

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica**

**MÉTODOS ALTERNATIVOS À EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL: QUAIS OS
DESAFIOS PARA CONCILIAR SEGURANÇA DE PRODUTOS E ÉTICA NA
PESQUISA CIENTÍFICA?**

Bianca Beloni

**São Paulo
2022**

Bianca Beloni

Métodos alternativos à experimentação animal: quais os desafios para conciliar
segurança de produtos e ética na pesquisa científica?

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São
Paulo.

Orientadora: Profa. Dra. Silvya Stuchi
Maria-Engler.

São Paulo
2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Silvia Stuchi Maria-Engler, por aceitar participar deste trabalho, pela paciência em meus inúmeros contatos, pelos ensinamentos e pelas trocas. É uma honra ser sua aluna, a senhora é uma inspiração desde as aulas de câncer do Integrado.

Aos excelentes profissionais, Anax Oliveira, Rodrigo de Vecchi, Bibiana Matte e Carolina Catarino, por se colocaram à disposição para conversarem comigo, mesmo com agendas cheias, e por compartilharem suas experiências quanto ao mundo dos métodos alternativos. Tenham a certeza que vocês aumentaram a qualidade deste trabalho.

À FCF-USP, minha escolha menos óbvia, mas mais acertada após desistir do curso de engenharia. Na FCF me encontrei, conheci pessoas incríveis e vi de perto a importância de defendermos a pesquisa e a ciência brasileiras.

Aos amigos, José, Michelle, Bruna, Mayara, Katy, Giovanna, Luana e Dani, por serem meus companheiros nessa jornada doida que é a faculdade. Obrigada pela paciência nos dias em que estava mal-humorada, pelas palavras de conforto nos momentos difíceis e por celebrarem comigo os momentos felizes. Espero que nós trilhemos caminhos lindos daqui pra frente, torço e vibro pelo sucesso de vocês.

À minha família, especialmente meus avós, mãe, tio e padrasto, por me apoiarem incondicionalmente durante toda minha vida. Vocês nunca mediram esforços para que eu tivesse uma educação de qualidade — e mais do que isso, para que eu pudesse me dedicar aos estudos. Obrigada do fundo do meu coração, eu amo vocês!

A todos que, direta ou indiretamente, participaram desses cinco anos e meio de graduação, e me marcaram de alguma forma, meu muito obrigada.

RESUMO

BELONI, B. **Métodos alternativos à experimentação animal:** quais os desafios para conciliar segurança de produtos e ética na pesquisa científica? 2022. 48 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia-Bioquímica) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

INTRODUÇÃO: Desde a década de 80 na Europa, e mais recentemente no Brasil, os chamados métodos alternativos à experimentação animal vêm ganhando cada vez mais relevância, uma vez que, além da questão ética, apresentam vantagens sobre os modelos animais. Ao redor do mundo, países estão atualizando suas legislações para se adaptarem à nova realidade, através do reconhecimento e aceitação de métodos validados. Porém, apesar dos avanços, ainda há barreiras que restringem a adoção e desenvolvimento de métodos alternativos. **OBJETIVO:** Expor e analisar o atual cenário de métodos alternativos à experimentação animal no Brasil e no mundo, tendo como foco a identificação dos principais desafios para a difusão dessas práticas. **MATERIAL E MÉTODOS:** Busca na base de dados Pubmed para a seleção de artigos sobre o tema, consulta a sites de órgãos reguladores e grupos de proteção animal e conversas com profissionais da indústria. **RESULTADOS:** O processo de implementação de um método alternativo conta com cinco etapas, sendo a validação a mais importante, pois, a partir dela, um método pode receber ou não aceitação regulatória. No Brasil, 25 métodos validados já foram reconhecidos pelo Concea, porém, assim como em outros países, falta agilidade e integração entre os grupos envolvidos para que mais testes sejam aceitos num futuro próximo. Tratando-se de métodos alternativos nos setores da indústria, os cenários são diferentes entre si: a indústria química na Europa, sob a legislação REACH, ainda demanda uma quantidade considerável de testes em animais; a indústria cosmética já substituiu quase por completo os métodos convencionais – com exceção da China; e a indústria farmacêutica apresenta dificuldade de implementar testes alternativos, mas sistemas microfluídicos do tipo *organ-on-a-chip* são vistos como um futuro promissor para superar limitações técnicas. Os benefícios econômicos associados aos métodos sem animais também justificam seu uso. **CONCLUSÃO:** Considerando os muitos fatores envolvidos, os principais desafios para ampliação de métodos alternativos são i. o processo de validação; ii. as limitações técnicas; iii. as diferenças entre indústrias a que os métodos são destinados; iv. os sistemas de regulação; v. a importação de insumos e vi. a credibilidade e confiabilidade. Com colaboração, financiamento, treinamento e processos mais claros de aceitação regulatória, os métodos alternativos serão fundamentais para a toxicologia do século XXI na segurança da saúde humana.

Palavras-chave: Métodos. Alternativos. Animais. Regulação.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Etapas para implementação de um método alternativo.....	12
Figura 2. Centros de validação de métodos alternativos ao redor do mundo e suas datas de fundação.....	16
Figura 3. Sistema microfluídico <i>organ-on-a-chip</i>	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Métodos alternativos e seus status regulatórios.....	17
Tabela 2. Métodos alternativos reconhecidos no Brasil.....	23
Tabela 3. Opções utilizadas para cumprir os requerimentos do REACH, 2019 comparado com 2016.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS

- 3R's – Redução, refinamento e substituição
- 3T3 – Fibroblastos de camundongos
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- BraCVAM – Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos
- CIS – *Common Wealth of Independent States*
- Concea – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
- CTA – Testes de transformação celular/*cell transformation assays*
- DA – *Defined Approach*
- DIP – Data interpretation procedure
- DPRA – *Direct peptide reactivity assay*
- ECHA – *European Chemicals Agency*
- ECVAM – *European Center for Validation of Alternative Methods*
- ERO's – Espécies reativas de oxigênio
- EST – Teste com células-tronco embrionárias/*embryonic stem cell test*
- FCF-USP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo
- FDA – *Food and Drug Administration*
- FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz
- h-CLAT – Teste de ativação de linhagem celular humana/*human cell line activation test*
- HET-CAM – *Hen's egg-chorioallantoic membrane test*
- HTS – *High-Throughput Screening*
- ICCVAM – *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*
- ICH – Conselho Internacional de Harmonização
- JaCVAM – *Japanese Centre for the Validation of Alternative Methods*
- MCTI – Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações
- MDCK – *Madin Darby Canine Kidney*
- NHK – *Normal human epidermal keratinocytes*
- NMPA – *China's National Medical Products Administration*
- NRU – *Neutral red uptake*
- OCDE – Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
- PETA – *People for the Ethical Treatment of Animals*

QSAR – *Quantitative Structure-Activity Relationship*

REACH – Registro, Avaliação, Autorização e Restrição de Químicos

Renama – Rede Nacional de Métodos Alternativos

RHE – Epiderme humana reconstruída/reconstructed *human epidermis*

RSPCA – *Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals*

SIRC – *Statens Serum Institut Rabbit Cornea*

TER – Resistência elétrica transcutânea/transcutaneous *electrical resistance*

TMR – Regulamento do Método de Teste

STE – *Short time exposure assay*

UE – União Europeia

ZEBET – *Centre for Documentation and Evaluation of Alternatives to Animal Experiments*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	7
2 OBJETIVO.....	10
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	12
4.1 Implementação de métodos alternativos.....	12
4.1.1 <i>Validação.....</i>	13
4.1.2 <i>Métodos validados.....</i>	17
4.2 Métodos alternativos na indústria.....	27
4.2.1 <i>Indústria química.....</i>	27
4.2.2 <i>Indústria cosmética.....</i>	31
4.2.3 <i>Indústria farmacêutica.....</i>	33
4.3 Aspectos econômicos.....	35
5 CONCLUSÃO.....	37
REFERÊNCIAS.....	39

1 INTRODUÇÃO

O homem utiliza animais para diferentes finalidades, desde os tempos antigos. O uso desses seres em pesquisas experimentais acompanha os primeiros esforços de estudo da Medicina na Grécia Antiga, período em que Aristóteles (c. 384-322 a.C) e Hipócrates (c. 460-377 a.C.) se debruçaram sobre o entendimento da estrutura e função do corpo humano em suas respectivas obras *Historia Animalium* (século IV a.C.) e *Corpus Hippocraticum* (c. 350 a.C.), baseadas principalmente em dissecações em animais (BAUMANS, 2004). Em 1831, o médico e fisiologista inglês Marshall Hall (1790-1857) propôs o que seria o primeiro código de ética da pesquisa com animais. Esse documento sugeria a necessidade de uma justificativa clara para condução desses experimentos. Em 1824, foi fundada a *British Society for the Prevention of Cruelty to Animals*, mais tarde chamada de *Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals* (RSPCA), considerada a mais antiga organização de bem-estar animal do mundo (PRESGRAVE, 2002).

Foi no século XX, mais especificamente a partir de 1959, com a publicação do livro *Principles of Humane Experimental Technique* por William Russell e Rex Burch, que as discussões acerca do tema tomaram um direcionamento mais claro. Na obra, Russell e Burch definem o conceito dos 3R's: *reduction*, *refinement* e *replacement*; traduzidos para redução, refinamento e substituição. O objetivo é a redução do número de animais utilizados na pesquisa, o refinamento na condução dos estudos, no sentido de minimizar o sofrimento ao mínimo possível, e a busca de métodos alternativos que, por fim, substituam os testes *in vivo* (RUSSELL; BURCH, 1959). O propósito, inicialmente, não é a abolição completa do uso de animais em pesquisas, uma vez que isso pode representar um risco para o avanço do conhecimento e do desenvolvimento de produtos importantes para a saúde humana, como medicamentos e vacinas. Pelo contrário, busca-se diminuir o sofrimento animal através do arcabouço técnico-científico disponível atualmente (MORALES, 2008).

Os testes em animais relacionados ao campo da toxicologia, exigidos por demandas regulatórias, são os que mais geram insatisfação e levantam críticas por grupos da sociedade. No entanto, o número de animais utilizados nesses testes representa uma pequena parcela quando comparado ao número de animais utilizados para outros fins. De acordo com relatório enviado ao Parlamento Europeu, somente cerca de 9% dos animais usados para testes na União Europeia (UE) no

ano de 2017 foram para fins de regulação toxicológica. A maior parte dos animais (45%) utilizados na UE naquele ano foram destinados à pesquisa básica (EUROPEAN COMMISSION, 2020). Mesmo assim, em termos técnicos, faz sentido que os governos sejam desafiados a aceitar métodos alternativos em suas legislações de avaliação toxicológica, uma vez que os métodos são padronizados, ou seja, a substituição de apenas um teste reflete no restante dos testes a serem conduzidos a partir de então, o que provoca uma grande redução no número de animais utilizados (TAYLOR, 2019).

Um marco para maior difusão dos métodos alternativos ocorreu em 1986, com a implementação, na UE, de uma legislação específica sobre a experimentação animal, e que foi atualizada em 2010 (Diretiva 2010/63/UE). Ela é pautada nos 3R's e se compromete com o desenvolvimento, a validação e a adoção de métodos alternativos (UNIÃO EUROPEIA, 2010). Desde então, observa-se a reavaliação do uso de animais em experimentos de laboratório como uma tendência mundial, evidenciada em vários países pela fundação de diversas instituições voltadas ao desenvolvimento e validação de novos métodos, regulamentações e meios de implementação de testes alternativos na tentativa de reconhecer seu uso.

Nos Estados Unidos, em 2008, foi firmada uma colaboração entre agências federais com a ambição de desenvolver um plano estratégico de longo prazo para testes de toxicidade. Esse programa é chamado de Tox-21, ou *Toxicology in the 21st Century*, e tem como objetivo pesquisar, desenvolver, avaliar e traduzir métodos inovadores que possam prever melhor e mais rapidamente como as substâncias afetam os seres humanos e o meio ambiente, o que faz com que métodos sem animais tenham um papel importante nos planos do programa. Por exemplo, o uso de HTS (*High-Throughput Screening*) é valioso devido à capacidade de aumentar o volume e a velocidade dos testes, enquanto os métodos convencionais são lentos, caros e não garantem uma boa preditividade de resultados (NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM, 2020a).

Já no cenário brasileiro, em 2008, foi aprovada a lei 11.794/2008, ou Lei Arouca, que regulamenta o uso de animais em experimentos e como recursos didáticos; e estabeleceu a criação do Concea (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal), órgão integrante da estrutura do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (MCTI), cuja função é formular normas que

garantam a utilização humanitária de animais em atividades de ensino ou de pesquisa científica (BRASIL, 2008).

Apesar da aparente sensação de vitória provocada pelo surgimento de legislações que demonstram uma preocupação dos governos com o bem-estar animal – seja pela inclusão nas leis de métodos alternativos ou pela regulamentação do uso de animais de forma ética –, ainda há muitos desafios a serem superados. Neste trabalho, será apresentado o contexto em que os métodos alternativos estão inseridos, desde a sua implementação até a aceitação regulatória, passando pelos setores industriais e as dinâmicas particulares de cada um, a fim de entender as barreiras e perspectivas em pauta.

2 OBJETIVO

Expor e analisar o atual cenário de métodos alternativos à experimentação animal no Brasil e no mundo, tendo como foco a identificação dos principais desafios para a difusão dessas práticas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia utilizada foi revisão bibliográfica, a partir da busca ativa de artigos da base de dados PubMed. Como filtro, foram utilizados os termos “*alternative methods*”, “*animal testing*”, “*regulation*” e “*in vitro toxicity*” associados entre si. Uma busca com o termo “*organ-on-a-chip*” isolado também foi realizada. Foram incluídos artigos de estudos, artigos de opinião e revisões sistemáticas, de língua inglesa e portuguesa. Priorizaram-se trabalhos publicados há menos de 5 anos, apesar de também serem incluídas publicações mais antigas cujo conteúdo fosse pertinente. A escolha dos trabalhos mais relevantes foi feita a partir da leitura do título e resumo.

Também foram consultados os sites dos órgãos governamentais ANVISA, Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações, *European Chemicals Agency* e *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*; e das organizações de proteção animal PETA e *Humane Society International*, em busca de notas informativas e notícias sobre o tema. A seleção foi feita a partir do título e palavras-chave.

Por fim, quatro profissionais que trabalham com métodos alternativos foram contatados e questionados sobre o que consideram barreiras para maior uso de testes sem animais. Dois profissionais trabalham em empresas brasileiras, um trabalha em empresa multinacional e um trabalha em empresa estrangeira. As informações coletadas foram analisadas e cruzadas com dados de publicações científicas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Implementação de métodos alternativos

A substituição de um método tradicional por um teste alternativo é um processo que ocorre em etapas. De acordo com Taylor (2019), são 5 fases até a completa eliminação do teste em animal (Figura 1), mas pode haver variações nesse processo (TAYLOR, 2019).

Figura 1 - Etapas para implementação de um método alternativo



Fonte: adaptado de Taylor, 2019.

O desenvolvimento é o estágio inicial em que a abordagem é criada, otimizada e testada. Pesquisadores acadêmicos, grandes empresas, laboratórios terceirizados e grupos independentes atuam nessa fase (TAYLOR, 2019). Tomando como exemplo as epidermes reconstruídas *in vitro*, utilizadas para os testes validados OCDE TG 431 e 439, vemos muitos grupos contribuindo para o aperfeiçoamento do modelo, como o Laboratório de Biologia da Pele da FCF-USP (Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP), coordenado pela professora Silvya Stuchi Maria-Engler, que desenvolve diversos modelos para estudos fisiopatológicos da pele saudável ou suas doenças; e a empresa L'Oréal, que conta com a subsidiária EPISKIN para produção e disponibilização dos modelos validados de epiderme humana reconstruída, sendo os líderes mundiais (FAPESP, 2016; EPISKIN, 2019).

A segunda etapa é a validação, fase em que o método é avaliado de forma independente, a fim de garantir a confiabilidade e precisão. Nesse estágio, é necessário mostrar que o método produz os mesmos resultados quando testado em momentos diferentes no mesmo laboratório, ou quando testado por outros laboratórios, e que os resultados são consistentes e reproduzíveis. Por esse motivo, essa fase requer colaboração entre diversos grupos de pesquisa (TAYLOR, 2019).

Na maioria dos casos, os dados retrospectivos de testes em animais são usados como padrão-ouro para que um método alternativo seja avaliado, de modo que nenhum novo teste em animais precise ser feito (BALLS, 2006).

Com um nível suficiente de evidências, o próximo passo é definir o teste formal em nível internacional. Na Europa, o caminho mais comum para essa etapa é através de colaborações internacionais, como a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) ou o Conselho Internacional de Harmonização (ICH). A negociação de como conduzir o método muitas vezes requer uma análise aprofundada e pode levar vários anos (TAYLOR, 2019).

Após a publicação do teste formal, é necessário que as agências reguladoras ao redor do mundo avaliem se o método atende às particularidades de seu setor e país. Os órgãos reguladores não precisam esperar até que o método seja formalmente reconhecido internacionalmente para decidir se o aceitarão para seus propósitos, mas frequentemente o fazem. Uma vez que esses órgãos aceitam determinado teste, atualizam suas diretrizes, processo que também pode ser demorado (TAYLOR, 2019).

Por fim, para que ocorra a exclusão do correspondente método tradicional, é preciso que haja alteração da legislação específica do setor. Pressões constantes vindas de diferentes grupos da sociedade geralmente se fazem necessárias para motivar a mudança (TAYLOR, 2019).

Em resumo, os estágios de desenvolvimento e validação são processos dependentes de pesquisa científica, e podem ser acelerados por meio de financiamento e coordenação adequados. As etapas do método de teste formal, aceitação regulatória e exclusão dos testes em animais dependem principalmente das agências reguladoras, sendo etapas burocráticas e morosas (TAYLOR, 2019).

4.1.1 Validação

Conforme citado no tópico anterior, para que um novo método seja formalmente aceito e considerado como alternativa ao uso de animais, é preciso que ele passe pelo processo de validação. Essa etapa é fundamental para os estágios seguintes de aceitação regulatória e, por esse motivo, deve-se dedicar uma atenção especial à validação de um método.

Os princípios que regem o processo de validação são:

- o método deve cumprir com requisitos de confiabilidade e relevância;
- o modelo de predição deve ser previamente definido;
- os critérios de execução devem ser previamente definidos;
- a execução é avaliada por amostras codificadas;
- deve-se haver independência entre o líder do estudo e os processos de seleção, codificação e distribuição das amostras, bem como da coleta e análise estatística dos dados;
- deve-se cumprir as Boas Práticas de Laboratório (OCDE, 2005).

Há uma diferença entre métodos válidos e validados. Os válidos ainda não passaram por um processo completo de validação, apesar de existir uma quantidade suficiente de dados que indicam sua relevância e confiabilidade. Isso significa que são métodos cujas informações ainda estão sendo coletadas e apresentam grande possibilidade de serem validados. Por outro lado, os validados são aqueles que já passaram por estudo colaborativo, contam com protocolos e critérios bem definidos, prontos para serem aceitos oficialmente — isto é, são métodos para os quais a relevância e a confiabilidade estão estabelecidas para um propósito particular (PRESGRAVE, 2012).

O processo de validação se inicia pela pré-confirmação, dividida em três fases:

- Refinamento: o laboratório líder define o protocolo;
- Transferência: o laboratório líder transfere o protocolo para o laboratório 2, e este repassa para o laboratório 3. Nessa fase, avalia-se a facilidade de entendimento do protocolo ao ser transferido entre laboratórios;
- Execução: todos os laboratórios executam o método seguindo fielmente o protocolo. Pode-se utilizar um número maior de laboratórios, e também um laboratório *naïve*, que não tenha conhecimento daquela técnica específica. Assim, avalia-se a dificuldade de realizar o protocolo sem treinamento prévio (PRESGRAVE, 2012; OCDE, 2005).

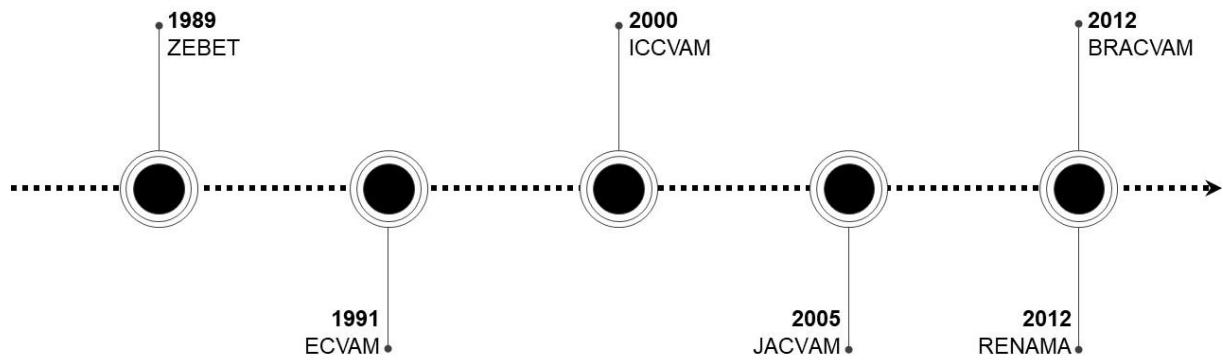
Caso os resultados da pré-confirmação sejam satisfatórios, inicia-se a validação propriamente dita. A lógica do processo é a mesma da pré-confirmação, porém em larga escala para garantir a confiabilidade e adequação do método otimizado. Para isso, o número de amostras e/ou o número de laboratórios deve ser

aumentado consideravelmente. Existe outra modalidade de validação chamada *catch up validation*, na qual o desenho de protocolo é comparado com o de um método similar, que já tenha recebido validação convencional e fora aceito cientificamente. Deve-se, no entanto, provar a comparabilidade de resultados de forma efetiva (OCDE, 2005). Neste caso, o grupo brasileiro do Laboratório de Biologia da Pele da FCF-USP desenvolveu o modelo USP de epiderme humana reconstruída e o comparou com métodos validados (PEDROSA *et al.*, 2017).

Ao final do processo, tem-se um método validado em termos específicos, com protocolo, finalidade, *endpoints*, substâncias e outras particularidades bem definidas, ou seja, a validação é contexto-específica. Dessa forma, pode ocorrer de um ensaio ser tido como validado apenas para determinados critérios. Esse foi o caso dos métodos *in vitro* de irritação/corrosão da pele. Eles foram inicialmente validados em 1998 para fornecer uma resposta sim/não (ECVAM, 1998), limitando seu uso, uma vez que a regulação do setor químico exigia resultados em escala de não irritante, irritante ou severamente irritante. Isso ocorre porque os resultados são também utilizados para classificação e rotulagem, regulada por uma legislação específica. Foi somente em 2007, com a validação de um protocolo ligeiramente diferente que fornecia o resultado em escala, que os métodos *in vitro* de corrosão e irritação passaram a ser aceitos para os relatórios de avaliação de risco da indústria química (TAYLOR, 2019; EUROPEAN COMMISSION, 2007).

Entre os centros de validação fundados ao redor do mundo, pode-se citar o ZEBET (*Centre for Documentation and Evaluation of Alternatives to Animal Experiments*), na Alemanha; ECVAM (*European Center for Validation of Alternative Methods*), na Europa; ICCVAM (*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*), nos Estados Unidos; JaCVAM (*Japanese Centre for the Validation of Alternative Methods*), no Japão; e BraCVAM (Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos), no Brasil. A Figura 2 indica os centros de validação e os anos em que foram fundados (TRATNIK; PENNACCHI; MARIA-ENGLER, 2017).

Figura 2 - Centros de validação de métodos alternativos ao redor do mundo e suas datas de fundação



Fonte: adaptado de Tratnik, Pennacchi, Maria-Engler, 2017.

O BraCVAM é resultado do esforço conjunto da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), sendo responsável por identificar novos métodos alternativos, sugerindo a adaptação à demanda nacional e estimulando a substituição dos protocolos em estudos brasileiros. Além disso, o BraCVAM também é responsável por receber propostas de universidades, instituições de pesquisas e indústrias que tenham criado novos métodos e queiram submetê-los à aprovação no Brasil (PRESGRAVE, 2016). No mesmo ano de criação do BraCVAM, a Portaria nº 491 do MCTI instituiu a criação da Renama (Rede Nacional de Métodos Alternativos), cuja função é executar efetivamente os estudos de validação, enquanto o Concea avalia o método e os resultados, propondo sua oficialização (BRASIL, 2012).

No entanto, a ambição dos órgãos brasileiros ainda caminha a passos lentos. A integração entre os diversos agentes envolvidos na validação de protocolos é necessária, além de um investimento mais expressivo, para que o processo de validação ganhe agilidade. Em 2015, foi noticiado o primeiro estudo de validação no Brasil – o protocolo HET-CAM (*hen's egg-chorioallantoic membrane test*). Caso bem sucedido, os resultados poderiam servir de referência para que outros países também validassem o método (FIOCRUZ, 2015). Sete anos depois, a validação de HET-CAM ainda não foi finalizada.

Também se faz necessário que o BraCVAM disponha de pessoal dedicado à comunicação institucional, a fim de divulgar o trabalho que vem sendo executado pelo centro desde sua fundação. Através de um site oficial, o BraCVAM poderia compartilhar informações sobre os métodos que estão em processo de validação, em qual etapa estão e o tempo despendido em cada fase. Isso é importante para

que as práticas do BraCVAM estejam alinhadas quanto à demanda de transparência dos órgãos governamentais perante a sociedade.

4.1.2 Métodos validados

A Tabela 1 resume os métodos alternativos *in vitro*, *in chemico* ou *ex vivo* para testes toxicológicos mais comumente usados em avaliações de segurança e seus *status* regulatórios. Pode-se notar que métodos de *endpoints* tópicos, isto é, que avaliam os efeitos cutâneos ou oculares, já possuem validação e aceitação internacional para substituírem completamente testes convencionais. Um exemplo é o *endpoint* de irritação/corrosão ocular: o método convencional é o teste de Draize (OCDE TG 405), em que a substância é inserida nos olhos de coelhos vivos; atualmente, os testes OCDE TG 437, 438, 460, 491, 492, 494 e 496 são alternativas validadas ao teste de Draize. Já com relação aos *endpoints* sistêmicos, a combinação de testes fornece dados para uma triagem inicial, porém muitos ainda não alcançaram reconhecimento de órgãos regulatórios.

Também fica evidente um significativo progresso científico nos últimos 10 anos, visto que muitos testes foram aprovados pela OCDE nesse período (TAYLOR, 2019).

Tabela 1 - Métodos alternativos e seus *status* regulatórios

Endpoint	Método alternativo	Aceitação regulatória
Absorção cutânea	Testes em pele <i>ex vivo</i> baseados na avaliação da quantidade de substância que atravessa o tecido. Utiliza-se um aparato conhecido como <i>Franz Chamber</i> , que consiste em duas câmaras separadas pela pele <i>ex vivo</i> .	OCDE TG 428 (2004).
Toxicidade aguda	Testes em células,	Não aceitos formalmente,

	<p>principalmente 3T3 e NHK NRU (3T3 - BALB/c fibroblastos de camundongos/NHK - <i>Normal human epidermal keratinocytes/NRU - neutral red uptake</i>), que avaliam a extensão de morte celular na presença da substância.</p>	<p>podem ser usados somente em combinação com outros testes.</p>
Irritação/corrosão cutânea	<p>Modelo de pele <i>in vitro</i> (RHE - <i>reconstructed human epidermis</i>) que avalia a extensão de morte celular na presença da substância.</p> <p>Teste de Barreira de Membrana <i>in vitro</i> avalia, através de uma biobarreira macromolecular, os danos causados pela aplicação da substância.</p> <p>Teste TER (Resistência Elétrica Transcutânea/<i>Transcutaneous Electrical Resistance</i>) avalia perda de integridade da pele por substâncias corrosivas</p>	<p>Epiderme <i>in vitro</i>: OCDE TG 431 (2004) e 439 (2010).</p> <p>OCDE TG 435 (Teste de Barreira de Membrana; 2015).</p> <p>OCDE TG 430 (TER; 2015).</p>

	através de redução da TER.	
Irritação/corrosão ocular	<p>Olhos de galinhas e boi mortos, provenientes da indústria alimentícia (<i>ex vivo</i>), e modelos epiteliais de córnea humana (HCE - <i>human corneal epithelium</i>) medem a extensão de morte celular na presença da substância. Teste de Permeação de Floresceína avalia ruptura da integridade da barreira epitelial da córnea através de dano às células <i>Madin Darby Canine Kidney</i> (MDCK) após exposição à substância. Teste <i>in vitro</i> de macromoléculas avalia o nível de desagregação de macromoléculas após contato com substância irritante.</p> <p>Teste <i>in vitro</i> STE (<i>Short Time Exposure Assay</i>) para danos oculares baseado em citotoxicidade, realizado em uma monocamada de</p>	<p>OCDE TG 437, 438 (<i>ex vivo</i>, 2009).</p> <p>OCDE TG 460 (permeação de fluoresceína; 2012).</p> <p>OCDE TG 491 (STE; 2015).</p> <p>OCDE TG 492 (HCE, 2015).</p> <p>OCDE TG 496 (macromoléculas; 2019).</p> <p>OCDE TG 494 (Vitrigel; 2021).</p>

	<p>células SIRC (<i>Statens Serum Institut Rabbit Cornea</i>). Teste de irritação ocular Vitrigel avalia danos à barreira epitelial da córnea através dos valores de resistência elétrica transepitelial após exposição à substância.</p>	
Sensibilização cutânea	<p>Ensaio de Reatividade Peptídica Direta/<i>Direct Peptide Reactivity Assay</i> (DPRA) mede a ligação da substância a proteínas (<i>in chemico</i>); Ensaio de queratinócitos e Teste de Ativação de Linha Celular Humana/<i>human Cell Line Activation Test</i> (h-CLAT), ambos <i>in vitro</i>, avaliam a resposta imunológica. Abordagem <i>Defined Approach</i> (DA), que consiste em combinação dados (<i>in silico</i>, <i>in chemico</i>, <i>in vitro</i>) interpretados a partir de um procedimento padrão de análise (DIP - <i>data</i></p>	<p>OCDE TG 442C (DPRA, 2015), OCDE TG 442D (ensaio de queratinócitos, 2015) e OCDE 442E (h-CLAT, 2016). OCDE GD 497 (<i>Defined Approach</i>; 2021).</p>

	<i>interpretation procedure),</i> e destina-se a superar limitações de métodos individuais.	
Genotoxicidade	Vários testes <i>in vitro</i> , incluindo Teste de Ames, aberração cromossômica, teste de micronúcleo e testes de mutação genética.	OCDE TG 471 (1997); OCDE TG 473 (1997); OCDE TG 476 (1997); OCDE TG 487 (2010); OCDE TG 490 (2015). No entanto, ainda fazem testes confirmatórios em modelos <i>in vivo</i> .
Fototoxicidade	Teste de Fototoxicidade <i>in</i> <i>vitro</i> 3T3 NRU. Ensaio de espécies reativas de oxigênio (ERO's) para fotorreatividade. RHE para fototoxicidade.	OCDE TG 432 (3T3 NRU; 2004); OCDE TG 495 (ensaços de ERO's; 2019); OCDE TG 498 (RHE; 2021);
Doses repetidas	Técnicas <i>in silico</i> , como <i>read-across</i> , podem ser usadas se a substância é semelhante a outras que já foram testadas. Modelo de bateria de testes <i>in vitro</i> , ou <i>lab-on-a-chip</i> , ainda estão em desenvolvimento.	<i>Read-across^a</i> é aceito em alguns casos; bateria de testes <i>in vitro</i> ainda não aceita.
Carcinogenicidade	Testes de transformação celular/ <i>Cell</i>	Testes CTA falharam em validação internacional,

	<p><i>Transformation Assays</i> (CTA) que avaliam a alteração de células de roedores, podem detectar 90% dos carcinógenos humanos conhecidos.</p>	são usados para fins de triagem apenas.
Toxicidade reprodutiva	<p>Técnicas <i>in silico</i>, como <i>read-across</i>, podem ser usadas. Teste com células-tronco embrionárias (EST - <i>embryonic stem cell test</i>) de camundongos classifica substâncias como tóxicas caso bloqueiem o desenvolvimento de cardiomiócitos em contração.</p> <p>Outros testes <i>in vitro</i> ainda estão em fase de desenvolvimento.</p> <p>Os ensaios de ligação ao receptor são ensaios <i>in vitro</i> que podem detectar ativação de genes envolvidos na produção de hormônios.</p>	<p><i>Read-across^a</i> é aceito em alguns casos. EST falhou em validação internacional. Ensaio de ligação ao receptor — OCDE TG 455 (2012); 457 (2012); 456 (2011) — são aceitos para rastrear potenciais propriedades desreguladoras endócrinas.</p>
Contaminação pirogênica	<p>Teste de Endotoxina Bacteriana e Teste de Ativação de Monócitos.</p>	<p>Teste de Endotoxina Bacteriana incluso nas Farmacopeias Norte-Americana,</p>

		Europeia e Brasileira. Teste de Ativação de Monócitos aceito pelo FDA (<i>Food and Drug Administration</i>) (2009) e incluso na Farmacopeia Europeia (2010). Ambos aceitos pelo Concea.
--	--	--

Fonte: Adaptado de Taylor, 2019; National Toxicology Program, 2020b

a. *Read-across* significa prever propriedades desconhecidas de um produto químico a partir de propriedades conhecidas de produtos químicos semelhantes – é um método científico para preencher lacunas de dados.

Em 2014, o Concea aprovou o uso de dezessete métodos alternativos. Em 2016, mais sete métodos foram reconhecidos e, em 2019, mais um, totalizando 25 metodologias reconhecidas no Brasil atualmente, listadas na Tabela 2. Além do reconhecimento dos métodos, a legislação prevê um prazo máximo de 5 anos para uso obrigatório em todo o território nacional (CONCEA, [20--]).

Tabela 2 - Métodos alternativos reconhecidos no Brasil

Método	Reconhecido pela Resolução Normativa nº 18/2014 (entrada em vigor em 2019)	Reconhecido pela Resolução Normativa nº 31/2016 (entrada em vigor em 2021)	Reconhecido pela Resolução Normativa nº 45/2019 (entrada em vigor em 2024)
I - Para avaliação do potencial de irritação e corrosão da pele:			
Método OCDE TG 430 - Corrosão dérmica <i>in vitro</i> : Teste de	x		

Resistência Elétrica Transcutânea			
Método OCDE TG 431 - Corrosão dérmica <i>in vitro</i> : Teste da Epiderme Humana Reconstituída	x		
Método OCDE TG 435 - Teste de Barreira de Membrana <i>in vitro</i>	x		
Método OCDE TG 439 - Teste de irritação Cutânea <i>in vitro</i>	x		
II - Para avaliação do potencial de irritação e corrosão ocular:			
Método OCDE TG 437 – Teste de Permeabilidade e Opacidade de Córnea Bovina	x		
Método OCDE TG 438 – Teste de Olho Isolado de Galinha	x		
Método OCDE TG 460 – Teste de Permeação de Fluoresceína	x		
Método OCDE TG 491 - Teste <i>in vitro</i> de curta duração para danos oculares		x	
Método OCDE TG 492 - Epitélio corneal humano reconstruído		x	
III – Para avaliação do potencial de Fototoxicidade:			
Método OCDE TG 432 - Teste de Fototoxicidade <i>in vitro</i> NRU 3T3	x		
IV - Para avaliação da absorção cutânea:			

Método OCDE TG 428 - Absorção Cutâneo método <i>in vitro</i>	x		
V - Para avaliação do potencial de sensibilização cutânea:			
Método OCDE TG 429 - Sensibilização Cutânea: Ensaio do Linfonodo Local	x		
Método OCDE TG 442A e 442B - Versões não radioativas do Ensaio do Linfonodo Local	x		
Método OCDE TG 442C - Sensibilização cutânea <i>in chemico</i>		x	
Método OCDE TG 442D - Sensibilização cutânea <i>in vitro</i>		x	
VI - Para avaliação de toxicidade aguda:			
Método OCDE TG 420 - Toxicidade Aguda Oral - Procedimento de Doses Fixas	x		
Método OCDE TG 423 - Toxicidade Aguda Oral - Classe Tóxica Aguda	x		
Método OCDE TG 425 - Toxicidade Aguda Oral - procedimento "Up and Down"	x		
Método OCDE TG 129 - estimativa da dose inicial para teste de toxicidade aguda oral sistêmica	x		

VII - Para avaliação de genotoxicidade:			
Método OCDE TG 487 - Teste do Micronúcleo em Célula de Mamífero <i>in vitro</i>	x		
VIII – Avaliação de toxicidade reprodutiva:			
Método OCDE TG 421 - Teste de triagem para toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento		x	
Método OCDE TG 422 - Estudo de toxicidade repetida combinado com teste de toxicidade reprodutiva		x	
IX - Avaliação da contaminação pirogênica em produtos injetáveis:			
Teste de Endotoxina Bacteriana (Farmacopeia Brasileira)		x	
Teste de Ativação de Monócitos			x

Fonte: elaborado a partir de (CONCEA, [20--]).

A validação e a aceitação regulatória de novos métodos são processos dinâmicos que precisam estar em constante revisão. De acordo com o Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos, disponibilizado pela ANVISA (2012), “à medida que os métodos sejam validados e obtenham aceitação regulatória por órgãos oficiais, assumem o mesmo *status* perante a ANVISA” (p. 24). Os métodos válidos, mas ainda não validados, apesar de não possuírem aceitação regulatória, também podem servir como evidência complementar para avaliação de segurança.

Também vale destacar que o pessoal envolvido nas tomadas de decisão referentes a substituição de métodos com animais, como reguladores, chefes de empresas ou coordenadores de agências governamentais, têm grande

responsabilidade sobre a segurança da população, e por isso, não é surpresa que tenham um posicionamento conservador em relação às novas abordagens (TAYLOR, 2019). É preciso um robusto método de validação, somado a treinamentos e capacitação técnica, para construção da confiança e credibilidade de testes alternativos.

4.2 Métodos alternativos na indústria

Os métodos tradicionais e alternativos são inseridos de forma diferente nos diversos setores, uma vez que cada indústria apresenta suas particularidades históricas, geográficas, econômicas e de regulamentação.

4.2.1 Indústria química

A indústria química é uma peça importante na cadeia global de suprimentos, pois tem grande impacto na economia do mundo. O consumo de produtos químicos em 2020, globalmente, representou mais de 3,53 trilhões de euros, ou 4,09 trilhões de dólares americanos (STATISTA, 2021). No entanto, os impactos no meio ambiente e na saúde humana levantam preocupações há muitos anos.

Países lançaram esforços para avaliação de risco de produtos químicos através de seus sistemas regulatórios. Uma importante regulação, utilizada como referência para muitos órgãos e está em vigor desde 2007 na UE, é o Registro, Avaliação, Autorização e Restrição de Químicos (REACH, do inglês, *Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*). A ECHA (*European Chemicals Agency*) é o ponto central do sistema, atuando na gestão de informações coletadas, na coordenação da avaliação aprofundada de produtos químicos suspeitos e na construção de uma base de dados pública na qual consumidores e profissionais podem encontrar informações sobre os perigos das substâncias (EUROPEAN COMMISSION, [20--a]; UNIÃO EUROPEIA, 2006). Há agora um número crescente de novos sistemas regulatórios e alterações de regulações existentes em outros países, como Canadá, China, Coréia, Malásia, Rússia, Taiwan, Turquia e EUA, sendo que muitas propostas legislativas apresentam semelhanças ao REACH (MEIGS *et al.*, 2018).

O REACH tornou obrigatório o registro de todas as substâncias fabricadas ou importadas para a UE, contendo dados que comprovem as informações relevantes de segurança pertinentes a cada produto. Essa exigência se aplica às substâncias novas ou já comercializadas no mercado europeu, produzidas ou importadas a uma tonelada ou mais por produtor ou importador, por ano. Para registro, requerem-se dados sobre propriedades físico-químicas, informações toxicológicas e informações sobre o uso e as medidas de gestão de risco adotadas para limitar a exposição das substâncias consideradas nocivas (TAYLOR, 2018). O texto dessa legislação é separado por anexos, que especificam os requisitos por faixa de tonelagem produzida:

- 1–10 toneladas/ano – Anexo VII;
- 10–100 toneladas/ano – Anexo VIII;
- 100–1,000 toneladas/ano – Anexo IX;
- >1,000 toneladas/ano – Anexo X (UNIÃO EUROPEIA, 2006).

Antes da aprovação, quando a legislação REACH ainda estava em discussão pela Comissão Europeia, estimava-se que as novas exigências sobre informações toxicológicas levariam ao uso de cerca de 2,6 milhões de animais para condução de testes das substâncias que já estavam sendo comercializadas (VAN DER JAGT *et al.*, 2004). Grupos de proteção animal se manifestaram para garantir que métodos alternativos fossem priorizados e que o número de animais utilizados fosse o mínimo possível (TAYLOR, 2018).

Com isso, duas disposições importantes foram incluídas no regulamento final em relação aos testes em animais e suas alternativas. A primeira prevê a promoção do uso de métodos alternativos entre os registrados, uma vez que afirma que as informações devem ser geradas, sempre que possível, por outros meios que não testes em animais vertebrados, através da utilização de métodos como QSAR (*Quantitative Structure-Activity Relationship*), *in vitro*, *read-across* e análises de *weight-of-evidence*. A segunda declara que testes em animais vertebrados devem ser considerados apenas como último recurso, e expõe três mecanismos para assegurar isso: compartilhamento obrigatório de testes anteriormente conduzidos em animais vertebrados entre registros da mesma substância, banco de dados que pode ser alimentado por terceiros para estimular o compartilhamento de informações adicionais e, por fim, opções para evitar testes em animais em determinadas

circunstâncias (UNIÃO EUROPEIA, 2006). Todavia, os grupos de proteção animal não se deram por contentes, pois ainda assim o texto final exigia extensos testes a serem conduzidos em animais (TAYLOR, 2018).

Após mais de 10 anos de REACH, muitos especialistas se debruçam sobre os impactos no número de testes em animais utilizados desde sua promulgação, e organizações protetoras dos animais fazem duras críticas à legislação. De três em três anos, a ECHA reporta à Comissão Europeia dados sobre como os métodos alternativos estão sendo utilizados para gerar informações a respeito das propriedades intrínsecas das substâncias químicas e avaliação dos riscos. O relatório mais recente foi publicado em 2020, baseado em conjuntos de dados de registros extraídos em 2016 e 2019 (EUROPEAN CHEMICALS AGENCY, 2020). Os números de animais usados são alarmantes e aumentam a cada ano: na primeira década de REACH, foi usada uma média anual de 275.000 animais; entre 2016 e 2019, o número de animais usados mais que dobrou, de 1,12 milhões para 2,4 milhões (FENTEM *et al.*, 2021).

Tabela 3 - opções utilizadas para cumprir os requerimentos do REACH, 2019
comparado com 2016

Opção utilizada	2019 média [%]	2016 média [%]
Experimental	27,1	27,6
Read-across	25,1	27,7
<i>Weight-of-evidence</i>	3,7	3,7
Outros	4,8	5,6
Dispensa	7,7	10,8
Proposta de teste	0,2	0,3
Sem informação	28,7	21,2

Fonte: Adaptado de Taylor, 2018.

A análise das informações publicadas mostra que ainda há um longo caminho a se percorrer para um uso mais amplo de métodos alternativos que substituam testes em animais. Em 2019, a alternativa mais recorrente foi a utilização *read-across*, seguida, respectivamente, pela justificativa para omissão de dados (dispensa), *weight-of-evidence* e QSAR. No entanto, as porcentagens sugerem que o uso de abordagens de dispensa, *weight-of-evidence* e QSAR foi relativamente baixo, e o uso de testes *in vitro* foi tão baixo que nem foi incluído na estatística (TAYLOR, 2018; EUROPEAN CHEMICALS AGENCY, 2020).

Outro ponto de debate acerca da legislação em questão está na demora para que um método seja adotado formalmente nos termos regulatórios. Vale notar que, na prática, existe uma diferença entre uma alternativa validada e uma alternativa reconhecida. O artigo 13.1 do REACH reitera a necessidade de usar um método alternativo, sempre que possível, em vez de teste em animais. O artigo 13.3 exige, então, que os testes sejam realizados de acordo com o Regulamento da Comissão 440/2008 (o Regulamento do Método de Teste [TMR]), que, de acordo com o Artigo 13.2, precisa ser revisto regularmente a fim de substituir, reduzir ou substituir os testes em animais (TAYLOR, 2018; BOWLES, 2018). A atualização do TMR é demandada pela Comissão Europeia e ocorre de acordo com um processo conhecido por “procedimento regulatório com escrutínio”. O objetivo é analisar propostas de alterações à legislação, garantindo que sejam compatíveis com o sistema jurídico da UE. Se não houver atrasos, o prazo para alteração do TMR é de nove meses a um ano. Porém, em termos práticos, a Comissão Europeia aguarda a aprovação de um método alternativo pela OCDE antes de atualizar o TMR. O processo padrão para aceitação de um novo teste pela OCDE pode variar, mas observa-se uma média de três anos para validação, embora existam casos que demoraram muito mais (BOWLES, 2018). Por exemplo, o teste DPRA, para avaliação *in chemico* de sensibilização cutânea, foi validado pelo ECVAM em 2012, aprovado na OCDE em 2015, e publicado no TMR apenas em 2017, somando um total de cinco anos entre sua validação e inclusão ao TMR (TAYLOR, 2018).

Há também atrasos na revisão dos Anexos VII–X do REACH, processo pelo qual o método é formalmente aceito na finalidade da lei. Os testes de irritação da pele *in vitro* foram adicionados ao TMR em 2009, substituindo efetivamente a necessidade do uso de coelhos para este *endpoint*. No entanto, uma revisão dos Anexos VII a X, que até então especificavam a realização do teste do coelho, só foi

publicada em julho de 2016, sete anos depois. Dessa forma, o processo necessário para alteração legal e, consequentemente, ter-se um método de teste alternativo reconhecido na legislação da UE, é significativamente moroso, o que prolonga o período em que animais continuam sendo usados extensivamente (TAYLOR, 2018).

4.2.2 Indústria cosmética

Quando falamos da transição de métodos *in vivo* para abordagens alternativas, é amplamente reconhecido que a pressão pública desempenhou um papel significativo no incentivo a esses desenvolvimentos. Uma pesquisa de 2020 realizada pela instituição de caridade britânica Frame mostrou que 84% dos entrevistados não comprariam um produto cosmético se soubessem que um de seus ingredientes foi testado em animais (FRAME, 2020). A indignação com os testes de cosméticos em animais começou na década de 1970 e ganhou força na década de 1980. Na Europa, ocorreu um movimento pedindo a proibição total de testes de cosméticos em animais, mesmo na ausência de alternativas para todos os testes necessários (TAYLOR, 2019). O resultado foi que, desde 2009, experimentos em animais são totalmente banidos para fins cosméticos na UE, tanto matérias-primas como produtos finais e, em 2013, a proibição se estendeu para cosméticos importados de países não-europeus (EUROPEAN COMMISSION, [20--b]).

No Brasil, apesar de recentes, avanços também ocorreram, e oito estados já contam com leis que proíbem o uso de animais em cosméticos: São Paulo (2014), Mato Grosso do Sul (2014), Amazonas (2015), Paraná (2015), Pará (2016), Rio de Janeiro (2017), Minas Gerais (2018) e Pernambuco (2018).

De acordo com Meigs *et al.* (2018), em 2018, cerca de 80% dos países ao redor do mundo ainda permitiam testes em animais e a venda de produtos cosméticos testados em animais. Além disso, existem brechas na regulamentação da UE, já que tradicionalmente não é a indústria cosmética que encomenda os testes, mas sim as empresas químicas, demandadas pela regulação REACH. Em agosto de 2020, a ECHA rejeitou dois recursos relativos a testes alternativos em ingredientes cosméticos. Nas decisões impugnadas, a ECHA exigiu que a empresa Symrise realizasse estudos em animais vertebrados para homosalato e o 2-etilhexil salicilato (FRAME, 2021). De acordo com os líderes de empresas, este não é um caso isolado: estão sendo solicitados novos testes em animais para muitos outros

ingredientes (FENTEM, 2020). Marcas de cosméticos, como Unilever, e organizações internacionais de bem-estar animal, estão se colocando contra as medidas impostas pelo REACH através de apelos públicos e da carta aberta "*Cosmetics Animal Testing Ban Effectively Shredded*" (UNILEVER et al., 2020).

A China também deve ser levada em conta, pois possui uma significativa relevância na indústria cosmética, sendo o segundo maior mercado em cosméticos depois dos EUA (INTERNATIONAL TRADE ADMINISTRATION, 2022). Uma particularidade do país é a exigência de testes em animais para os produtos comercializados em seu território, ou seja, mesmo uma empresa que não conduza testes em animais em seu país de origem, têm seus produtos testados em animais caso ela exporte à China. A organização de proteção animal PETA (*People for the Ethical Treatment of Animals*) estima que pelo menos 300.000 são usados anualmente para testes cosméticos no país (PETA, [20--]).

Há, contudo, um movimento chinês para mudança, com discretas iniciativas rumo ao uso de métodos não tradicionais:

- 2014 - cosméticos comuns (cuidados com os cabelos, esmaltes, maquiagens e perfumes) produzidos exclusivamente na China podem ser testados a partir de métodos alternativos (HUMANE SOCIETY INTERNATIONAL, [20--]);
- 2019 - O NMPA (*China's National Medical Products Administration*) aprova dois testes alternativos para regulação cosmética, sendo eles DPRA para sensibilização cutânea (OECD TG 442C) e STE para irritação ocular (OECD TG 491) (INSTITUTE FOR IN VITRO SCIENCES, 2019);
- 2021 - cosméticos comuns, inclusive os importados, podem ser testados por métodos alternativos, desde que não sejam produtos infantis ou possuam novos ingredientes (PETA, 2021).

Por outro lado, os cosméticos não comuns (conceito similar a cosmético grau 2, em um paralelo com a legislação brasileira), como protetores solares, colorantes de cabelo e produtos ant queda capilar, produzidos na China ou não, precisam ser obrigatoriamente testados em animais (PETA, 2021).

4.2.3 Indústria farmacêutica

Os estudos em animais desempenham um papel crítico nos testes pré-clínicos da indústria farmacêutica. Em 2017, dos 2,18 milhões de animais utilizados para fins regulatórios, 61% foram relacionados a testes da indústria farmacêutica (EUROPEAN COMMISSION, 2020). O uso de cobaias ainda é indispensável em algumas áreas, como por exemplo, na farmacocinética e farmacodinâmica, uma vez que avalia-se parâmetros de segurança e eficácia de candidatos a medicamentos e vacinas (TAYLOR, 2019).

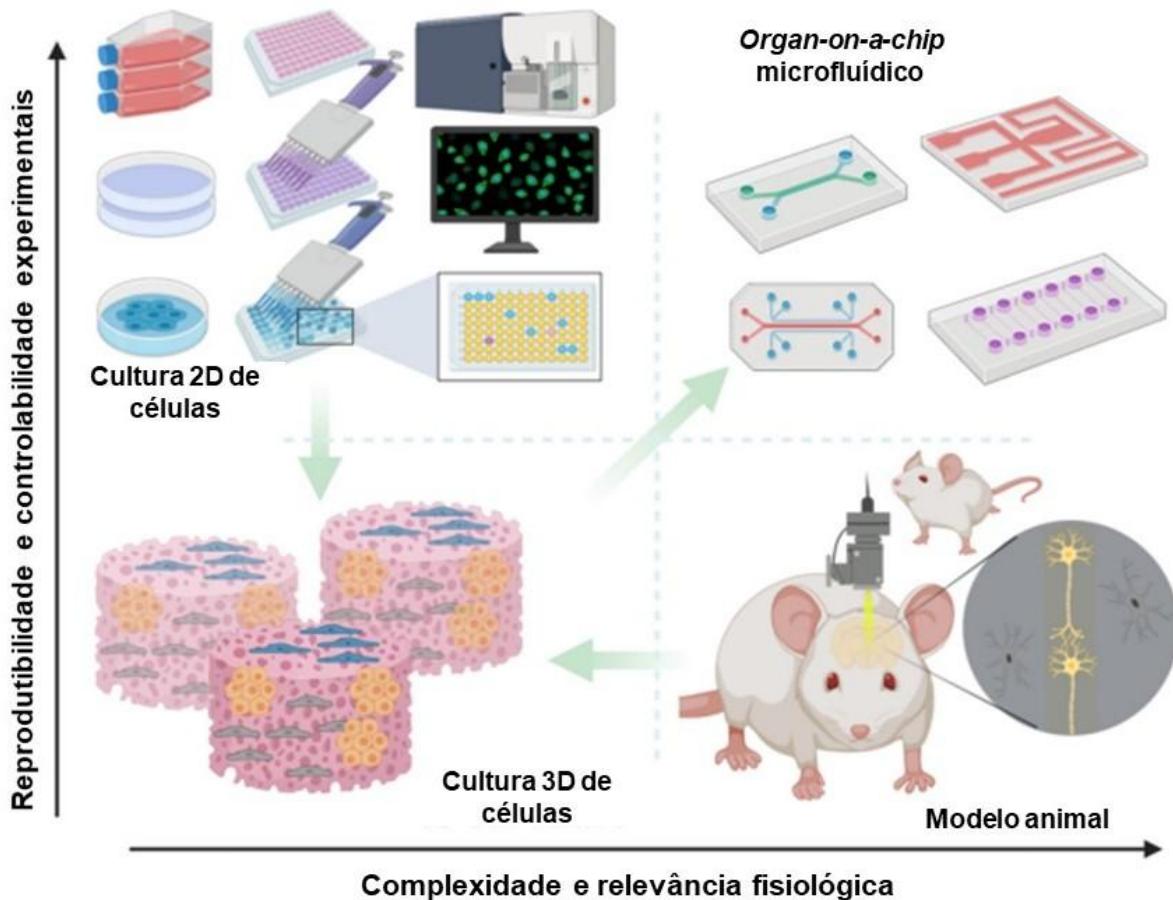
Além disso, o processo regulatório de registro de medicamentos varia entre as regiões. Todos os países têm uma autoridade reguladora para aprovação de medicamentos que define os padrões necessários de garantia de qualidade, eficácia e segurança (VICHARE, 2021). Badjatya e Bodla (2018) dividem os mercados entre altamente regulamentados (Estados Unidos, UE, Japão, Austrália/Nova Zelândia) e semi-regulamentados (Ásia e África, Oriente Médio, Common Wealth of Independent States (CIS) e alguns países da América Latina). A principal diferença de um mercado semi-regulamentado para um altamente regulamentado é o grau de implementação regulatória. A intensidade das auditorias/inspeções é diferente e, da mesma forma, as penalidades por violações das Boas Práticas de Fabricação são diferentes. Mas para ambos mercados, muitas vezes as informações disponíveis na literatura sobre os requisitos de testes pré-clínicos são limitadas, resultando em ambiguidade e testes desnecessários, o que aumenta o número de animais em experimentação (BADJATYA; BODLA, 2018).

Porém, a indústria farmacêutica está acenando para os métodos alternativos. Uma pesquisa mostrou um consistente aumento no uso de testes *in vitro* pelas empresas entre 1980 e 2013, sendo que mais de 20% foram realizados em 2013, o último ano de período da pesquisa, e mais de 70% foram realizados de 2010 a 2013. Os ensaios mais recorrentes foram de genotoxicidade, farmacologia de segurança e metabolismo de medicamentos (EFPIA, 2016).

Uma perspectiva extremamente promissora entre os métodos sem animais está nos sistemas microfluídicos denominados *organ-on-a-chip*. Essas plataformas refletem as características microestruturais e funcionais dos tecidos e órgãos humanos, mimetizando a arquitetura celular organotípica, a matriz extracelular e os fatores bioquímicos em uma escala de *chip*. O sistema tem um tamanho compacto, com canais que interligam as microestruturas, o que possibilita a manipulação de vários parâmetros, como taxa de fluxo, pressão, oxigênio e pH, fornecendo

condições de cultura controláveis. A Figura 3 ilustra que essa nova técnica pode significar uma mudança de paradigma no desenvolvimento de medicamentos, substituindo testes em animais nas fases pré-clínicas (MA *et al.*, 2021).

Figura 3 - Sistema microfluídico *organ-on-a-chip*



Fonte: Adaptado de Ma *et al.*, 2021. Comparação em termos de reprodutibilidade/controlabilidade versus relevância fisiológica entre os modelos para testes pré-clínicos. As culturas 2D são uma maneira rápida e reproduzível de analisar as respostas aos medicamentos, no entanto, não têm a relevância de um tecido fisiológico 3D. As culturas 3D contêm diferentes tipos celulares, mas ainda não fornecem condições para avaliar a fisiologia humana de forma complexa. Modelos animais permitem a análise *in vivo*, mas as diferenças inter-espécies enfraquecem a precisão e a reprodutibilidade. Sistemas microfluídicos *organ-on-a-chip* possibilitam uma análise controlável, reproduzível e de relevância fisiológica para análises pré-clínicas.

4.3 Aspectos econômicos

A dependência do mercado brasileiro em relação a fornecedores estrangeiros para importação de insumos biotecnológicos, como meios de cultura, é um desafio

enfrentado pelas empresas nacionais que trabalham com métodos alternativos. A pandemia da COVID-19 agravou ainda mais esse cenário, pois levou à escassez e ao aumento dos custos das matérias-primas, somado à desvalorização do real frente ao dólar. Além disso, o trâmite alfandegário na chegada dos insumos ao país é burocrático, com altos impostos e demorado, o que faz com que muitas vezes as empresas percam os produtos importados nesse processo, uma vez que materiais biológicos têm curto prazo de validade. De acordo com uma das profissionais contatadas, não há opções de fornecedores no Brasil que atendam a demanda de materiais necessários para condução dos testes, o que traz à tona a vulnerabilidade dos sistemas de produção e inovação nacionais (FERNANDES; GADELHA; MALDONADO, 2021).

Apesar da barreira econômica imposta pela necessidade de importação de insumos, a utilização de métodos alternativos apresenta vantagens financeiras quando comparada aos testes tradicionais. Nota-se cada vez mais discussões surgindo a respeito da extrapolação dos resultados, o que também está ligado aos aspectos econômicos. De acordo com Hartung (2018), "em toxicologia, a extrapolação é a consequência lógica do uso de modelos, e não os próprios sistemas para estudar quaisquer fenômenos" (HARTUNG, 2018). Diversos estudos já demonstraram uma baixa preditividade de modelos animais (HACKAM; REDELMEIER, 2006), e os motivos são diversos: diferenças intra e interespécies, idade dos animais, tamanho de amostras, dosagens e tempos de exposição não realistas, estresse dos animais, entre outros (HARTUNG, 2018). Tratando-se da indústria farmacêutica, fica evidente como a preditividade do método impacta o custo final de desenvolvimento. O processo de desenvolvimento de um medicamento, desde os estágios iniciais de busca pela molécula até sua comercialização, leva cerca de 15 anos e custa mais de 1 bilhão de dólares (DIMASI; GRABOWSKI; HANSEN, 2016; TAMIMI; ELLIS, 2009). Mas, de acordo com Bernard Munos, citado pela Forbes, ao considerar as falhas de candidatos a fármacos, avalia-se que o custo passe para 4 bilhões de dólares (FORBES, 2012).

Além disso, a duração e o rendimento dos métodos com animais também são obstáculos importantes para as avaliações de segurança. Estima-se que as pessoas estão expostas a cerca de 100.000 substâncias químicas (HARTUNG, 2017), enquanto que para apenas cerca de 10.000 existem avaliações de segurança (LUECHTEFELD *et al.*, 2016), ou seja, há uma grande lacuna de informações. Dado

que métodos tradicionais são caros (HARTUNG; ROVIDA, 2009; ROVIDA; HARTUNG, 2009) e lentos pelo manejo de animais, dificilmente será possível utilizar tais métodos para testar um número tão grande de substâncias. É preciso rapidez na seleção de candidatos menos perigosos desde os estágios iniciais do projeto, o que pode ser alcançado combinando abordagens *in silico* e *in vitro*, as quais possuem maior nível de reproduzibilidade e são mais econômicas (HARTUNG, 2017).

A otimização do processo nas etapas iniciais impacta positivamente a qualidade final dos resultados, isto é, aumenta as chances de que uma substância dada como perigosa seja realmente perigosa, e uma substância dada como segura, seja de fato segura. Em outros termos, pode-se dizer que métodos alternativos, quando adotados de maneira estratégica, reduzem o número de falso-positivos e falso-negativos. A redução do número de falsos negativos (produtos que são tóxicos, mas com previsão de segurança) aumenta a segurança do consumidor, enquanto que a diminuição na taxa de falsos positivos (produtos que são seguros, mas que se prevê serem tóxicos) tem um efeito direto na produtividade e permite a comercialização de produtos inovadores, os quais seriam descartados, levando ao aumento do lucro do negócio (MEIGS *et al.*, 2018).

5 CONCLUSÃO

A revisão de métodos tradicionais sob a luz da ética de bem-estar animal é uma demanda de diversos grupos da sociedade. Na toxicologia, a partir da perspectiva dos 3R's, pode-se reduzir, refinar ou substituir o uso de animais sencientes para fins de testes de segurança. Considerando os muitos fatores envolvidos, identificam-se os atuais desafios para maior adoção de métodos sem sofrimento animal:

- Processo de validação lento: para garantir confiabilidade e precisão de métodos alternativos, é preciso um processo de validação bem estruturado. É uma etapa naturalmente complexa, que envolve a colaboração entre diferentes partes — universidades, centros de pesquisa, órgãos reguladores, etc. — e requer grande conhecimento técnico-científico. A falta de integração entre os grupos envolvidos, falta de financiamento e burocracias deixam esse processo que já é demorado, ainda mais lento;
- Necessidade de combinação de métodos: ainda há uma limitação técnica na aplicação de métodos alternativos ao avaliar-se a reatividade de sistemas complexos. São necessários testes complementares para obter-se resultados com os mesmos níveis de informação que um único modelo animal fornece. Por esse motivo, a validação ágil é tão crucial, uma vez que é o meio pelo qual esses métodos são reconhecidos e ganham confiança da comunidade científica e órgãos reguladores. Além disso, os sistemas microfluídicos *organ-on-a-chip* poderão atender essa demanda;
- Diferenças entre indústrias a que os métodos são destinados: os critérios de aceitação regulatória exigidos aos métodos alternativos são muito variáveis, já que cada indústria apresenta suas particularidades. No entanto, como a validação é contexto-específica, um método pode ser tido como validado apenas para determinados parâmetros ou em determinados países. Nesse sentido, são válidos os esforços de harmonização internacional nos requisitos de teste;
- Sistemas de regulação: a ampliação do tema nos últimos anos deve-se principalmente a iniciativas regulatórias, através do reconhecimento de

testes alternativos e banimento do uso em animais em determinadas indústrias. Apesar disso, ao mesmo tempo em que a legislação se coloca como motor de mudança, também impõe barreiras. Considerando-se o contexto do REACH, a falta de clareza no processo de avaliação regulatória e a morosidade para aceitação formal de métodos já validados são, atualmente, um dos principais desafios para maior adoção de testes sem animais. Também, o interesse no mercado chinês faz com que muitas empresas continuem conduzindo métodos tradicionais;

- Importação de insumos: a dependência de importação de materiais para condução dos testes é um desafio econômico, ainda mais com a alta nos custos provocada pela pandemia da COVID-19. No entanto, métodos alternativos são mais rápidos, controláveis e reproduzíveis, o que permite a otimização de fases pré-clínicas, resultando em economia nos custos de desenvolvimento. Ademais, o menor número de falsos-positivos em avaliações de segurança tem um efeito direto na produtividade de empresas;
- Credibilidade e confiabilidade: métodos alternativos encontram resistência por uma parcela da população. É razoável assumir que, para os responsáveis por tomadas de decisão, é um risco adotar um método que pode falhar no mundo real e causar prejuízo à sociedade. Por esse motivo, é importante a divulgação de conhecimento, através de treinamentos e capacitações, para que seja construída a credibilidade e confiança acerca de métodos alternativos.

É de grande importância que se tomem ações para a superação desses desafios, uma vez que os métodos alternativos não se sustentam tão somente por suas implicações éticas, mas, também, por suas vantagens em termos de otimização de processos, custos e avanços técnico-científicos. Assim, tendo em vista a visão estratégica para a toxicologia do século XXI, os métodos alternativos também significam maior segurança para a saúde humana.

REFERÊNCIAS

AMAZONAS. Lei nº 289, de 3 de dezembro de 2015. Proíbe a utilização de animais para desenvolvimento, experimentos e testes de produtos cosméticos, de higiene pessoal, perfumes e seus componentes no Estado do Amazonas, e dá outras providências. Disponível em: https://sapl.al.am.leg.br/media/sapl/public/normajuridica/2015/9412/9412_texto_integral.pdf. Acesso em: 7 ago. 2021.

ANVISA. **Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos**. 2. ed. Brasília: ANVISA, 2012. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/cosmeticos/manuais-e-guias/guia-para-avaliacao-de-seguranca-de-produtos-cosmeticos.pdf/view>. Acesso em: 6 março 2022.

BADJATYA, Jitendra Kumar; BODLA, Ramesh. Drug Product Registration in Semi-Regulated Market. **International Journal of Drug Regulatory Affairs**, v. 1, n. 2, p. 1-6, fev. 2018. Disponível em: <http://ijdra.com/index.php/journal/article/view/3/3>. Acesso em: 11 abril 2022.

BALLS, Michael. International validation and barriers to the validation of alternative tests. In: HESTER, Ronald E.; HARRISON, Roy M. (eds.). **Issues in Environmental Science and Technology: Alternatives to Animal Testing**. Londres: Royal Society of Chemistry, 2006.

BAUMANS, Vera. Use of animals in experimental research: an ethical dilemma? **Gene therapy**, v. 11, n. 1, p. S64-S66, 2004.

BOWLES, Edwina. The myth of Replacement and the legal reality. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 46, n. 1, p. 39-41, 2018.

BRASIL. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei n. 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 9 out. 2008. Disponível em: <https://www2.camara.leg.br/legin/fed/lei/2008/lei-11794-8-outubro-2008-581883-publicacaooriginal-104628-pl.html>. Acesso em: 27 julho 2021.

BRASIL. Portaria nº 491, de 3 de julho de 2012. Institui a Rede Nacional de Métodos Alternativos - RENAMA e sua estrutura no âmbito do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação - MCTI, que será supervisionada por um Conselho Diretor. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 5 jul. 2012. Disponível em: https://www.incqs.fiocruz.br/images/stories/incqs/bracvam/Portaria_491_cria_RENAMA.pdf. Acesso em: 5 agosto 2021.

CONCEA. **Lista de Métodos Alternativos**, [20--]. Disponível em: <https://antigo.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/publicacoes/Lista-Metodos-Alternativos.pdf>. Acesso em: 25 jul. 2021

DIMASI, Joseph A.; GRABOWSKI, Henry G.; HANSEN, Ronald W. Innovation in the pharmaceutical industry: new estimates of R&D costs. **Journal of health economics**, v. 47, p. 20-33, 2016.

ECVAM. **Statement on Scientific Validity of EpiSkin Test:** an *in-vitro* test for skin corrosivity. Ispra, Italy, 31 mar. 1998. Disponível em: https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/methods/dermal/epiderm/epiddocs/episkin_statemen.pdf. Acesso em: 6 março 2022.

EFPIA. **Putting Animal Welfare Principles and 3Rs Into Action**, 2016. Disponível em: <https://www.efpia.eu/media/219744/putting-animal-welfare-principles-and-3rs-into-action.pdf>. Acesso em: 6 março 2022.

EPISKIN. **EPISKIN inaugura subsidiária no Brasil**, 09 out. 2019. Disponível em: <https://www.episkin.com.br/News/EPISKIN-brand-new-center-in-Brazil>. Acesso em: 11 maio 2022.

EUROPEAN CHEMICALS AGENCY. **The use of alternatives to testing on animals for the REACH Regulation**, jun. 2020. Disponível em: <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/c53fbd08-7fbc-11eb-9ac9-01aa75ed71a1/language-en>. Acesso em: 6 março 2022.

EUROPEAN COMMISSION. **Reach**, [20--a]. Disponível em: https://ec.europa.eu/environment/chemicals/reach/reach_en.htm. Acesso em: 6 março 2022.

EUROPEAN COMMISSION. **Ban on animal testing**, [20--b]. Disponível em: https://ec.europa.eu/growth/sectors/cosmetics/ban-animal-testing_pt. Acesso em: 6 março 2022.

EUROPEAN COMMISSION. **Statement on the Validity of In-Vitro Tests for Skin Irritation**. Ispra, Italy, 26-27 abr. 2007. Disponível em: http://www.remanet.net/noticias/archivos/ESAC26_statement_SkinIrritation_20070525-1.pdf. Acesso em: 6 março 2022.

EUROPEAN COMMISSION. **2019 report on the statistics on the use of animals for scientific purposes in the Member States of the European Union in 2015-2017**. Bruxelas, 05 fev. 2020. Disponível em: <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/04a890d4-47ff-11ea-b81b-01aa75ed71a1>. Acesso em: 11 abril 2022.

FAPESP. Pele de laboratório. **Revista FAPESP**, v. 245, p. 15-21, jul. 2016. Disponível em: https://revistapesquisa.fapesp.br/wp-content/uploads/2016/07/014-021_CAPA_Pele_245NOVO.pdf. Acesso em: 11 abril 2022.

FENTEM, Julia. No animal testing, Unilever brands and the EU's chemicals regulations. **Unilever**, 11 nov. 2020. Disponível em:

<https://www.unilever.com/news/news-search/2020/no-animal-testing-unilever-brands-and-the-eus-chemicals-regulations/>. Acesso em: 11 abril 2022.

FENTEM, Julia *et al.* Upholding the EU's Commitment to 'Animal Testing as a Last Resort' Under REACH Requires a Paradigm Shift in How We Assess Chemical Safety to Close the Gap Between Regulatory Testing and Modern Safety Science. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 49, n. 4, p. 122-132, 2021.

FERNANDES, Daniela Rangel Affonso; GADELHA, Carlos Augusto Grabois; MALDONADO, Jose Manuel Santos de Varge. Vulnerabilidades das indústrias nacionais de medicamentos e produtos biotecnológicos no contexto da pandemia de COVID-19. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 37, p. e00254720, 2021.

FIOCRUZ. INCQS busca validar método alternativo ao uso de animais. **Agência Fiocruz de Notícias**, 22 maio 2015. Disponível em: <https://agencia.fiocruz.br/incqs-busca-validar-m%C3%A9todo-alternativo-ao-uso-de-animais>. Acesso em: 11 abril 2022.

FORBES. **The Truly Staggering Cost Of Inventing New Drugs**, 2012. Disponível em: <https://www.forbes.com/sites/matthewherper/2012/02/10/the-truly-staggering-cost-of-inventing-new-drugs/?sh=6084c2cf4a94>. Acesso em: 19 maio 2022.

FRAME. **Fact or fiction? Mapping perceptions of animal testing**, 2020. Disponível em: https://frame.org.uk/wp-content/uploads/2020/06/FRAME-report_final.pdf. Acesso em: 11 abril 2022.

FRAME. **FRAME supports call to uphold values of EU animal testing ban**, 31 mar. 2021. Disponível em: <https://frame.org.uk/latest/frame-supports-call-to-uphold-values-of-eu-animal-testing-ban/>. Acesso em: 11 abril 2022.

HACKAM, Daniel G.; REDELMEIER, Donald A. Translation of research evidence from animals to humans. **Jama**, v. 296, n. 14, p. 1727-1732, 2006.

HARTUNG, Thomas; ROVIDA, Costanza. Chemical regulators have overreached. **Nature**, v. 460, n. 7259, p.1080–1081, 2009.

HARTUNG, Thomas. Evolution of toxicological science: the need for change. **International Journal of Risk Assessment and Management**, v. 20, n. 1-3, p. 21-45, 2017.

HARTUNG, Thomas. Perspectives on *in vitro* to *in vivo* extrapolations. **Applied in vitro Toxicology**, v. 4, n. 4, p. 305-316, 2018.

HUMANE SOCIETY INTERNATIONAL. **China & Cosmetics Animal Testing FAQ**, [20--]. Disponível em: https://www.hsi.org/wp-content/uploads/assets/pdfs/bcf_china_faqs.pdf. Acesso em: 12 abril 2022.

INSTITUTE FOR *IN VITRO* SCIENCES. **China's Acceptance of Certain Non-Animal Testing Methods for the Regulation of Cosmetics**, 3 abr. 2019. Disponível em: <https://iivs.org/2019/04/03/china-accepts-new-alternative-methods-for-cosmetics/>. Acesso em: 12 abril 2022.

INTERNATIONAL TRADE ADMINISTRATION. **China: Cosmetics and Toiletries Industry**, 04 jan. 2022. Disponível em: <https://www.trade.gov/country-commercial-guides/china-cosmetics-and-toiletries-industry#:~:text=According%20to%20Statista%2C%20the%20retail,market%20after%20the%20United%20States>. Acesso em: 11 maio 2022.

LUECHTEFELD, Thomas *et al.* Global analysis of publicly available safety data for 9,801 substances registered under REACH from 2008-2014. **ALTEX - Alternatives to animal experimentation**, v. 33, v. 2, p. 95-109, 2016. Disponível em: <https://www.altex.org/index.php/altex/article/view/162>. Acesso em: 6 março 2022.

MA, Chao *et al.* Organ-on-a-chip: a new paradigm for drug development. **Trends in pharmacological sciences**, v. 42, n. 2, p. 119-133, 2021.

MATO GROSSO DO SUL. Lei nº 4.538, de 3 de junho de 2014. Proíbe a utilização de animais para desenvolvimento, experimento e teste de produtos cosméticos e de higiene pessoal, perfumes e seus componentes e dá outras providências. **Diário Oficial [do] Estado do Mato Grosso do Sul**: seção 1, Campo Grande, MS, p. 1-2, 4 jun. 2014. Disponível em: <http://aacpdappls.net.ms.gov.br/applications/legislacao/secoge/govato.nsf/2cab8d75940ca72e04256d1a004acf14/76a1b291c530658904257ced004a957c?OpenDocument>. Acesso em: 7 ago. 2021.

MEIGS, Lucy *et al.* Animal testing and its alternatives: The most important omics is economics. **ALTEX - Alternatives to animal experimentation**, v. 35, n. 3, p. 275-305, 2018.

MINAS GERAIS. Lei nº 23.050, de 25 de julho de 2018. Proíbe a utilização, no Estado, de animais para desenvolvimento, experimento e teste de perfumes e produtos cosméticos e de higiene pessoal e seus componentes. **Diário Oficial [do] Estado de Minas Gerais**: seção 1, Belo Horizonte, MG, p. 4, 26 jul. 2018. Disponível em: <https://www.almg.gov.br/consulte/legislacao/completa/completa.html?tipo=LEI&num=23050&comp=&ano=2018>. Acesso em: 7 ago. 2021.

MORALES, Marcelo M. Métodos alternativos à utilização de animais em pesquisa científica: mito ou realidade?. **Ciência e Cultura**, v. 60, n. 2, p. 33-36, 2008.

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM. **Tox21**, 2020a. Disponível em: <https://ntp.niehs.nih.gov/whatwestudy/tox21/index.html>. Acesso em: 2 maio 2022.

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM. **Alternative Methods Accepted by US Agencies**, 2020b. Disponível em:

<https://ntp.niehs.nih.gov/whatwestudy/niceatm/accept-methods/index.html>. Acesso em: 16 maio 2022.

OCDE. Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment. Paris, n. 34, 18 ago. 2005. Disponível em: <https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oecd/oecd-gd34.pdf>. Acesso em: 6 março 2022.

PARÁ. Lei nº 8.361, de 11 de maio de 2016. Proíbe a utilização de animais para desenvolvimento, experimento e teste de produtos cosméticos e de higiene pessoal, perfumes e seus componentes. **Diário Oficial [do] Estado do Pará:** seção 1, Belém, PA, p. 5, 13 maio 2016. Disponível em: <https://www.sistemas.pa.gov.br/sisleis/legislacao/3108>. Acesso em: 7 ago. 2021.

PARANÁ. Lei nº 18.668, de 22 de dezembro de 2015. Proíbe a utilização de animais para desenvolvimento de experimentos e testes de produtos cosméticos, de higiene pessoal, perfumes, e seus componentes. **Diário Oficial [do] Estado do Paraná:** seção 1, Curitiba, PR, p. 11, 23 dez. 2015. Disponível em: <http://www.assembleia.pr.leg.br/agoraelei/?showPopup=animais-nao-podem-ser-usados-em-testes-de-cosmeticos-e-perfumes>. Acesso em: 7 ago. 2021.

PEDROSA, Tatiana do Nascimento. Desenvolvimento de epiderme humana reconstruída (RHE) como plataforma de testes in vitro para irritação, sensibilização, dermatite atópica e fotoimunossupressão. 2017. Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. São Paulo, 2017.

PERNAMBUCO. Lei nº 16.498, de 6 de dezembro de 2018. Altera a Lei nº 15.226, de 7 de janeiro de 2014, que institui o Código Estadual de Proteção aos Animais, no âmbito do Estado de Pernambuco, para proibir a utilização de animais durante o desenvolvimento, experimento e teste de cosméticos, perfumes e produtos de higiene pessoal e de limpeza, e dá outras providências. **Diário Oficial [do] Estado de Pernambuco:** seção 1, Recife, PB, p. 4, 07 dez. 2018. Disponível em: [http://200.238.105.211/cadernos/2018/20181207/6-PoderLegislativo/PoderLegislativo\(20181207\).pdf](http://200.238.105.211/cadernos/2018/20181207/6-PoderLegislativo/PoderLegislativo(20181207).pdf). Acesso em: 7 ago. 2021.

PETA. **PETA Answers Your Questions on Animal Testing for Cosmetics,** [20--]. Disponível em: <https://www.peta.org.uk/features/animal-testing-cosmetics/#:~:text=2.,likely%20to%20be%20much%20higher>. Acesso em: 12 abril 2022.

PETA. **China Announces New Animal Testing Policy for Cosmetics After PETA Push,** 2021. Disponível em: <https://www.peta.org/media/news-releases/china-announces-new-animal-testing-policy-for-cosmetics-after-peta-push/>. Acesso em: 12 abril 2022.

PRESGRAVE, Octávio Augusto França. Alternativas para animais de laboratório: do animal ao computador. In: ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. (orgs.). **Animais de laboratório:** criação e experimentação. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz,

2002. p. 361-367. Disponível em: https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/12296/2/Animais_Octavio_2.pdf. Acesso em: 6 março 2022.

PRESGRAVE, Octávio Augusto França. **Proposta de criação do Centro Brasileiro para Validação de Métodos Alternativos:** formação, estrutura e funcionamento. 2012. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2012.

PRESGRAVE, Octavio *et al.* Brazilian Center for the Validation of Alternative Methods (BraCVAM) and the process of validation in Brazil. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 44, n. 1, p. 85-90, 2016.

RIO DE JANEIRO. Lei nº 7.814 de 15 de dezembro de 2017. Proíbe a utilização de animais para desenvolvimento, experimentos e testes de produtos cosméticos, higiene pessoal, perfumes, limpeza e seus componentes, no âmbito do estado do Rio de Janeiro, sem prejuízo de proibições e sanções previstas em outros dispositivos legais: municipal, estadual ou federal, e dá outras providências. **Diário Oficial [do] Estado do Rio de Janeiro**: seção 1, Rio de Janeiro, RJ, p. 4, 18 dez. 2017. Disponível em: <http://alerjln1.alerj.rj.gov.br/CONTLEI.NSF/c8aa0900025feef6032564ec0060dfff/004d830341147e03832581fb005bfbf9?OpenDocument>. Acesso em: 7 ago. 2021.

ROVIDA, Costanza; HARTUNG, Thomas. Re-evaluation of animal numbers and costs for *in vivo* tests to accomplish REACH legislation requirements for chemicals: a report by the transatlantic think tank for toxicology (t4). **ALTEX - Alternatives to animal experimentation**, v. 26, n. 4, p.187–208, 2009.

SÃO PAULO. Lei nº 15.316, de 23 de janeiro de 2014. Proíbe a utilização de animais para desenvolvimento, experimento e teste de produtos cosméticos e de higiene pessoal, perfumes e seus componentes e dá outras providências. **Diário Oficial [do] Estado de São Paulo**: seção 1, São Paulo, SP, p. 1, 24 jan. 2014. Disponível em: <https://www.al.sp.gov.br/repositorio/legislacao/lei/2014/lei-15316-23.01.2014.html#:~:text=Pro%C3%ADbe%20a%20utiliza%C3%A7%C3%A3o%20de%20animais,componentes%20e%20d%C3%A1%20outras%20provid%C3%A3ncias>. Acesso em: 7 ago. 2021.

RUSSELL, William Moy Stratton; BURCH, Rex Leonard. **The principles of humane experimental technique**. Londres: Methuen, 1959.

STATISTA. **Chemical industry worldwide** - statistics & facts. 1 nov. 2021. Disponível em: <https://www.statista.com/topics/6213/chemical-industry-worldwide/#dossierKeyfigures>. Acesso em: 2 maio 2022.

TAMIMI, Nihad AM; ELLIS, Peter. Drug development: from concept to marketing!. **Nephron Clinical Practice**, v. 113, n. 3, p. c125-c131, 2009.

TAYLOR, Katy. Ten years of REACH: An animal protection perspective. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 46, n. 6, p. 347-373, 2018.

TAYLOR, Katy. Recent developments in alternatives to animal testing. In: HERRMANN, Kathrin; JAYNE, Kimberley (ed.). **Animal experimentation:** working towards a paradigm change. Leiden: Brill, 2019. p. 585-609.

TRATNIK, Silvia Cardoso; PENNACCHI, Paula Comune; MARIA-ENGLER, Silvya Stuchi. Biossegurança em métodos alternativos ao uso de animais de experimentação. In: HIRATA, Mario Hiroyuki; MANCINI FILHO, Jorge; HIRATA, Rosario Dominguez Crespo (ed.). **Manual de Biossegurança.** Barueri: Manole, 2017.

UNIÃO EUROPEIA. Diretiva 2010/63/EU do Parlamento e do Conselho, de 22 de Setembro de 2010. Altera a Directiva 76/768/CEE do Conselho relativa à protecção dos animais utilizados para fins científicos. **Jornal Oficial da União Europeia:** Bruxelas, 22 set. 2010. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32010L0063&from=SV>. Acesso em: 8 março 2022.

UNIÃO EUROPEIA. Regulamento (EC) Nº 1907/2006 do Parlamento e do Conselho, de 18 de dezembro de 2006, relativo ao registro, avaliação, autorização e restrição de produtos químicos (REACH), estabelecendo a Agência Europeia de Químicos (ECHA). **Jornal Oficial da União Europeia:** Bruxelas, 18 dez. 2006. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32006R1907>. Acesso em: 8 março 2022.

UNILEVER *et al.* [Open letter: Cosmetics Animal Testing Ban Effectively Shredded]. Destinatários: David Maria Sassoli, Charles Michel, Ursula von der Leyen. dez. 2020. 1 carta. Disponível em: <https://assets.unilever.com/files/92ui5egz/production/e2bf9d4c87b04d2801229158011d68f0ad1638b7.pdf/open-letter-cosmetics-animal-testing-ban-effectively-shredded.pdf>. Acesso em: 20 março 2022.

VAN DER JAGT, Katinka *et al.* Alternative approaches can reduce the use of test animals under REACH. **Report Eur**, v. 21405, p. 1-25, 2004. Disponível em: <https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.115.4847&rep=rep1&type=pdf>. Acesso em 6 março 2022.

VICHARE, Abhijit S. *et al.* Application of the 3Rs Principles in the Development of Pharmaceutical Generics. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 125, p. 105016, jul. 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0273230021001574?via%3Dhub>. Acesso em 2 maio 2022.

Bianca Beloni

19/05/2022

Data e assinatura do aluno(a)

19/05/2022

Data e assinatura do orientador(a)