RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta **Tese** será disponibilizado somente a partir de 17/08/2023.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara

Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho"

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus de Araraquara
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Abordagem integrada de metodologias *in vitro* e *in silico* para avaliação da segurança de conservantes antimicrobianos utilizados em cosméticos

Gabriela de Oliveira Prado Corrêa

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lucia Borges Isaac

Araraquara
2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara

Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho"

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Abordagem integrada de metodologias *in vitro* e *in silico* para avaliação da segurança de conservantes antimicrobianos utilizados em cosméticos

Gabriela de Oliveira Prado Corrêa

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, para obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lucia Borges Isaac

Araraquara
2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara

Corrêa, Gabriela de Oliveira Prado.

C824a Abordagem integrada de metodologias *in vitro* e *in silico* para avaliação da segurança de conservantes antimicrobianos utilizados em cosméticos / Gabriela de Oliveira Prado Corrêa. – Araraquara: [S.n.], 2021.

139 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Vera Lucia Borges Isaac.

1. Cosméticos. 2. Conservantes antimicrobianos. 3. *In vitro*. 4. *In silico*. 5. Avaliação de segurança. I. Isaac, Vera Lucia Borges, orient. II. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030078P6
Esta ficha não pode ser modificada

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Abordagem integrada de metodologias in vitro e in silico para avaliação da segurança de conservantes antimicrobianos utilizados em cosméticos

AUTORA: GABRIELA DE OLIVEIRA PRADO CORRÊA
ORIENTADORA: VERA LUCIA BORGES ISAAC

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área: Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. VERA LUCIA BORGES ISAAC (Participaçao Virtual)
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Profa. Dra. MARIA JOSÉ VIEIRA FONSECA (Participaçao Virtual)
Departamento de Ciências Farmacêuticas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP

Profa. Dra. CRISTINA MARIA FRANZINI (Participaçao Virtual)
Departamento de Farmácia / Fundação Hermínio Ometto – FHO/UNIARARAS

Profa. Dra. CARLA APARECIDA PEDRIALI MORAES (Participaçao Virtual)
FATEC Diadema "Luigi Papaiz"

Profa. Dra. REGINA MARIA BARRETTO CICARELLI (Participaçao Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Araraquara, 17 de agosto de 2021

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a todos os animais de laboratório que morreram em nome da ciência: vocês nunca serão esquecidos! Somente, graças aos testes em animais, a ciência evoluiu e, hoje, enfim, vislumbramos um futuro totalmente sem testes em animais, muito próximo.

#foreveragainstanimaltesting

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por me dar forças e proporcionar a realização de mais esse sonho;

À minha família pela paciência, auxílio e compreensão, em especial ao meu marido **Murilo Corrêa**, que sempre esteve ao meu lado me apoiando nos momentos felizes e tristes;

À minha orientadora Profª Drª **Vera Lucia Borges Isaac** pela amizade, companheirismo, paciência, incentivo e a todos os ensinamentos acadêmicos e de vida;

Ao **Grupo Boticário**, em especial à **Andrezza Di Pietro Micali Canavez,** por toda paciência, ensinamentos e amizade;

À técnica de laboratório **Ilza Yogui**, pela ajuda e colaboração;

À Professora Titular Drª **Regina Maria Barretto Cicarelli,** por ceder seu laboratório para a realização dos ensaios envolvendo cultura celular;

Aos **alunos** da Profa. Vera e do Prof. Marcos, que se tornaram grandes amigos durante essa jornada;

À **Faculdade de Ciências Farmacêuticas** – UNESP e ao **Programa de Pós-graduação**;

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** (CAPES) pela bolsa de estudos concedida;

À plataforma **PReMASUL**, do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações, por oferecer treinamentos para os métodos alternativos ao uso de animais, dos quais tive o prazer de participar de dois;

Às empresas **Chemyunion, Clariant, Biovital, QuantiQ e Grupo Boticário,** que doaram as amostras de conservantes para a realização desse trabalho;

Um agradecimento geral a todos que me ajudaram, pois foram muitas pessoas, praticamente nada do que está aqui eu fiz sozinha, tive a sorte de encontrar pessoas incríveis que me ajudaram muito! Obrigada, o mérito desse trabalho também é de vocês.

EPÍGRAFE

"Não deseje que as coisas sejam mais fáceis; deseje que você seja melhor!"

Jim Rohn

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA V

AGRADECIMENTOS VI

EPÍGRAFE VIII

RESUMO XII

ABSTRACT XIV

LISTA DE FIGURAS XVI

LISTA DE TABELAS XVII

LISTA DE QUADROS XVIII

LISTA DE EQUAÇÕES XIX

LISTA DE ABREVIATURAS XX

1. INTRODUÇÃO 24

1.1. Revisão da literatura ..... **Erro! Indicador não definido.**

1.1.1. Cenário atual do mercado cosmético**Erro! Indicador não definido.**

1.1.2. Definição e classificação de produtos cosméticos**Erro! Indicador não definido.**

1.1.3. Segurança microbiológica de produtos cosméticos**Erro! Indicador não definido.**

1.1.4. Legislações vigentes para conservantes**Erro! Indicador não definido.**

1.1.5. Propilparabeno e Metilparabeno ..... **Erro! Indicador não definido.**

1.1.6. Fenoxietanol ..... **Erro! Indicador não definido.**

1.1.7. Metilcloroisotiazolinona e metilisotiazolinona**Erro! Indicador não definido.**

1.1.8. DMDM hidantoína e imidazolidinil ureia**Erro! Indicador não definido.**

1.1.9. Dehidroacetato de sódio ..... **Erro! Indicador não definido.**

1.1.10. Álcool benzílico ..... **Erro! Indicador não definido.**

1.1.11. Cloreto de benzalcônio ..... **Erro! Indicador não definido.**

1.1.12. Caprilil glicol..... **Erro! Indicador não definido.**

1.1.13. Benzoato de sódio ..... **Erro! Indicador não definido.**

1.1.14. Etilhexilglicerina ..... **Erro! Indicador não definido.**

1.1.15. Avaliação de segurança de matérias primas cosméticas .....**Erro! Indicador não definido.**

1.1.16. Métodos alternativos ao uso de animais**Erro! Indicador não definido.**

1.1.17. Metodologias *in vitro* ..... **Erro! Indicador não definido.**

1.1.18. Metodologias *in silico*..... **Erro! Indicador não definido.**

2. OBJETIVOS .....**ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

2.1. Objetivo geral ..... **Erro! Indicador não definido.**

2.2. Objetivos específicos ..... **Erro! Indicador não definido.**

3. MATERIAL E MÉTODOS .....**ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

3.1. Material ..... **Erro! Indicador não definido.**

3.1.1. Amostras ..... **Erro! Indicador não definido.**

3.1.2. Material para rotina celular ..... **Erro! Indicador não definido.**

3.1.3. Reagentes ..... **Erro! Indicador não definido.**

3.1.4. Equipamentos..... **Erro! Indicador não definido.**

3.2. Métodos ..... **Erro! Indicador não definido.**

3.2.1. Avaliação *in vitro*..... **Erro! Indicador não definido.**

3.2.1.1. Ensaio de exclusão do corante azul de tripano**Erro! Indicador não definido.**

3.2.1.2. Avaliação da citotoxicidade por meio das metodologias que utilizam os corantes vitais MTT e NR.... **Erro! Indicador não definido.**

3.2.1.3. Avaliação de dano ocular (Short Time Exposure – STE) ..**Erro! Indicador não definido.**

3.2.2. Avaliação *in silico* ..... **Erro! Indicador não definido.**

3.2.3. Avaliação do perigo ..... **Erro! Indicador não definido.**

3.2.4. Avaliação da exposição e caracterização do risco**Erro! Indicador não definido.**

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....**ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

4.1. Avaliação *in vitro* ..... **Erro! Indicador não definido.**

4.1.1. Avaliação da citotoxicidade por meio das metodologias que utilizam os corantes vitais MTT e NR. ..... **Erro! Indicador não definido.**

4.1.2. Avaliação de dano ocular (*Short Time Exposure* – STE).....**Erro! Indicador não definido.**

4.2. Avaliação *in silico*..... **Erro! Indicador não definido.**

4.3. Avaliação do perigo..... **Erro! Indicador não definido.**

4.4. Avaliação da exposição e caracterização do risco**Erro! Indicador não definido.**

5. CONCLUSÃO..... 26

6. REFERÊNCIAS..... 27

RESUMO

Os cosméticos, assim como outros produtos que contêm água e compostos orgânicos/inorgânicos, exigem proteção contra a contaminação microbiológica, sendo de grande importância o uso de conservantes antimicrobianos, para prolongar a vida útil dos produtos e garantir a segurança do consumidor. A avaliação de segurança dos cosméticos é, geralmente, determinada a partir do conhecimento da toxicidade dos ingredientes e da compatibilidade dos produtos com a pele. A combinação de métodos *in vitro* e *in silico*, além de aplicável à área cosmética, vem ganhando maior espaço na avaliação de parâmetros toxicológicos. Deste modo, o objetivo desse trabalho foi avaliar a segurança dos conservantes propilparabeno (PP), metilparabeno (MP), fenoxietanol (FE), mistura de metilcloroisotiazolinona e metilisotiazolinona (CMI/MI), DMDM hidantoína (DMDMH), imidazolidinil ureia (IMU), dehidroacetato de sódio (SD), álcool benzílico (BA), cloreto de benzalcônio (BAC), caprilil glicol (CG), benzoato de sódio (SB) e etilhexilglicerina (EEG) por meio de uma abordagem integrada de métodos *in vitro* e *in silico*. Foram realizados testes *in vitro* de citotoxidade e avaliação do potencial de irritação ocular, análise *in silico* dos desfechos de sensibilização da pele, fototoxicidade, toxicidade oral aguda, carcinogenicidade, mutagenicidade, genotoxicidade e atividade endócrina. Os resultados obtidos foram *plotados* em uma matriz toxicológica para a avaliação do perigo, na qual os conservantes foram classificados em níveis de toxicidade definidos como baixo (B) e alto (A). Na avaliação da exposição, foi estabelecida a concentração máxima segura e a caracterização do risco, que permitiram a integração dos dados e uma conclusão de segurança. Considerando a abordagem de avaliação do perigo, os desfechos mais preocupantes, nos quais grande parte dos conservantes receberam classificação de nível alto de toxicidade, foram a irritação da pele (PP, MP, FE, CMI, MI, DMDMH, IMU, BAC, CG e EEG), sensibilização da pele (MP, FE, CMI, MI, DMDMH, IMU, SD e BA) e toxicidade oral aguda (FE, CMI, MI, DMDMH, SD, BA e BAC). Na avaliação da exposição, apenas dois conservantes (SB e EEG) ficaram com a margem de segurança (MoS) abaixo

de 100; contudo, reduzindo a concentração utilizada foi possível chegar em uma concentração segura. Considerando os ensaios realizados, é necessária uma abordagem holística que englobe os resultados obtidos *in vitro* e *in silico*, pois dados isolados não configuram uma avaliação de segurança. Apesar dos desafios na utilização de métodos *in silico*, a abordagem integrada de testes proposta permitiu a robustez na avaliação da segurança. Os conservantes antimicrobianos estão presentes em praticamente todos os produtos; portanto, as substâncias que tenham potencial para causar qualquer efeito adverso, devem ser incorporadas, nos cosméticos, em condições consideradas seguras, para garantir a integridade da saúde humana.

Palavras-chave: cosméticos, conservantes antimicrobianos, *in vitro*, *in silico*, avaliação de segurança.

ABSTRACT

Cosmetics, like other products containing water and organic/inorganic compounds, require protection against microbiological contamination. It is important to use antimicrobial preservatives to prolong the shelf life of products and ensure consumer safety. The safety assessment of cosmetics is generally determined from knowledge of the toxicity of the ingredients and the compatibility of the products with the skin. The combination of *in vitro* and *in silico* methods, in addition to being applicable to cosmetic purposes, has been gaining more space in the assessment of toxicological parameters. Thus, the aim of this work was to evaluate the safety of preservatives: propylparaben (PP), methylparaben (MP), phenoxyethanol (FE), mixture of methylisothiazolinone and methylchloroisothiazolinone (CMI/MI), DMDM hydantoin (DMDMH), imidazolidinyl urea (IMU), sodium dehydroacetate (SD), benzyl alcohol (BA), benzalkonium chloride (BAC), caprylyl glycol (CG), sodium benzoate (SB) and ethylhexylglycerine (EEG) through an integrated approach of *in vitro* and *in silico* methods. In vitro cytotoxicity tests, evaluation of eye irritation potential and in silico analysis of skin sensitization, phototoxicity, acute oral toxicity, carcinogenicity, mutagenicity, genotoxicity, and endocrine activity endpoints were performed. The results obtained were plotted in toxicological matrices for hazard assessment, where preservatives were classified into toxicity levels defined as low (B) and high (A), exposure assessment, where the maximum safe concentration was established and risk characterization, which allowed for data integration and a safety conclusion. Considering the hazard assessment approach, the endpoints in which most preservatives were rated as high toxicity level were skin irritation (PP, MP, FE, CMI, MI, DMDMH, IMU, BAC, CG and EEG), skin sensitization (MP, FE, CMI, MI, DMDMH, IMU, SD and BA), and acute oral toxicity (FE, CMI, MI, DMDMH, SD, BA and BAC). In the exposure assessment, only two preservatives (SB and EEG) had a safety of margin (MoS) below 100, however, by reducing the concentration used, it was possible to reach a safe concentration. Considering the tests performed, a holistic approach that encompasses the results obtained *in vitro* and *in silico* is

necessary, as isolated data do not constitute a safety assessment. Despite the challenges in using *in silico* methods, the proposed integrated testing approach allowed for robustness in the safety assessment. Antimicrobial preservatives are present in virtually all products; therefore, substances that have the potential to cause any adverse effect must be incorporated into cosmetics under conditions considered safe to ensure the integrity of human health.

Keywords: cosmetics, antimicrobial preservatives, *in vitro*, *in silico*, safety assessment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da extrapolação do animal para o homem para o cálculo da margem de segurança **Erro! Indicador não definido.**

Figura 2. Cronograma de mudanças no Regulamento Europeu referentes aos testes em animais (Regulamento CE N. 1223/2009)**Erro! Indicador não definido.**

Figura 3. Desenho experimental para o ensaio de citotoxicidade MTT/NR.**Erro! Indicador não definido.**

Figura 4. Desenho experimental para o ensaio de dano ocular STE .....**Erro! Indicador não definido.**

Figura 5. Curvas de viabilidade celular (Metodologia com o corante MTT).**Erro! Indicador não definido.**

Figura 6. Curvas de viabilidade celular (Metodologia com o corante NR) ...**Erro! Indicador não definido.**

Figura 7. Placa de 96 poços utilizada na avaliação da citotoxicidade por meio da metodologia com o corante MTT..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 8. Placa de 96 poços utilizada na avaliação da citotoxicidade dos conservantes por meio da metodologia com o corante NR**Erro! Indicador não definido.**

Figura 9. Células HaCaT e HDFa..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 10. Célula HepG2..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 11. Célula SIRC..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 12. *Layout* do *software* VEGA HUB..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 13. *Layout* do *software* OECD QSAR *toolbox***Erro! Indicador não definido.**

Figura 14. Exemplo de análise realizada no PRED-SKIN**Erro! Indicador não definido.**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Conservantes e concentrações utilizadas nos ensaios.....**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 2. Parâmetros de avaliação do perigo..... **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 3. Valores percentuais de IC_{50} (m/v) obtidos nos ensaios de citotoxicidade por meio da metodologia com o corante MTT**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 4. Valores percentuais de IC_{50} (m/v) obtidos nos ensaios de citotoxicidade por meio da metodologia com o corante NR**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 5. Valores percentuais de IC_{30} (m/v) obtidos nos ensaios de citotoxicidade por meio da metodologia com o corante MTT**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 6. Valores percentuais de IC_{30} % (m/v) obtidos nos ensaios de citotoxicidade por meio da metodologia com o corante NR**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 7. Classificação dos conservantes pela metodologia STE.....**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 8. Resultados das predições *in silico* para os desfechos de irritação da pele, sensibilização da pele e fototoxicidade..... **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 9. Resultados das predições *in silico* para o desfecho de irritação ocular ..... **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 10. Resultados das predições *in silico* para o desfecho de toxicidade oral aguda ..... **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 11. Resultados das predições *in silico* para o desfecho de atividade endócrina..... **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 12. Resultados das predições *in silico* para os desfechos de carcinogenicidade, mutagenicidade e genotoxicidade**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 13. Avaliação de perigo..... **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 14. Avaliação da exposição ..... **Erro! Indicador não definido.**

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Lista de conservantes antimicrobianos utilizados**Erro! Indicador não definido.**

Quadro 2. Informações químicas do propilparabeno e metilparabeno .....**Erro! Indicador não definido.**

Quadro 3. Informações químicas do fenoxietanol**Erro! Indicador não definido.**

Quadro 4. Informações químicas de metilcloroisotiazolinona e metilisotiazolinona ..... **Erro! Indicador não definido.**

Quadro 5. Informações químicas de DMDM hidantoína e imidazolidinil ureia ..... **Erro! Indicador não definido.**

Quadro 6. Informações químicas do dehidroacetato de sódio**Erro! Indicador não definido.**

Quadro 7. Informações químicas do álcool benzílico**Erro! Indicador não definido.**

Quadro 8. Informações químicas do cloreto de benzalcônio**Erro! Indicador não definido.**

Quadro 9. Informações químicas do caprilil glicol**Erro! Indicador não definido.**

Quadro 10. Informações químicas do benzoato de sódio**Erro! Indicador não definido.**

Quadro 11. Informações químicas da etilhexilglicerina**Erro! Indicador não definido.**

Quadro 12. Métodos alternativos aceitos pelo CONCEA (RN nº 18 e 31)...**Erro! Indicador não definido.**

Quadro 13. Classificação das substâncias-teste pela metodologia STE.....**Erro! Indicador não definido.**

Quadro 14. Notação química SMILES..... **Erro! Indicador não definido.**

Quadro 15. *Softwares* e modelos preditivos utilizados nas análises *in silico* ..... **Erro! Indicador não definido.**

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Cálculo de viabilidade celular com corante azul de tripano .....**Erro! Indicador não definido.**

Equação 2. Cálculo da porcentagem de células mortas para os ensaios MTT/NRU ..... **Erro! Indicador não definido.**

Equação 3. Cálculo da porcentagem de células vivas para os ensaios MTT/NRU ..... **Erro! Indicador não definido.**

Equação 4. Cálculo da viabilidade celular (%) para o ensaio STE .....**Erro! Indicador não definido.**

Equação 5. Cálculo da SED para avaliação da exposição sistêmica .....**Erro! Indicador não definido.**

Equação 6. Cálculo da MoS para avaliação da exposição sistêmica .....**Erro! Indicador não definido.**

LISTA DE ABREVIATURAS

A: Alto

ABDI: Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial

ABIHPEC: Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos

ACFB: Academia de Ciências Farmacêuticas do Brasil

ADI: *Applicability Domain Index* - Índice do domínio de aplicabilidade

ANF: Academia Nacional de Farmácia

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOP: *Adverse Outcome Pathway* – Via de desfecho adverso

B: Baixo

BA: Álcool benzílico

BAC: Cloreto de benzalcônio

BCOP: *Bovine corneal opacity and permeability*

BraCVAM: Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos

CAGR: Taxa de crescimento anual composta

CAS: *Chemical Abstracts Service*

CE: Comissão Europeia

CG: Caprilil glicol

CI: *Confidence Interval* - Intervalo de confiança

CIR: *Cosmetic Ingredient Review*

CMI: Metilcloroisotiazolinona

CN: Controle negativo

CO_2: Dióxido de carbono

CONCEA: Conselho Nacional de Experimentação Animal

COVID-19: *Coronavirus Disease* – 2019

CP: Controle positivo

DA: Domínio de aplicabilidade

DCA: Dermatite de contato alérgica

DCI: Dermatite de contato irritativa

DHA: Ácido dehidroacético

DMDMH: DMDM hidantoína

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO: Dimetilsulfóxido

DP: Desvio padrão

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DPRA: *Direct Peptide Reactivity Assay*

EEG: Etilhexilglicerina

EHS: *Environment, Health and Safety*

FD: Fora do domínio

FE: Fenoxietanol

FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz

GHS: *Globally Harmonised System of Classification, Labelling and Packaging of Chemicals*

HaCaT: *Human Immortalized Keratinocytes*

h-CLAT: *Human Cell Line Activation Test*

HDFa: *Human Dermal Fibroblasts, Adult*

HepG2: *Liver Hepatocellular Carcinoma*

HET-CAM: *Hen's Egg-chorioallantoic Membrane*

HPPC: Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos

IARC: *International Agency for Research on Cancer*

IATA: *Integrated Approaches to Testing and Assessment*

IC_{30}: Concentração que inibe 30% da viabilidade celular

IC_{50}: Concentração que inibe 50% da viabilidade celular

ICE: *Isolated Chicken Eye*

IMU: Imidazolidinil ureia

INCI name: *International Nomenclature of Cosmetic Ingredient*

INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

LC: *Lethal concentration* – Concentração letal

LD: *Lethal dose* – Dose letal

LLNA: *Local Lymph Node Assays*

LSS: Lauril sulfato de sódio

MCTIC: Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações

MDCK: *Madin-Darby Canine Kidney*

MEM: *Minimum Essential Media*

MI: Metilisotiazolinona

MIE: *Molecular Initiating Event*

MN: Micronúcleos

MNvit: Teste do micronúcleo *in vitro*

MoA: *Mode of Action* – Modo de ação

MoS; *Margin of Safety* – Margem de segurança

MP: Metilparabeno

MTT: Brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio

NOAEL: *No Observed Adverse Effect Level* - Nenhum nível de efeito adverso observado

NRU: *Neutral Red Uptake*

OD: Densidade óptica

OECD: *Organisation for Economic Co-operation and Development*

ONU: Organização das Nações Unidas

PBPK: *Physiologically-based PharmacoKinetics*

PBS: *Phosphate buffered saline*

PBTK: *Physiologically based ToxicoKinetics*

pH: Potencial hidrogeniônico

PP: Propilparabeno

PL: Projeto de lei

PLC: Projeto de lei da Câmara

QSAR: *Quantitative-Structure-Activity-Relationship*

RDC: Resolução da Diretoria Colegiada

RENAMA: Rede Nacional de Métodos Alternativos

RhCE: *Reconstructed human cornea-like epithelium*

RhE: *Reconstructed human epidermis*

RN: Resolução normativa

RNA: Ácido ribonucleico

SB: Benzoato de sódio

SCCS: *Scientific Committee on Consumer Safety*

SD: Dehidroacetato de sódio

SED: *Systemic Exposure Dose* – Dose de exposição sistêmica

SF: Soro fisiológico

SFB: Soro fetal bovino

SIRC: *Statens Seruminstitut Rabbit Cornea*

SMILES: *Simplified Molecular Input Line Entry System*

STE: *Short Time Exposure*

TER: Resistência elétrica transcutânea

TG: *Test Guideline*

UE: União Europeia

UN GHS Cat. 1: Categoria 1

UN GHS Cat. 2A: Categoria 2A

UN GHS Cat. 2B: Categoria 2B

UN GHS Não Cat.: Não categoria

USEPA: *United States Environmental Protection Agency*

WoE: *Weight of Evidence* – Peso de evidência

1. INTRODUÇÃO

O mercado global de cosméticos tem sofrido desde o início da pandemia do coronavírus (COVID-19). Com o *lockdown*, muitas lojas fecharam, para nunca mais reabrir; contudo, a indústria cosmética tem se mostrado resiliente, com crescimento constante nos últimos anos. O Brasil possui grande representatividade nesse mercado, ocupando uma das primeiras posições no *ranking* mundial de consumo de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos.

Os cosméticos, assim como outros produtos que contêm água e compostos orgânicos/inorgânicos, exigem proteção contra a contaminação microbiológica, sendo de grande importância o uso de conservantes antimicrobianos, para prolongar a vida útil dos produtos e garantir a segurança do consumidor. O uso inadequado de conservantes pode levar à deterioração do produto; por outro lado, o uso excessivo pode aumentar o risco de reações adversas, como a dermatite de contato, além de, possivelmente, contribuir para o aumento da resistência a agentes antimicrobianos.

A proibição dos testes em animais na União Europeia, para fins cosméticos, representou um avanço importante para o fim de uma era de testes em animais, em todo o mundo. O banimento cobriu todos os desfechos toxicológicos, independentemente de um conjunto completo de metodologias alternativas estar disponível para substituir os testes em animais correspondentes, trazendo desafios para os pesquisadores e avaliadores de segurança.

Neste contexto, novas metodologias para avaliação de segurança de ingredientes cosméticos vêm sendo desenvolvidos e aprimorados nos últimos anos. Metodologias *in chemico*, *in vitro* e *in silico* são utilizados em uma estratégia integrada de teste, com o objetivo de cobrir o maior número de desfechos toxicológicos, buscando garantir a segurança dos consumidores.

Atualmente, há muita discussão sobre quais conservantes devem ou não ser utilizados e não existe um consenso. Conservantes tradicionais como os parabenos foram substituídos por outros ingredientes como fenoxietanol e as izotiazolinonas, as quais foram responsáveis por inúmeros casos de dermatite

de contato alérgica. Hoje, vemos esses mesmos conservantes também sendo substituídos por outras matérias-primas, como um ciclo sem fim. Nada parece bom o suficiente para o *marketing*, que só tem aumentado a lista de ingredientes para serem incluídos nas alegações de rótulo "*free-of*" ou "*free-from*". Deste modo, foi proposta uma avaliação de segurança integrada, por meio de metodologias *in vitro* e *in silico*, a fim de garantir o uso seguro desses ingredientes, em produtos cosméticos.

5. CONCLUSÃO

Considerando os ensaios realizados, é necessária uma abordagem holística que englobe todos os resultados obtidos *in vitro* e *in silico*, pois dados isolados não configuram uma avaliação de segurança.

A visão global do cenário foi possível na avaliação do perigo, na qual os desfechos foram categorizados de acordo com o nível de toxicidade.

Na avaliação da exposição, na qual foi estabelecida a concentração máxima segura e a na caracterização do risco, que permitiu a integração dos dados e uma conclusão de segurança.

Apesar dos desafios na utilização de métodos in silico, a abordagem integrada de testes proposta, permitiu a robustez na avaliação da segurança dos conservantes contemplados neste trabalho.

A interpretabilidade e mecanística envolvida no uso de ferramentas in silico permite corroborar para uma estratégia útil na avaliação de ingredientes cosméticos, desde que os resultados sejam adequados, relevantes e confiáveis.

Os conservantes antimicrobianos estão presentes em praticamente todos os produtos; portanto, as substâncias que tenham potencial para causar qualquer efeito adverso, devem ser incorporadas nos cosméticos em condições consideradas seguras para garantir a integridade da saúde humana.

6. REFERÊNCIAS

ABIHPEC. **Panorama do Setor – Atualização abril 2021**. Disponível em: <https://abihpec.org.br/publicacao/panorama-do-setor/>. Acesso em: 15 jun. 2021.

ADRIAENS, E. et al. CON4EI: Short Time Exposure (STE) test method for hazard identification and labelling of eye irritating chemicals. **Toxicology in Vitro**, CON4EI: Consortium for *in vitro* Eye Irritation testing strategy. v. 49, p. 65–76, 2018.

AERTS, O.; VERHULST, L.; GOOSSENS, A. Ethylhexylglycerin: a low-risk, but highly relevant, sensitizer in 'hypo-allergenic' cosmetics. **Contact Dermatitis**, v. 74, n. 5, p. 281–288, 2016.

ÅGERSTRAND, M.; BERONIUS, A. Weight of evidence evaluation and systematic review in EU chemical risk assessment: Foundation is laid but guidance is needed. **Environment International**, v. 92–93, p. 590–596, 2016.

AHUJA, K.; SINGH, S. **Cosmetic Preservatives Market Size & Share | Statistics - 2026**. Disponível em: <https://www.gminsights.com/industry-analysis/cosmetics-preservative-market>. Acesso em: 10 mar. 2021.

ALÉPÉE, N. et al. Development of a defined approach for eye irritation or serious eye damage for liquids, neat and in dilution, based on cosmetics Europe analysis of *in vitro* STE and BCOP test methods. **Toxicology in Vitro**, v. 57, p. 154–163, 2019.

ALMEIDA, A.; SARMENTO, B.; RODRIGUES, F. Insights on *in vitro* models for safety and toxicity assessment of cosmetic ingredients. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 519, n. 1, p. 178–185, 2017.

ALMG. **Passa a valer lei que proíbe testes em animais**. Disponível em: <https://www.almg.gov.br/acompanhe/noticias/arquivos/2018/07/26_promulacao_testes_animais.html>. Acesso em: 3 abr. 2020.

ALVES, V. M. et al. A Perspective and a New Integrated Computational Strategy for Skin Sensitization Assessment. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 6, n. 3, p. 2845–2859, 2018.

ANDERSEN, F. A. Annual Review of Cosmetic Ingredient Safety Assessments: 2007-2010. **International Journal of Toxicology**, v. 30, n. 5_suppl, p. 73S-127S, 2011.

ANKLEY, G. T. et al. Adverse outcome pathways: A conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 29, n. 3, p. 730–741, 2010.

ANSELMI, C. et al. *In vitro* induction of apoptosis vs. necrosis by widely used preservatives: 2-phenoxyethanol, a mixture of isothiazolinones, imidazolidinyl urea and 1,2-pentanediol. **Biochemical Pharmacology**, v. 63, n. 3, p. 437–453, 2002.

ANSM (French National Agency for Medicines and Health Products Safety). **Evaluation du risque lié à l'utilisation du phénoxyéthanol dans les produits cosmétiques**. Disponível em: <https://ansm.sante.fr/S-informer/Points-d-information-Points-d-information/Concentration-de-phenoxyethanol-dans-les-produits-cosmetiques-Point-d-information>. Acesso em: 12 mar. 2020.

ANSM (French National Agency for Medicines and Health Products Safety). **Les produits cosmétiques non rincés contenant du phénoxyéthanol ne doivent pas être utilisés sur les fesses des enfants de 3 ans ou moins**. Disponível em: <https://ansm.sante.fr/S-informer/Points-d-information-Points-d-information/Les-produits-cosmetiques-non-rinces-contenant-du-phenoxyethanol-ne-doivent-pas-etre-utilises-sur-les-fesses-des-enfants-de-3-ans-ou-moins-Point-d-Information>. Acesso em: 12 mar. 2020.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **RDC Nº 07/2015.** Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) Nº 07, de 10 de fevereiro de 2015 -

Dispõe sobre os requisitos técnicos para a regularização de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes e dá outras providências, 2015a.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **RDC Nº 35/2015.** Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) Nº 35, de 7 de agosto de 2015 - Dispõe sobre a aceitação dos métodos alternativos de experimentação animal reconhecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA, 2015b.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **RDC Nº 528/2021.** Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) Nº 528, de 4 de agosto de 2021 - Dispõe sobre a lista de substâncias de ação conservante permitidas para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes e internaliza a Resolução GMC MERCOSUL Nº 35/20, 2021.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos**. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2ª ed., 2012.

BAUMANN, H.; RICHARDS, C.; GAULDIE, J. Interaction among hepatocyte-stimulating factors, interleukin 1, and glucocorticoids for regulation of acute phase plasma proteins in human hepatoma (HepG2) cells. **Journal of Immunology**, v. 139, n. 12, p. 4122–4128, 1987.

BENFENATI, E. et al. Integrating *in silico* models and read-across methods for predicting toxicity of chemicals: A step-wise strategy. **Environment International**, v. 131, p. 1–15,. 2019.

BERGGREN, E. et al. Chemical Safety Assessment Using Read-Across: Assessing the Use of Novel Testing Methods to Strengthen the Evidence Base for Decision Making. **Environmental Health Perspectives**, v. 123, n. 12, p. 1232–1240, 2015.

BERKE, P. A.; ROSEN, W. E. Germall a new family of antimicrobial preservatives for cosmetics. **Am Perfum Cosmet**, v. 85, n. 3, p. 55–59, 1970.

BERTHET, A. et al. *Ex vivo* human skin permeation of methylchloroisothiazolinone (MCI) and methylisothiazolinone (MI). **Archives of Toxicology**, v. 91, n. 11, p. 3529–3542, 2017.

BINDU, N. Final report on the safety assessment of Benzyl Alcohol, Benzoic Acid, and Sodium Benzoate. **International Journal of Toxicology**, v. 20, n. 3, p. 23–50, 2001.

BRAGA, R. C. et al. Pred-Skin: A Fast and Reliable Web Application to Assess Skin Sensitization Effect of Chemicals. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 57, n. 5, p. 1013–1017, 2017.

BURDEN, N. et al. Adverse Outcome Pathways can drive non-animal approaches for safety assessment. **Journal of Applied Toxicology**, v. 35, n. 9, p. 971–975, 2015.

CANAVEZ, A. D. P. M. et al. Integrated approaches to testing and assessment as a tool for the hazard assessment and risk characterization of cosmetic preservatives. **Journal of Applied Toxicology**, 2021.

CARVALHO, C. M. DE et al. *In vitro* induction of apoptosis, necrosis and genotoxicity by cosmetic preservatives: application of flow cytometry as a complementary analysis by NRU. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 34, n. 2, p. 176–182, 2012.

CHARTRES, N.; BERO, L. A.; NORRIS, S. L. A review of methods used for hazard identification and risk assessment of environmental hazards. **Environment International**, v. 123, p. 231–239, 2019.

CHEN, X. et al. Toxicity of cosmetic preservatives on human ocular surface and adnexal cells. **Experimental Eye Research**, v. 170, p. 188–197, 2018.

CHEN, X. et al. Sodium dehydroacetate induces coagulation dysfunction by inhibiting liver vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 in Wistar rats. **Research in Veterinary Science**, v. 124, p. 399–405, 2019.

CHERKASOV, A. et al. QSAR Modeling: Where Have You Been? Where Are You Going To? **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, n. 12, p. 4977–5010, 2014.

CHIARI, B. G. et al. Estudo da segurança de cosméticos: presente e futuro. **Estudo da segurança de cosméticos: presente e futuro**, v. 33, n. 3, 2012.

CHOI, S. M. et al. Risk assessment of benzalkonium chloride in cosmetic products. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, v. 21, n. 1, p. 8–23, 2018.

CIR (Cosmetic Ingredient Review). Final Report on the Safety Assessment of Sodium Dehydroacetate and Dehydroacetic Acid. **Journal of the American College of Toxicology**, v. 4, n. 3, p. 123–159, 1985.

CIR (Cosmetic Ingredient Review). Final Report on the Safety Assessment of DMDM Hydantoin. **Journal of the American College of Toxicology**, v. 7, n. 3, p. 245–277, 1988.

CIR (Cosmetic Ingredient Review). Final Report on the Safety Assessment of Benzalkonium Chloride. **Journal of the American College of Toxicology**, v. 8, n. 4, p. 589–625, 1989.

CIR (Cosmetic Ingredient Review). Final Report on the Safety Assessment of Methylisothiazolinone and Methylchloroisothiazolinone. **Journal of the American College of Toxicology**, v. 11, n. 1, p. 75–128, 1992.

CIR (Cosmetic Ingredient Review). Final amended report on the safety assessment of Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Isopropylparaben, Butylparaben, Isobutylparaben, and Benzylparaben as used in cosmetic products. **International Journal of Toxicology**, v. 27 Suppl 4, p. 1–82, 2008a.

CIR (Cosmetic Ingredient Review). Annual Review of Cosmetic Ingredient Safety Assessments: 2005/2006. **International Journal of Toxicology**, v. 27, n. 1, p. 77–142, 2008b.

CIR (Cosmetic Ingredient Review). Annual Review of Cosmetic Ingredient Safety Assessments: 2005/2006. **International Journal of Toxicology**, v. 27, n. Suppl. 1, p. 77–142, 2008c.

CIR (Cosmetic Ingredient Review). **Safety Assessment of Parabens as Used in Cosmetics**, 2018.

CIR (Cosmetic Ingredient Review). **Safety Assessment of Imidazolidinyl Urea as Used in Cosmetics**, 2019

CONCEA (Conselho Nacional de Experimentação Animal). **Resolução Normativa (RN) Nº 17: Dispões sobre o reconhecimento de métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil e dá outras providências**. Brasília, DF, 2014a.

CONCEA (Conselho Nacional de Experimentação Animal). **Resolução Normativa (RN) Nº 18: Reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil, nos termos da Resolução Normativa nº 17, de 03 de julho de 2014, e dá outras providências**, Brasília, DF, 2014b.

CONCEA (Conselho Nacional de Experimentação Animal). **Resolução Normativa (RN) Nº 31: Reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil**, Brasília, DF, 2016.

CONSTANTINO, H. **Rio de Janeiro se torna o primeiro estado nas Américas a promulgar uma proibição completa dos testes em animais para cosméticos**. Disponível em: <https://www.hsi.org/news-media/rio-de-janeiro-proibe-testes-em-animais-para-cosmeticos-121317/?lang=pt-br>. Acesso em: 3 abr. 2020.

CORRÊA, G. DE O. P. et al. *In vitro* evaluation of cytotoxicity and eye irritation potential of some preservatives most used in cosmetics. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, no prelo.

CORRÊA, M. A. **Cosmetologia Ciência e Técnica**. 1º ed. São Paulo: Medfarma, 2012.

DARBRE, P. D.; HARVEY, P. W. Paraben esters: review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks. **Journal of Applied Toxicology**, v. 28, n. 5, p. 561–578, 2008.

DARBRE, P. D.; HARVEY, P. W. Parabens can enable hallmarks and characteristics of cancer in human breast epithelial cells: a review of the literature with reference to new exposure data and regulatory status: Parabens and breast cancer. **Journal of Applied Toxicology**, v. 34, n. 9, p. 925–938, 2014.

DEPA. **Survey and health and environmental assessment of preservatives in cosmetic products**. Copenhagen: The Danish Environmental Protection Agency, 2015.

DRÉNO, B. et al. Safety review of phenoxyethanol when used as a preservative in cosmetics. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 33, n. S7, p. 15–24, 2019a.

DRÉNO, B. et al. Safety review of phenoxyethanol when used as a preservative in cosmetics. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 33, n. S7, p. 15–24, 2019b.

EBERLIN, S. et al. Métodos alternativos para Avaliação de Segurança de Produtos no Brasil. **Cosmetics & Toiletries**, v. 31, p. 18–26, 2019.

ECHA (European Chemicals Agency). **Practical Guide - How to use and report (Q)SARs**. Helsinki, Finland: ECHA, 2016.

EUROPEAN UNION. **Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006.** 2008.

EUROPEAN UNION. **Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products.** 2009.

EUROPEAN UNION. **Commission Regulation (EU) No 1003/2014 of 18 September 2014 amending Annex V to Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council on cosmetic products**. 2014.

EUROPEAN UNION. **Commission Regulation (EU) 2016/1198 of 22 July 2016 amending Annex V to Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council on cosmetic products.** 2016.

FANG, B. et al. A new alternative to cosmetics preservation and the effect of the particle size of the emulsion droplets on preservation efficacy. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 38, n. 5, p. 496–503, 2016.

FOTI, C. et al. Sodium Dehydroacetate: An Emerging Allergen. **Dermatitis**, v. 23, n. 5, 2012.

FOTI, C. et al. Allergic contact dermatitis caused by resorcinol and sodium dehydroacetate in a patient with leg ulcers. **Contact Dermatitis**, v. 74, n. 6, p. 383–384, 2016.

GARCIA-HIDALGO, E. et al. Aggregate consumer exposure to isothiazolinones via household care and personal care products: Probabilistic modelling and benzisothiazolinone risk assessment. **Environment International**, v. 118, p. 245–256, 2018.

GELLATLY, N.; SEWELL, F. Regulatory acceptance of *in silico* approaches for the safety assessment of cosmetic-related substances. **Computational Toxicology**, v. 11, p. 82–89, 2019.

GHS (Globally Harmonised System of Classification, Labelling and Packaging of Chemicals). **GHS Classification Criteria for Eye Irritation and Serious Eye Damage**. Disponível em:

<https://www.chemsafetypro.com/Topics/GHS/GHS_Classification_Criteria_for_Serious_Eye_Damage_and_Eye_Irritation.html>. Acesso em: 13 jan. 2021a.

GHS (Globally Harmonised System of Classification, Labelling and Packaging of Chemicals). **GHS Classification Criteria for Acute Toxicity**. Disponível em: <https://www.chemsafetypro.com/Topics/GHS/GHS_classification_criteria_acute_toxicity_category.html>. Acesso em: 18 fev. 2021b.

GONZÁLEZ-MUÑOZ, P.; CONDE-SALAZAR, L.; VAÑÓ-GALVÁN, S. Dermatitis alérgica de contacto a cosméticos. **Actas Dermo-Sifiliográficas**, v. 105, n. 9, p. 822–832, 2014.

GRAF, P. Adverse Effects of benzalkonium chloride on the nasal mucosa: Allergic rhinitis and rhinitis medicamentosa. **Clinical Therapeutics**, v. 21, n. 10, p. 1749–1755, 1999.

GROOT, A. C. DE et al. The Allergens in Cosmetics. **Archives of Dermatology**, v. 124, n. 10, p. 1525–1529, 1988.

HAGEN, S. L.; WARSHAW, E. The Latest Occult "Hypoallergenic" Allergen: Ethylhexylglycerin. **Dermatitis: Contact, Atopic, Occupational, Drug**, v. 28, n. 3, p. 220–222, 2017.

HALLA, N. et al. Cosmetics Preservation: A Review on Present Strategies. **Molecules**, v. 23, n. 7, 2018.

HARDY, A. et al. Guidance on the use of the weight of evidence approach in scientific assessments. **EFSA Journal**, v. 15, n. 8, p. e04971, 2017.

HENNIGAN, C. **COVID-19 increases demand for safe BPC products**. Disponível em: <https://www.mintel.com/blog/beauty-market-news/covid-19-increases-demand-for-safe-and-reliable-bpc-products>. Acesso em: 8 jul. 2020.

HERMAN, A. Antimicrobial Ingredients as Preservative Booster and Components of Self-Preserving Cosmetic Products. **Current Microbiology**, v. 76, n. 6, p. 744–754, 2019.

IARC (International Agency for Research on Cancer). **IARC Monographs on the Identification of Carcinogenic Hazards to Humans**, jan. 2019. Disponível em: <https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2019/07/Preamble-2019.pdf>. Acesso em: 25 set. 2020

ISO (International Organization for Standardization). **Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity (ISO 10993-5)**, 2009.

JENNINGS, P. "The future of *in vitro* toxicology". **Toxicology in Vitro**, v. 29, n. 6, p. 1217–1221, 2015.

JING, J. L. J. et al. Hand Sanitizers: A Review on Formulation Aspects, Adverse Effects, and Regulations. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 9, p. 3326, 2020.

JOHNSON, W. et al. Safety Assessment of 1,2-Glycols as Used in Cosmetics. **International Journal of Toxicology**, v. 31, n. Suppl. 5, p. 147S-168S, 2012.

JOHNSON, W. et al. Safety Assessment of Alkyl Glyceryl Ethers as Used in Cosmetics. **International Journal of Toxicology**, v. 32, n. 5_suppl, p. 5S-21S, 2013.

JOHNSON, W. et al. Safety Assessment of Benzyl Alcohol, Benzoic Acid and its Salts, and Benzyl Benzoate. **International Journal of Toxicology**, v. 36, n. 3, p. 5S-30S, 2017.

KOSE, O. et al. Evaluation of skin irritation potentials of different cosmetic products in Turkish market by reconstructed human epidermis model. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 98, p. 268–273, 2018.

LANGSRUD, S. et al. Ethylhexylglycerin Impairs Membrane Integrity and Enhances the Lethal Effect of Phenoxyethanol. **PLoS ONE**, v. 11, n. 10, p. 1–16, 2016.

LILIENBLUM, W. Opinion of the Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS) – Final version of the opinion on Phenoxyethanol in cosmetic products. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 82, p. 156, 2016.

LUNDOV, M. D.; ZACHARIAE, C.; JOHANSEN, J. D. Methylisothiazolinone contact allergy and dose-response relationships. **Contact Dermatitis**, v. 64, n. 6, p. 330–336, 2011.

LV, C. et al. Investigation on formaldehyde release from preservatives in cosmetics. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 37, n. 5, p. 474–478, 2015.

MAJEWSKA, N. et al. Methylparaben-induced decrease in collagen production and viability of cultured human dermal fibroblasts: Methylparaben inhibits collagen production. **Journal of Applied Toxicology**, v. 37, n. 9, p. 1117–1124, 2017.

MCGAW, L. J.; ELGORASHI, E. E.; ELOFF, J. N. 8 - Cytotoxicity of African Medicinal Plants Against Normal Animal and Human Cells. In: **Toxicological Survey of African Medicinal Plants**. Africa: Elsevier, 2014. p. 181–233.

MENDONÇA, E. **A beleza se rende ao minimalismo**. Disponível em: <https://cosmeticinnovation.com.br/a-beleza-se-rende-ao-minimalismo/>. Acesso em: 1 mar. 2021.

MENDONÇA, E. **Vendas de HPPC crescem 4,7% em 2020 e totalizam R$ 122,4 bilhões**. Disponível em: <https://cosmeticinnovation.com.br/vendas-de-hppc-crescem-47-em-2020-e-totalizam-r-1224-bilhoes/>. Acesso em: 15 jun. 2021.

MILPIED, B. et al. Allergic contact dermatitis caused by sodium dehydroacetate, not hyaluronic acid, in Ialuset® cream. **Contact Dermatitis**, v. 65, n. 6, p. 359–361, 2011.

MORETTO, L. D.; STEPHANO, M. A. **Métodos alternativos ao uso de animais em pesquisa reconhecidos no Brasil**. 1. ed. São Paulo: Limay, 2019.

MORRISON, V. L. et al. Intravitreal toxicity of the kenalog vehicle (benzyl alcohol) in rabbits. **Retina (Philadelphia, Pa.)**, v. 26, n. 3, p. 339–344, 2006.

MORTZ, C. G.; OTKJAER, A.; ANDERSEN, K. E. Allergic contact dermatitis to ethylhexylglycerin and pentylene glycol. **Contact Dermatitis**, v. 61, n. 3, p. 180–180, 2009.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1, p. 55–63, 1983.

NOWAK, K. et al. Parabens and their effects on the endocrine system. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 474, p. 238–251, 2018.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). **OECD TG 428: Skin Absorption In Vitro Method**, 2004.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). **OECD TG 429: Skin Sensitisation - Local Lymph Node Assay**, 2010a.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). **OECD TG 442A: Skin Sensitization - Local Lymph Node Assay: DA**, 2010b.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). **Guidance Document on an Integrated Approach on Testing and Assessment (IATA) for Skin Corrosion and Irritation (No. 203)**, 2014.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). **OECD TG 435: In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion**, 2015a.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). **Guidance document on the in vitro Syrian Hamster Embryo (SHE) cell transformation assay (No. 214)**, 2015b.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). **OECD TG 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test**, 2016a.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). **Guidance document on the in vitro BHAS 42 cell transformation assay (No. 231)**, 2016b.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). **OECD TG 460: Fluorescein Leakage Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants**, 2017.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). **OECD TG 442D: In Vitro Skin Sensitisation - ARE-Nrf2 Luciferase Test Method**, 2018a.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). **OECD TG 442E: In Vitro Skin Sensitisation - Activation of dendritic cells on the Adverse Outcome Pathway**, 2018b.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). **OECD TG 442B: Skin Sensitization - Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA or –FCM**, 2018c.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). **OECD TG 438: Isolated Chicken Eye Test Method**, 2018d.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). **OECD TG 491: Short Time Exposure In Vitro Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage**, 25 jun. 2018e.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). **OECD TG 431: In vitro skin corrosion: reconstructed human epidermis (RHE) test method**, 2019a.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). **Draft OECD Guideline Defined Approaches for Skin Sensitisation**, 2019b.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). **OECD TG 492: Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method**, 2019c.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). **OECD TG 432: In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test**, 2019d.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). **Guidance Document on Integrated Approaches on Testing and Assessment (IATA) for Serious Eye Damage and Eye Irritation (No. 263)**, 25 jul. 2019e.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). **OECD TG 439: In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method**, 2020a.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). **OECD TG 442C: In Chemico Skin Sensitisation**, 2020b.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). **OECD TG 437: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method**, 2020c.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). **OECD TG 471: Bacterial Reverse Mutation Test**, 2020d.

OSORIO, R. M. et al. Cytotoxicity of endodontic materials. **Journal of Endodontics**, v. 24, n. 2, p. 91–96, 1998.

PASTOR-NIETO, M. A. et al. Conservantes en productos de higiene y cosméticos, medicamentos tópicos y productos de limpieza doméstica en España. **Actas Dermo-Sifiliográficas**, v. 108, n. 8, p. 758–770, 2017.

PINTO, T. DE J. A.; KANEKO, T. M.; PINTO, A. F. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. Barueri: Manole, 2015.

PRESGRAVE, O. et al. Brazilian Center for the Validation of Alternative Methods (BraCVAM) and the process of validation in Brazil. **Alternatives to laboratory animals: ATLA**, v. 44, n. 1, p. 85–90, 2016.

REPETTO, G.; DEL PESO, A.; ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. **Nature Protocols**, v. 3, n. 7, p. 1125–1131, 2008.

ROGIERS, V. et al. The way forward for assessing the human health safety of cosmetics in the EU - Workshop proceedings. **Toxicology**, v. 436, p. 152421, 2020.

RUSSEL, W. M. S.; BURCH, R. L. **The Principles of Humane Experimental Technique**. London: Methuen, 1959.

SCCNFP (Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-food Products). **Opinion Concerning Fragrance Allergy in consumers, SCCNFP/0017/98 final**, 1999.

SCCNFP (Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-food Products). **Evaluation and opinion on: Benzoic acid and sodium benzoate. SCCNFP/0532/01, final**, 2002.

SCCP (Scientific Committee on Consumer Products). **Opinion on Benzoic Acid and Sodium benzoate, SCCP/0891/05**, 2005.

SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety). **Opinion on the mixture of 5-chloro-2-methylisothiazolin-3(2H)-one and 2-methylisothiazolin-3(2H)-one, SCCS/1238/09**, 2009.

SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety). **Opinion on fragrance allergens in cosmetic products (SCCS/1459/11)**, 2011.

SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety). **Opinion on parabens**. Brussels: European Commission, 2013.

SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety). **Final Opinion on Methylisothiazolinone (MI) (P94), submission III, sensitisation only, SCCS/1557/15**, 2015.

SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety). **Opinion on Phenoxyethanol, SCCS/1575/16**, 2016a.

SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety). **Notes of Guidance for the Testing of Cosmetic Ingredients and their Safety Evaluation 9th revision**, 2016b.

SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety). **The SCCS notes of guidance for the testing of cosmetic ingredients and their safety evaluation - 10TH Revision**, 2018.

SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety). **The SCCS notes of guidance for the testing of cosmetic ingredients and their safety evaluation – 11TH revision (SCCS/1628/21)**, 2021.

SHABIR, G. A. et al. Development and Validation of a RPLC Method for the Determination of 2-Phenoxyethanol in Senselle Lubricant Formulation. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 72, n. 3, p. 312–317, 2010.

SONI, M. G. et al. Safety assessment of propyl paraben: a review of the published literature. **Food and Chemical Toxicology**, v. 39, n. 6, p. 513–532, 2001.

STAUSBØL-GRØN, B.; ANDERSEN, K. E. Allergic contact dermatitis to ethylhexylglycerin in a cream. **Contact Dermatitis**, v. 57, n. 3, p. 193–194, 2007.

STEINBERG, D. C. **Frequency of Preservative Use Update Through 2014**. Disponível em: <https://www.cosmeticsandtoiletries.com/regulatory/region/northamerica/Frequency-of-Preservative-Use-Update-Through-2014-367684531.html>. Acesso em: 29 jan. 2020.

STEINBERG, D. C. **Preservative Update: Frequency of Use Through 2018**. Disponível em: <https://www.cosmeticsandtoiletries.com/formulating/function/preservatives/Preservative-Update-Frequency-of-Use-Through-2018-561424721.html>. Acesso em: 28 jan. 2021.

STROBER, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. **Current Protocols in Immunology**, v. 111, n. 1, p. A3.B.1-A3.B.3, 2015.

TAHAN, G. P. et al. Determination of parabens in serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Correlation with lipstick use. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 79, p. 42–48, 2016.

TAKAHASHI, Y. et al. Development of the short time exposure (STE) test: An *in vitro* eye irritation test using SIRC cells. **Toxicology in Vitro**, v. 22, n. 3, p. 760–770, 2008.

TAOFIQ, O. et al. Mushroom ethanolic extracts as cosmeceuticals ingredients: Safety and *ex vivo* skin permeation studies. **Food and Chemical Toxicology**, v. 127, p. 228–236, 2019.

TOLLEFSEN, K. E. et al. Applying Adverse Outcome Pathways (AOPs) to support Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA). **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 70, n. 3, p. 629–640, 2014.

TOWLE, K. M. et al. Risk Assessment of the Skin Sensitization Induction Potential of Kathon CG in Rinse-off and Leave-on Personal Care and Cosmetic Products. **Dermatitis: Contact, Atopic, Occupational, Drug**, v. 29, n. 3, p. 132–138, 2018.

TRIGLIA, D. et al. Cytotoxicity testing using neutral red and MTT assays on a three-dimensional human skin substrate. **Toxicology in Vitro**, v. 5, n. 5–6, p. 573–578, 1991.

USEPA (United States Environmental Protection Agency). **Overview of the GHS Classification Scheme in Hazard Classification**. Washington (DC): National Academies Press (US), 2014.

VAN DE SANDT, J. et al. The Use of Human Keratinocytes and Human Skin Models for Predicting Skin Irritation. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 27, n. 5, p. 723–743, 1999.

VARVARESOU, A. et al. Self-preserving cosmetics. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 31, n. 3, p. 163–175, 2009.

VUKMANOVIĆ, S.; SADRIEH, N. Skin sensitizers in cosmetics and beyond: potential multiple mechanisms of action and importance of T-cell assays for in vitro screening. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 47, n. 5, p. 422–439, 2017.

WILKENING, S.; STAHL, F.; BADER, A. Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line Hepg2 with regard to their biotransformation properties. **Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals**, v. 31, n. 8, p. 1035–1042, 2003.

WILLIAMS, P. R. D.; PAUSTENBACH, D. J. Risk Characterization: Principles and Practice. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, v. 5, n. 4, p. 337–406, 2002.

YU, S. H.; SOOD, A.; TAYLOR, J. S. Patch Testing for Methylisothiazolinone and Methylchloroisothiazolinone-Methylisothiazolinone Contact Allergy. **JAMA Dermatology**, v. 152, n. 1, p. 67–72, 2016.

ZANONI, B. et al. Cytotoxic effect of protic ionic liquids in HepG2 and HaCat human cells: i*n vitro* and *in silico* studies. **Toxicology Research**, v. 8, 2019.

ZHU, H. et al. Big Data in Chemical Toxicity Research: The Use of High-Throughput Screening Assays to Identify Potential Toxicants. **Chemical Research in Toxicology**, v. 27, n. 10, p. 1643–1651, 2014.