



UTILIZAÇÃO DO ENSAIO HET-CAM COMO ALTERNATIVA PARA AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE PRODUTOS OFTÁLMICOS

HET-CAM test as an alternative for toxicological evaluation of ophthalmic products

Jessé de Oliveira da Silva^{1*}, Kilma Gabrielle Barbosa Pimentel¹, Ester Batista de Oliveira Santos¹, Vimerson Matheus Lucena de Oliveira², Felipe Hugo de Alencar Fernandes^{1,2*}

¹Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campina Grande – PB, Brasil.

²UNIFACISA Centro Universitário, Campina Grande – PB, Brasil.

*e-mail: jessedoliveiradasilva98@gmail.com/felipehugo@live.com

RESUMO

A avaliação toxicológica a nível ocular é uma etapa extremamente importante visando a segurança dos produtos oftálmicos. Estes ensaios tiveram início com o teste Draize em coelhos. Com os avanços da ciência, novos ensaios visando reduzir o uso de animais e/ou seu sofrimento vem sendo cada vez mais requisitado. Um destes testes é o chamado *HET-CAM* (avaliação *in vitro* do potencial irritante utilizando ensaios na membrana cório-alantóide), que utiliza ovos férteis de galinhas incubados. Este trabalho tem por objetivo apresentar as principais características do teste e sua aplicabilidade dentro dos ensaios toxicológicos de produtos oftálmicos. Para tanto, um levantamento foi realizado em bases de dados como o Science Direct, Pubmed e a plataforma de periódicos da CAPES, utilizando como descritores “HET-CAM”, “produtos oftálmicos *in vitro*”, “toxicidade ocular” e “toxicidade de produtos oftálmicos”. Foram selecionados artigos em língua inglesa, portuguesa e espanhol, publicados principalmente entre os últimos dez anos, sendo excluídos os duplicados e os não compatíveis com a temática. Como resultados, observou-se que HET-CAM é usado para fornecer dados sobre os possíveis efeitos na conjuntiva humana ou animal, sendo um sistema de pontuação com maior repetibilidade e a mesma subjetividade do Draize. O HET-CAM obteve sucesso em diversas formas farmacêuticas destinado para uso oftálmico, como microemulsão, emulsão, niossomas, gel cristal líquido, e mais atualmente, películas/inserções de gelificação *in situ*. Entretanto, apresenta algumas



limitações, como resultado falso-positivo e discordância na avaliação do grau irritante, principalmente quando comparado ao padrão-ouro (teste de Draize). Embora ainda não existam testes que atuem de forma isolada para substituir completamente os ensaios *in vivo*, o HET-CAM é um teste que não apresenta conflitos éticos, barato, de fácil procedimento, que permite a simulação de uma irritação conjuntival em humanos. É válido ressaltar que o mesmo deve ser realizado juntamente com outros testes e que as limitações mencionadas sejam levadas em consideração por parte do pesquisador, visando a obtenção de resultados mais confiáveis.

Palavra-chave: HET-CAM. Produtos Oftálmicos. Toxicidade ocular.

Área: Farmácia

ABSTRACT

Toxicological assessment at the eye level is an extremely important step towards the safety of ophthalmic products. These trials started with the Draize test on rabbits. With advances in science, new trials aiming to reduce the use of animals and / or their suffering have been increasingly requested. One of these tests is the so-called HET-CAM (in vitro evaluation of the irritant potential using chorio-allantoic membrane assays), which uses fertile eggs from incubated chickens. This work aims to present the main characteristics of the test and its applicability within the toxicological tests of ophthalmic products. To this end, a survey was carried out in databases such as Science Direct, Pubmed and the CAPES journal platform, using as descriptors "HET-CAM", "ophthalmic products *in vitro*", "ocular toxicity" and "toxicity of ophthalmic products". Articles in English, Portuguese and Spanish were published, mainly published in the last ten years, excluding duplicates and those not compatible with the theme. As a result, it was observed that HET-CAM is used to provide data on the possible effects on the human or animal conjunctiva, being a scoring system with greater repeatability and the same subjectivity as Draize. HET-CAM has been successful in several pharmaceutical forms intended for ophthalmic use, such as microemulsion, emulsion, niosomes, liquid crystal gel, and more recently, in situ gelation films / inserts. However, it has some limitations, such as false-positive results and disagreement in the evaluation of the irritating degree, especially when compared to the gold standard (Draize test). Although there are still no tests that work in isolation to completely replace *in vivo* tests, HET-CAM is a test that does not present ethical conflicts, is cheap, easy to perform, and allows the simulation of conjunctival irritation in humans. It is worth noting that the same must be performed together with other tests and that the mentioned limitations are considered by the researcher, to obtain more reliable results.

Keywords: HET-CAM. Ophthalmic Products. Eye toxicity.



1 INTRODUÇÃO

Com objetivo de garantir eficácia, qualidade e segurança, os produtos farmacêuticos precisam ser avaliados quanto aos seus aspectos toxicológicos. No caso dos produtos de interesse oftálmico, a toxicidade ocular é uma etapa crucial no desenvolvimento de novas formulações, tendo em vista os aspectos biológicos da região ocular (WILSON et al., 2015). Os tecidos oculares, como a conjuntiva e a córnea, estão sujeitos a lesões e são suscetíveis aos efeitos adversos de ingredientes ativos farmacêuticos e/ou excipientes usados em preparações oftalmológicas (ABDELHADER et al., 2015).

A avaliação do risco de irritação ocular teve início com o teste *in vivo* em coelhos, porém, só em 1944, foi publicado por John H. Draize, toxicologista da FDA (Food and Drug Administration), um procedimento padrão para quantificar a lesão ocular, denominado *Draize Eye Test*. Este teste foi o mais utilizado por muitos anos, uma vez que nenhum outro apresenta todos os requisitos para substituí-lo. (HARTUNG et al., 2010). Por outro lado, além de não apresentar boa repetibilidade, parâmetro importante para confiabilidade do teste, provoca extremo sofrimento ao animal sendo, por conseguinte, bastante criticado pelas organizações de bem-estar animal.

Em alternativa ao teste ocular Draize, os cientistas passaram a desenvolver métodos para substituir os ensaios *in vivo* que demonstrasse resultados que permitissem avaliar o nível de toxicidade de determinados produtos (OLIVEIRA et al., 2012). Uma das técnicas que apresentou semelhança e eficácia com o *Draize* foi o teste denominado HET-CAM, aceito pelas agências reguladoras de muitos países europeus, como exemplo, Alemanha, França e Reino Unido (ABDELHADER et al., 2015).

Este teste é aplicado para observação de irritações oftálmicas, mostrando uma correlação com o ensaio *in vivo*, uma vez que nessa metodologia utiliza-se a vasculatura completa (artérias, capilares e veias) dos ovos fertilizados. Além disso, também é possível analisar possíveis processos inflamatórios, mostrando semelhanças na identificação de ocorrência de irritabilidade conjuntiva dos olhos do coelho, sendo capaz de prever o possível potencial irritante. Outro ponto a ser destacado é que o método alternativo não refere-se somente a substituição, mas é definido como uma forma de trocar, diminuir ou

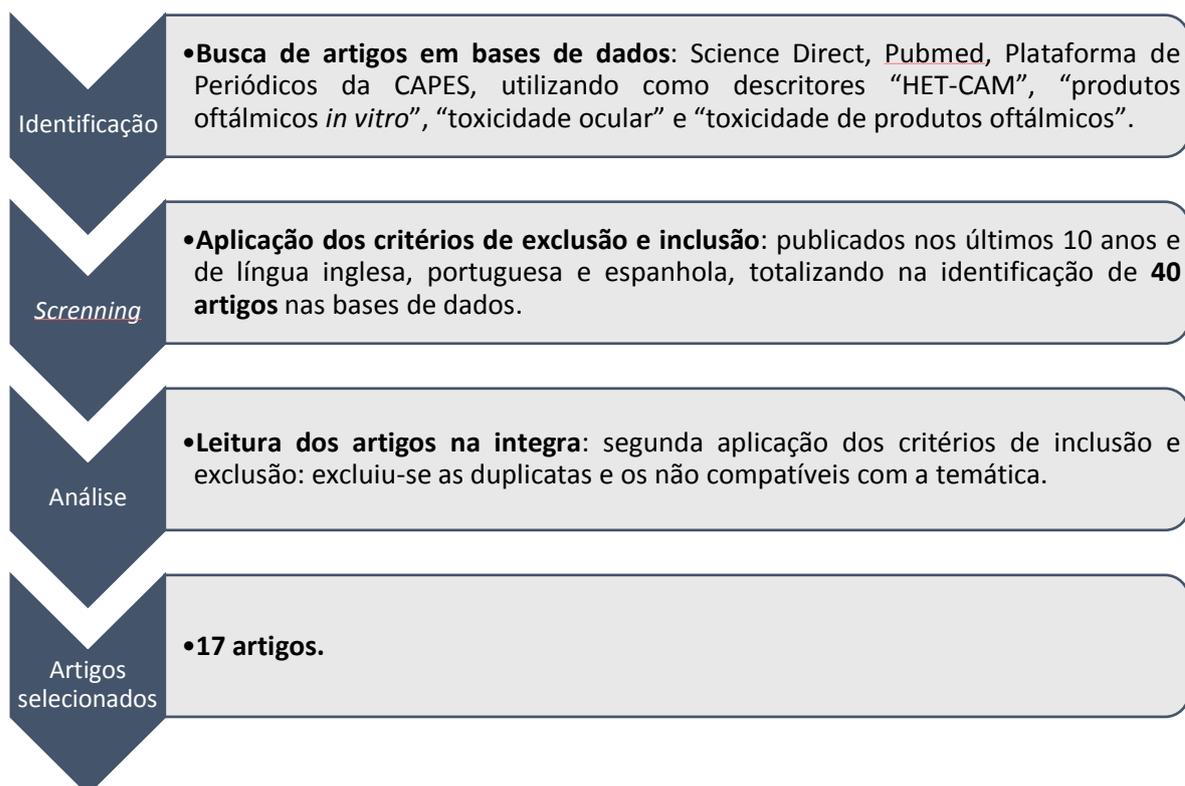
refinar a utilização dos animais para testes experimentais, no intuito de reduzir o sofrimento ocasionado pelos produtos (DEROUICHE E ABDENNOU, 2017; KANOUIA et al., 2014; MCKENZIE et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2012).

Considerando a grande importância do teste alternativo para avaliação do potencial toxicológico de produtos oftálmicos, este trabalho teve por objetivo apresentar as principais características do teste e sua aplicabilidade dentro dos ensaios toxicológicos de produtos oftálmicos.

2 METODOLOGIA

Para esta revisão foram definidas palavras-chave que foram usadas na busca em bancos de dados científicos. As etapas da revisão estão descritas na figura 1.

Figura 1 – Fluxograma das etapas da revisão.





3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Características gerais do teste HET-CAM

A “CAM” é a membrana respiratória vascular fetal constituído pelo cório e alantóide fundidos. O alantóide tem a função de manter a viabilidade do embrião da galinha, atuando como órgão respiratório, excretor e de armazenamento embrionário. No período do desenvolvimento do embrião da ave, o alantóide torna-se maior, circundando o embrião e liga-se com o cório para formar a CAM. A fusão das duas membranas permite a livre troca de gases entre o embrião e o ambiente. A denominação “HET-CAM” passou a ser utilizada quando observou-se que a partir da CAM é possível obter informações sobre toxicidade de produtos oftálmicos fornecendo informações sobre os possíveis efeitos da formulação testada na conjuntiva humana ou animal ao invés de monitorar a citotoxicidade *in vivo* (BARILE, 2010; ABDELHADER et al., 2015).

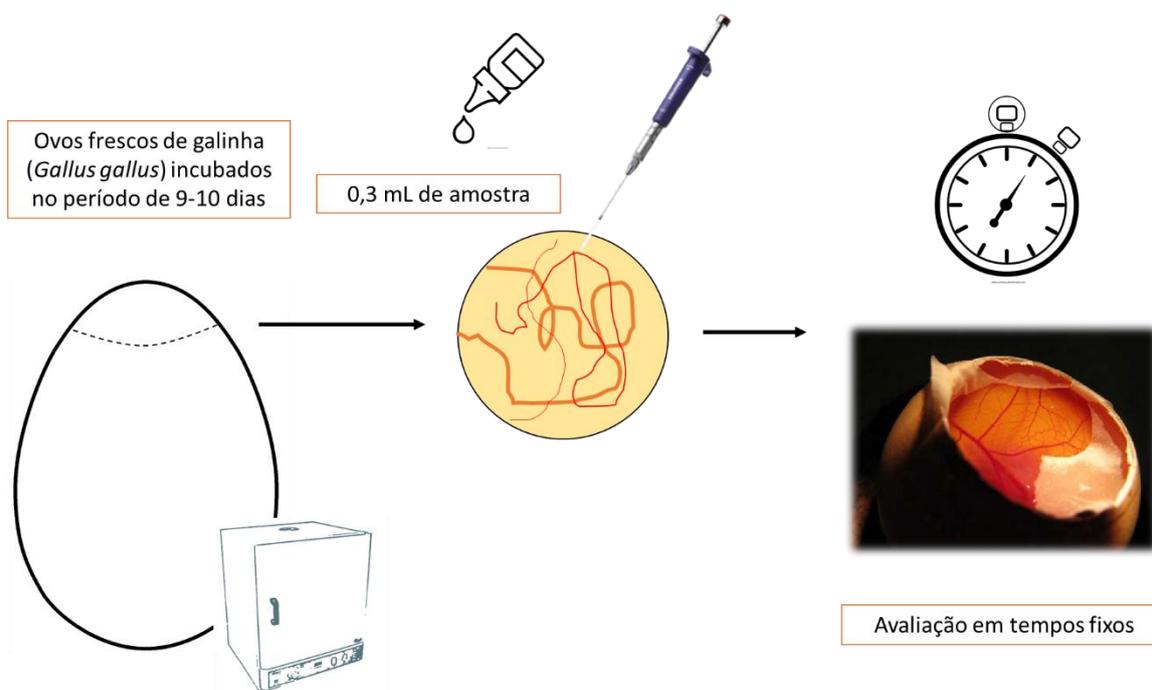
De acordo com Kanoujia e colaboradores (2014), o ensaio HET-CAM é um caso circunjacente entre sistemas *in vivo* e *in vivo*, por esse motivo não existem conflitos em relações éticas. Além de poder ser usado no desenvolvimento de formulações líquidas, foi possível observar no estudo de Abdelhader et al. (2015) que esta metodologia, também obteve sucesso na avaliação toxicológica de outras formas farmacêuticas para uso oftálmico, como microemulsão, emulsão, niossomas, géis, líquido cristalino, e mais atualmente, películas/inserções de gelificação *in situ*.

Outra característica fundamental do HET-CAM é o seu baixo custo operacional, uma vez que se trata de um procedimento simples, sem grandes investimentos, podendo ser aplicado com poucos recursos (DEROUICHE E ABDENNOU, 2017). Além disso, esta metodologia possibilita a redução do sofrimento do animal, avaliando parâmetros igualmente importantes e confiáveis quanto aqueles observados no teste Draize, por exemplo (ABDELHADER et al., 2015).

3.2 Considerações sobre o procedimento

Para a realização do teste são selecionados ovos frescos de galinha (*Gallus gallus*) incubados no período de 9-10 dias, período no qual o embrião não chegou ao desenvolvimento dos tecidos nervosos e a percepção da dor ainda está inativa. Terminado o período de incubação, é retirada a casca ao redor da câmara de ar, evidenciando a membrana interna umedecida com solução salina e retirada com bastante cuidado, para revelar a membrana cório-alantóide abaixo (Figura 2). Em seguida, é aplicado 0,3 ml da formulação em teste diretamente na CAM, observando as reações durante um período de 300s. O tempo para o aparecimento dos eventos (pontos finais) devem ser anotados, monitorados e registrados (filmado), em segundos (ICCVAM, 2010; DESHMUKH et al., 2012; MCKENZIE et al., 2015; DEROUCHE et al., 2017).

Figura 2 – Protocolo geral do teste HET-CAM



Fonte: Autoria própria.



Para o teste negativo utiliza-se a solução salina a 0,9% e, para o teste positivo, hidróxido de sódio (NaOH) a 0,1 mol/L. Com o objetivo de garantir resultados reprodutíveis e com alta confiabilidade, recomenda-se a utilização de fotografias de referência para todos os pontos finais. Os três pontos finais a serem observados são hemorragia (sangramento dos vasos), lise vascular (desintegração do vaso sanguíneos) e a coagulação (desnaturação proteica intra e extravascular) (ICCVAM, 2010; DESHMUKH et al., 2012, MCKENZIE et al., 2015, DEROUCHE et al., 2017).

A avaliação tem como base o surgimento de cada um dos três pontos de extremidade do HET-CAM em intervalos de tempo fixos de 30 segundos, 2 minutos e 5 minutos (DEROUCHE et al., 2017). O tempo para lise, hemorragia e coagulação recebem uma pontuação específica de acordo com o tempo em que cada evento acontece. Esta relação pode ser observada na Tabela 1.

Tabela 1 - Esquema de pontuação para testes de irritação com o método de teste.

Efeitos	Pontuação		
	0,5 min (30s)	2 min (120s)	5 min (300s)
Lise	5	3	1
Hemorragia	7	5	3
Coagulação	9	7	5

Fonte: ICCVAM, 2010, DEROUCHE et al., 2017 (Adaptado)

Em seguida, as pontuações são somadas obtendo um valor numérico único, evidenciando a capacidade de irritação da formulação testada em uma escala comum que varia de 0 a 21, demonstrada na Tabela 2 (ICCVAM, 2010). O teste deve ser realizado em triplicatas e, com os resultados obtidos, determina-se uma média (entre 0 a 21), indicado às categorias irritantes e não-irritante (Tabela 2) (DEROUCHE et al., 2017).



Tabela 2 - Categoria de irritação de acordo com a faixa de pontuação do HET-CAM.

Faixa de pontuação	Categoria de irritação
0 a 0,9	Não rotulado
1 a 4,9	Ligeira irritação
5 a 8,9	Irritação moderada
9 a 21	Irritação grave

Fonte: ICCVAM, 2010; DEROUICHE et al; 2017 (adaptado)

3.3 Aplicações do teste em produtos oftálmicos

Em um estudo realizado por Jimenez et al. (2010), o teste de HET-CAM foi realizado com emulsões de nanopartículas (NPs) de poli (D,L-lactido-coglicolídeo) (PLGA) carregadas com tripsina de metila (TM) para cuidados de lentes de contatos. Ao final do teste, observou-se que não houve nenhuma irritação em emulsões do tipo NP13 (com poloxamina), e uma leve irritação em NP1 (apenas PLGA), NP12 (com glicerol) e NP14 (glicerol e poloxamina). O teste também foi realizado para a avaliação da toxicidade de comprimidos FizziClean™, utilizados para cuidados de lentes de contato gelatinosas, em que obteve-se resultados que indicaram uma irritação moderada.

Ainda neste mesmo estudo, os autores realizaram o ensaio *in vivo* proposto por Draize que indicou uma ligeira irritação na conjuntiva do coelho após uma hora da administração do NP12 contendo glicerol e, o produto comercial FizziClean™, também provocou hiperemia e processo inflamatório na íris e conjuntiva do animal após uma hora da aplicação. Dessa forma, descobriu-se que o FizziClean™, considerado pelo teste HET-CAM moderadamente irritante, apresenta, no teste *in vivo*, inflamação e hiperemia na íris e na conjuntiva, sendo necessário 24 horas para melhora dos sintomas. Tal fato, demonstra uma das limitações existentes na metodologia HET-CAM.

Em outra formulação, nanopartículas de poli (3-hidroxiobutirato-co-3-hidroxi valerato) ou apenas PHBV-NPs, foram desenvolvidas para encapsular a hidrocortisona (HC) para administração oftálmica tópica. A partir da realização do HET-



CAM, observou-se que a irritação de PHBV-NPs e HC-PHBV-NPs não apresentou nenhum dano aos vasos sanguíneos na superfície da CAM após 5 minutos, sendo, portanto, classificada como não irritante. Não foram realizados teste *in vivo*, mas sim o Teste de Opacidade e Permeabilidade da Córnea Bovina (BCOP), que apresenta-se como alternativa comprovada para ser usado no monitoramento alteração da transparência e permeabilidade da córnea. Com a realização deste teste, observou-se que os HC-PHBV-NPs não são irritantes e não produzem alterações na córnea, o que indica que os testes HET-CAM e BCOP indicaram os mesmos resultados (não irritantes), aumentando a confiabilidade do produto em relação a toxicidade ocular (ÁLVAREZ-ÁLVAREZ et al., 2019).

Ao realizar o HET-CAM em uma preparação farmacêutica de doze nanoemulsões (NEs) para melhorar biodisponibilidade do medicamento ocular no tratamento de glaucoma, Mahboobian et al. (2019) observaram o potencial irritante de várias substâncias como, por exemplo, os surfactantes. Entre as doze preparações, só uma foi classificada como não irritante e, com a realização do método *ex vivo* BCOP (XXXX), também foi possível classificar esta mesma preparação como não irritante. Deste modo, o HET-CAM e o BCOP foram capazes de rastrear a formulação mais adequada em termos de toxicidade ocular.

Outro tipo de formulação na qual utilizou-se a metodologia HET-CAM para a avaliação toxicológica, foi um gel *in situ* de nanopartículas de quitosana carregados com dorzolamida para tratamento de glaucoma. Este experimento foi realizado por Katiyar et al. (2014), no qual obtiveram uma pontuação final de 0,33, de acordo com a tabela de categoria de irritação demonstrada na sessão 3.2. Entretanto, não foram feitos testes *in vivo* nem testes utilizando outro método *in vitro* para resultados mais confiáveis.

Fernández-Ferreiro e colaboradores (2014) avaliaram a toxicidade do colírio de voriconazol e fluconazol com HET-CAM, obtendo uma pontuação final de zero, sendo agrupado, portanto, na categoria de não irritante. No entanto, assim como no ensaio realizado por Katiyar et al. (2014), nenhum teste *in vitro* e *in vivo* foram efetuados para correlacionar com os resultados obtidos pelo HET-CAM o que torna os resultados menos confiáveis.



3.4 Principais limitações do teste

De acordo com o Comitê de Coordenação Internacional para a Validação de Métodos Alternativos (ICCVAM, 2010), a confiabilidade do HET-CAM não assegura sua utilização como teste para classificar formas farmacêuticas como irritantes ou não irritantes, bem como não garante a segurança da substância utilizada em relação a todas as categorias de irritações analisadas no teste. No estudo realizado por Oliveira e colaboradores (2012), ao comparar o teste Draize com o HET-CAM, foi possível observar uma diferença entre os resultados, ao avaliar através das duas metodologias 20 colírios não irritantes. Como resultado, o HET-CAM apresentou quatro falsos-positivos dentre os colírios testados resultando em especificidade e precisão de 80%.

Para medir o potencial de irritação ocular, fazendo análise comparativa dos resultados do HET-CAM, e testes “in vivo”, como por exemplo o teste Draize, Scheel et al. (2011) realizaram um ensaio aplicando substâncias líquidas e sólidas durante um período de nove dias. Quando aplicadas substâncias bastante irritantes, o HET-CAM não conseguiu evidenciar a irritação da mesma forma que o teste Draize, já que em alguma delas o grau de irritação demonstrado na membrana era leve ou moderado e no teste de coelhos era grave ou severa. Sendo assim, este estudo mostrou que o HET-CAM não apresentou uma precisão quanto a avaliação da irritabilidade ocular quando exposta a alguns elementos, revelando que o mesmo não deve ser utilizado como método de classificação independente.

Ao analisar as características dos estudos que envolveram a aplicação do HET-CAM, é importante levar em consideração as limitações da metodologia, tanto em relação a subjetividade do observador ao identificar o surgimento dos três pontos finais, tanto na incapacidade de revelar a reversibilidade que pode ocorrer em *in vivo*. Além disso, com o uso do HET-CAM observa-se apenas a toxicidade aguda uma vez que se realiza apenas a aplicação de uma dose do produto e a ocorrência de toxicidade crônica não é levada em consideração (Fernández-Ferreiro et al., 2014).



4 CONCLUSÃO

O teste HET-CAM surgiu como uma característica de avaliação alternativa dos ensaios *in vivo*, entretanto, até o momento, não existe teste que atue de forma isolada para substituir completamente os ensaios *in vivo*. É um teste que não apresenta conflitos éticos, sem custo elevado, de fácil procedimento, que permite a simulação de uma irritação conjuntival em humanos.

Por outro lado, com o ensaio utilizando a membrana cório-alantóide comparado ao teste Draize utilizando a mesma substância ou forma farmacêutica, observou-se resultados falso-positivo, mostrando confiabilidade de 80%. Dessa forma, é importante ressaltar que o HET-CAM deve ser realizado juntamente com outro(s) teste(s) e que as limitações mencionadas devem ser consideradas pelo pesquisador responsável, visando a obtenção de resultados mais confiáveis.

REFERÊNCIAS

ABDELKADER, H.; PIERSCIONEK, B.; CAREW, M.; Wu, Z.; ALANY, R. G. Critical appraisal of alternative irritation models: three decades of testing ophthalmic pharmaceuticals. **British medical bulletin**, v. 113, n. 1, p. 59-71, 2015.

ÁLVAREZ-ÁLVAREZ, L.; BARRAL, L.; BOUZA, R.; FARRAG, Y.; OTERO-ESPINAR, F.; FEIJÓO-BANDÍN, S.; Lago, F. Hydrocortisone loaded poly-(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) nanoparticles for topical ophthalmic administration: Preparation, characterization and evaluation of ophthalmic toxicity. **International journal of pharmaceutics**, v. 568, p. 118519, 2019.

BARILE, F. A. Validating and troubleshooting ocular *in vitro* toxicology tests. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, v. 61, n. 2, p. 136-145, 2010.

DHAVAL, M.; DEVANI, J.; PARMAR, R.; SONIWALA, M. M.; CHAVDA, J. Formulation, and optimization of microemulsion based sparfloxacin *in-situ* gel for ocular delivery: *In vitro* and *ex vivo* characterization. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 55, p. 101373, 2019.

DEROUICHE, M. T. T.; ABDENNOUR, S. HET-CAM test. Application to shampoos in developing countries. **Toxicology in Vitro**, v. 45, p. 393-396, 2017.



DESHMUKH, G. R.; Kumar, K. H.; REDDY, P. V. S.; RAO, B. A.; KUMAR, C. V. S. Irritation Potential of Aqueous Leaf Extract of *Achyranthes aspera* by In Vitro and In Vivo Method. **ISRN Toxicology**, v. 2012, 2012.

FERNÁNDEZ-FERREIRO, A.; GONZÁLEZ BARCIA, M.; GIL MARTÍNEZ, M.; BLANCO MENDEZ, J.; LAMAS DÍAZ, M. J.; OTERO ESPINAR, F. J. Análisis de la toxicidad ocular de los colirios de voriconazol y fluconazol con HET-CAM. **Farmacia Hospitalaria**, v. 38, n. 4, p. 300-304, 2014.

HARTUNG, T.; BRUNER, L.; CURREN, R.; ESKES, C.; GOLDBERG, A.; MCNAMEE, P.; SCOTT, L.; ZUANG, V. First alternative method validated by a retrospective weight-of-evidence approach to replace the Draize eye test for the identification of non-irritant substances for a defined applicability domain. **ALTEX-Alternatives to animal experimentation**, v. 27, n. 1, p. 43-51, 2010.

JIMENEZ, N.; GALAN, J.; VALLET, A.; EGEA, M. A.; GARCIA, M. L. Methyl trypsin loaded poly (D, L-lactide-coglycolide) nanoparticles for contact lens care. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 99, n. 3, p. 1414-1426, 2010.

KANOUIA, J.; KUSHWAHA, P. S.; SARAF, S. A. Evaluation of gatifloxacin pluronic micelles and development of its formulation for ocular delivery. **Drug delivery and translational research**, v. 4, n. 4, p. 334-343, 2014.

KATIYAR, S.; PANDIT, J.; MONDAL, R. S.; MISHRA, A. K.; CHUTTANI, K.; AQIL, M.; ALI, A.; SULTANA, Y. *In situ* gelling dorzolamide loaded chitosan nanoparticles for the treatment of glaucoma. **Carbohydrate polymers**, v. 102, p. 117-124, 2014.

MAHBOOBAN, M. M.; SEYFODDIN, A.; ABOOFAZELI, R.; FOROUTAN, S. M.; RUPENTHAL, I. D. Brinzolamide-loaded nanoemulsions: ex vivo transcorneal permeation, cell viability and ocular irritation tests. **Pharmaceutical development and technology**, v. 24, n. 5, p. 600-606, 2019.

MCKENZIE, B.; Kay, G.; MATTHEWS, K. H.; KNOTT, R. M.; CAIRNS, D. The hen's egg chorioallantoic membrane (HET-CAM) test to predict the ocular irritation potential of a cysteamine-containing gel: Quantification using Photoshop® and ImageJ. **International journal of pharmaceuticals**, v. 490, n. 1-2, p. 1-8, 2015.

NATIONAL INSTITUTE OF ENVIRONMENTAL HEALTH SCIENCES (ICCVAM). ICCVAM-Recommended Test Method Protocol, "Hen's egg test—chorioallantoic membrane (HET-CAM) test method," **Tech. Rep.** 10-7553, NIH, 2010.

OLIVEIRA, A. G. L. D.; SILVA, R. S.; ALVES, E. N.; PRESGRAVE, R. D. F.; PRESGRAVE, O. A. F.; DELGADO, I. F. Ensaios da membrana cório-alantóide (HET-CAM e CAM-TBS): alternativas para a avaliação toxicológica de produtos com baixo



potencial de irritação ocular. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 71, n. 1, p. 153-159, 2012.

SCHEEL, J.; KLEBER, M.; KREUTZ, J.; LEHRINGER, E.; MEHLING, A.; REISINGER, K.; STEILING, W. Eye irritation potential: Usefulness of the HET-CAM under the Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (GHS). **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 59, n. 3, p. 471-492, 2011.

WILSON, S.L.; AHEARNE, M.; HOPKINSON, A. An overview of current techniques for ocular toxicity testing. **Toxicology**. v. 327, n. 1, p. 32-46, 2015.

Received: 28 September 2020

Accepted: 14 October 2020

Published: 02 April 2021