology of Ocular Irritation with Acetone, Cyclohexanol, Parauoroaniline, and Formaldehyde in the Rabbit Low-Volume Eye Test. **Toxicologic Pathology**, Ohio, v. 29, n. 2, p. 187-199, 2001.

MAURER, J. K.; PARKER, R. D.; JESTER, J. V. Extent of Initial Corneal Injury as the Mechanistic Basis for Ocular Irritation: Key Findings and Recommendations for the Development of Alternative Assays. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, Ohio, v. 36, n. 1, p. 106-117, 2002.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Agrotóxicos registrados no sistema de agrotóxicos fitossanitários (AGROFIT). **MAPA**. 30 de novembro de 2016. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/aceso-a-informacao/aco-es-e-programas/cartas-de-servico/defesa-agropecuaria-agrotoxicos/agrotoxicos-registrados-no-agrofit> Acesso em 23 de dezembro de 2017.

OECD, Organization for Economic Cooperation and Development. Guidelines for the Testing of Chemicals. Guidance Document on an Integrated Approach on Testing and Assessment (IATA) for Serious Eye Damage and Eye Irritation Series on Testing & Assessment No. 263, Paris, 2017a

OECD, Organization for Economic Cooperation and Development. Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 405. Acute Eye Irritation/Corrosion, Paris, 1981.

OECD, Organization for Economic Cooperation and Development. Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 405. Acute Eye Irritation/Corrosion, Paris, 2017b.

OECD, Organization for Economic Cooperation and Development. Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 437. Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage Paris, 2017c.

OECD, Organization for Economic Cooperation and Development. Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 438. Isolated Chicken Eye Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage, Paris, 2017d.

OECD, Organization for Economic Cooperation and Development. Guideline for Testing of Chemical, OECD 491: Short Time Exposure In Vitro Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious, Paris, 2015.

OECD, Organization for Economic Cooperation and Development. Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 491. Short Time Exposure In Vitro Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage, Paris, 2015.

OECD, Organization for Economic Cooperation and Development. Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 491. Short Time Exposure In Vitro Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage, Paris, 2017e.

OECD, Organization for Economic Cooperation and Development. Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 492, Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage, Paris, 2017f.

OECD, Organization for Economic Cooperation and Development. Revised Guidance Document on the Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) and the Isolated Chicken Eye (ICE) Test Methods: Collection of Tissues for Histological Evaluation and Collection of Data Series on Testing & Assessment n. 160, Paris, 2017g.

OLIVEIRA, G.A.R. et al. Short Time Exposure (STE) teste in conjunction with Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) assay including histopathology to evaluate correspondence with the Globally Harmonized System (GHS) eye irritation classification of textile dyes. **Toxicol. In vitro**, Goiânia, v. 29, p. 1283–1288, 2015.

PALAEZ, V. et al. A (des)coordenação de políticas para a indústria de agrotóxicos no Brasil. **Revista Brasileira de Inovação**, Campinas, São Paulo, v. 14, n. especial, p. 153-178, 2015.

PRINSEN, M. K.; KOETER, H. B. Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits. **Food and Chemical Toxicology**, v. 31, n. 1, p. 69-76, 1993.

RIOS, L.A. Estudo preliminar da aplicação do teste de opacidade e permeabilidade da córnea bovina (BCOP) na avaliação de toxicidade de agrotóxicos comercializados no Brasil. **Dissertação**. Curso de Toxicologia Aplicada à Vigilância Sanitária da Universidade Estadual de Londrina, 2014.

SAKAGUCHI H, et al. Validation Study of the Short Time Exposure (STE) Test to Assess the Eye Irritation Potential of Chemicals. **Toxicol. In Vitro** v. 25,p. 796-809, 2011.

SCOTT, L. ET AL. A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace in vivo studies using Bottom-Up and Top-Down approaches. **Toxicol in vitro**, v. 24, p. 1–9, 2010.

SILVA, A.C.G., et al. Mechanistic-based non-animal assessment of eye toxicity: Inflammatory profile of human keratinocytes cells after exposure to eye damage/irritant agents. **Toxicol. In vitro**, 292, 1-8.

SPIELMANN, H., Liebsch, M. HET-CAM TEST - The potential irritancy of compounds may be detected by observing adverse changes which occur in the chorionallantoic membrane of the egg after exposure to test chemicals. **ECVAM. (INVITOX 47)**, 1992.

STEILING, W. et al. The HET-CAM, a Useful In Vitro Assay for Assessing the Eye Irritation Properties of Cosmetic Formulations and Ingredients. **Toxicology In Vitro**, Dusseldorf, v. 13, n. 1, p. 375-384, 1999.

VERSTRAELEN, S. et al. Improvement of the Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) assay as an in vitro alternative to the Draize rabbit eye irritation test. **Toxicology In Vitro, Mol**, v. 27, n. 1, p. 1298-1311, mar. 2013.

VERSTRALEN, S.; ROMPAY, A. R. V. CON4EI: Development of serious eye damage and eye irritation testing strategies with respect to the requirements of the UN GHS/EU CLP hazard categories. **Toxicology In Vitro, Mol**, v. 44, n. 1, jun. 2017

WILHELMUS, K. R. The Draize Eye Test. **Survey of Ophthalmology**, Houston, v. 45, n. 6, p. 493-515, mai./jun. 2001.

WILSON S. L.; AHEARNE, M.; HOPKINSON, A. An overview of current techniques for ocular toxicity testing. **Toxicology**, Nottingham, v. 357, n. 1, p. 32-46, nov. 2015.

**Anexo 1 – Normas de publicação dos respectivos periódicos: Artigo 1 (Toxicology *in vitro*) e Artigo 2 (Toxicology *in vitro*)**

<https://www.elsevier.com/journals/toxicology-in-vitro/0887-2333?generatepdf=true>