

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 19/01/2020.

**Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”**

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

**Avaliação *in vitro* da citotoxicidade e potencial de
irritação de conservantes antimicrobianos utilizados
em cosméticos**

Gabriela de Oliveira Prado Corrêa

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vera Lucia Borges Isaac

Araraquara
2018

**Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”**

**Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Câmpus de Araraquara**

**Avaliação *in vitro* da citotoxicidade e potencial de
irritação de conservantes antimicrobianos utilizados
em cosméticos**

Gabriela de Oliveira Prado Corrêa

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vera Lucia Borges Isaac

Araraquara
2018

Ficha Catalográfica

Elaborada por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

C824a Correa, Gabriela Oliveira Prado
Avaliação *in vitro* da citotoxicidade e potencial de irritação de conservantes antimicrobianos utilizados em cosméticos / Gabriela Oliveira Prado Correa. – Araraquara, 2018.
89 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – 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. Conservantes antimicrobianos. 2. Cosméticos. 3. Segurança. I. Isaac, Vera Lucia Borges, orient. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada por Maria Irani Coito CRB-8/4.440

CAPES: 40300005

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: AVALIAÇÃO IN VITRO DA CITOTOXICIDADE E POTENCIAL DE IRRITAÇÃO 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 Mestra em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de conhecimento: SEM ÁREA DE CONHECIMENTO pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. VERA LUCIA BORGES ISAAC
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP



Prof. Dr. MARCOS ANTONIO CORREA
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP



Profa. Dra. GISLAINE RICCI LEONARDI
Faculdade de Ciências Farmacêuticas / Universidade Estadual de Campinas- UNICAMP

Araraquara, 19 de fevereiro de 2018

Dedicatória

Ao meu marido Murilo Corrêa e aos meus pais Celso e Rosangela, pelo apoio incondicional, paciência e por acreditarem nos meus sonhos.

Agradecimentos

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

À professora **Vera Lucia Borges Isaac** pela amizade, companheirismo, paciência, incentivo e todos os ensinamentos acadêmicos e de vida;

À **Maria Gabriela José de Almeida Cincotto** pela ajuda, ensinamentos, paciência e amizade;

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

À professora **Regina Maria Barretto Cicarelli** por ceder seu laboratório para a realização de alguns ensaios;

Aos colegas e estagiários de laboratório, pelo companheirismo e por estarem sempre prontos a ajudar;

À professora **Daniele Michelin Paganotte** por me incentivar a entrar no mestrado;

Aos demais professores e todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho;

À empresa **Hydraplus Indústria e Comércio Ltda.** pela doação de amostras para a realização deste trabalho.

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;

Muito obrigada!

*“Se apenas houvesse uma única verdade,
não poderiam pintar-se cem telas sobre o
mesmo tema”.*

(Pablo Picasso)

Resumo

Cosméticos são usados pelo homem desde a antiguidade e o consumo desse segmento vem aumentando a cada ano, praticamente imune a crises. O Brasil é o quarto maior mercado de cosméticos no mundo, ficando atrás apenas dos Estados Unidos, China e Japão, segundo dados da Associação Brasileira de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos. Dentre as matérias primas que mais causam reações alérgicas estão os conservantes, corantes e composições aromáticas. Assim sendo, a preocupação com a segurança dos conservantes cosméticos deve ser intensificada. Grande importância é dada ao assunto atualmente, existindo a preocupação com o potencial de irritação e toxicidade para o consumidor e não apenas com o aspecto microbiológico. Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a citotoxicidade e potencial de irritação de conservantes antimicrobianos que são utilizados em cosméticos. Foram realizados ensaios de citotoxicidade, através do método MTT, em células de fibroblastos humano (HDFa), células de queratinócitos humano (HaCaT) e células de carcinoma hepatocelular humano (HepG2) e potencial de irritação em ovos embrionados de galinha através do método HET-CAM. Foram utilizados os conservantes: fenoxietanol, mistura de fenoxietanol e metilisotiazolinona (Fenox/Mit), mistura de metilcloroisotiazolinona e metilisotiazolinona (CMit/Mit), metilparabeno e propilparabeno, que são amplamente utilizados em cosméticos. Os conservantes mais citotóxicos e com maior pontuação de irritação (PI) considerados irritantes, foram: fenoxietanol (HaCat IC₅₀: 0,237 mg/mL; HDFa IC₅₀: 0,200 mg/mL; HepG2 IC₅₀: 0,248 mg/mL; PI: 16) e Fenox/Mit (HaCat IC₅₀: 0,156 mg/mL; HDFa IC₅₀: ~0,056 mg/mL; HepG2 IC₅₀: 0,119 mg/mL; PI: 10). Os demais conservantes, CMit/Mit (HaCat: não tóxico; HDFa: não tóxico; HepG2: >0,0045 mg/mL), propilparabeno (HaCat IC₅₀: ~0,200 mg/mL; HDFa IC₅₀: >0,200 mg/mL; HepG2: 0,039 mg/mL) e metilparabeno (HaCat IC₅₀: >0,400 mg/mL; HDFa IC₅₀: >0,400 mg/mL; HepG2: 0,062 mg/mL), apresentaram baixa citotoxicidade nas linhagens HaCaT e HDFa, e uma citotoxicidade mais acentuada na linhagem HepG2. No ensaio HET-CAM, CMit/Mit (PI: 5) e metilparabeno (PI:6) foram considerados moderadamente irritantes, e o propilparabeno (PI: 0) foi classificado como praticamente não irritante. Diante destes resultados, foi possível concluir que CMit/Mit, propilparabeno e metilparabeno apresentaram resultados que viabilizam sua continuidade como conservantes em cosméticos; porém é necessária a realização de outros ensaios para avaliar de maneira mais precisa a segurança desses conservantes, assim como para os demais conservantes testados.

Palavras chave: conservantes antimicrobianos; cosméticos; segurança.

Abstract

Cosmetics have been used by man since antiquity and the consumption of this segment has been increasing every year, practically immune to crises. Brazil is the fourth largest cosmetics market in the world, behind only the United States, China and Japan, according to data from the Brazilian Association of Personal Hygiene, Perfumery and Cosmetics. Among the raw materials that most cause allergic reactions are preservatives, dyes and aromatic compositions. Therefore, concern about the safety of cosmetic preservatives should be intensified. Great importance is given to the subject nowadays, there being concern about the potential for irritation and toxicity to the consumer and not just with the microbiological aspect. Thus, the present work aimed to evaluate the cytotoxicity and irritation potential of antimicrobial preservatives that are used in cosmetics. Cytotoxicity were assessed by MTT assay method using human fibroblast cells (HDFa), human keratinocytes cells (HaCaT) and using human hepatoma cells (HepG2) and irritation potential in embryonated chicken eggs using the HET-CAM method. Preservatives were used: phenoxyethanol, a mixture of phenoxyethanol and methylisothiazolinone (Fenox/Mit), a mixture of methylchloroisothiazolinone and methylisothiazolinone (CMit / Mit), methylparaben and propylparaben, which are widely used in cosmetics. The most cytotoxic and highest irritation score (IS) preservatives considered irritants, were: phenoxyethanol (HaCat IC₅₀: 0,237 mg/mL; HDFa IC₅₀: 0,200 mg/mL; HepG2 IC₅₀: 0,248 mg/mL; IS: 16) and Fenox/Mit (HaCat IC₅₀: 0,156 mg/mL; HDFa IC₅₀: ~0,056 mg/mL; HepG2 IC₅₀: 0,119 mg/mL; IS: 10). The other preservatives, CMit/Mit (HaCat: non-toxic; HDFa: non-toxic; HepG2: >0,0045 mg/mL), propylparaben (HaCat IC₅₀: ~0,200 mg/mL; HDFa IC₅₀: >0,200 mg/mL; HepG2: >0,400 mg/mL) and methylparaben (HaCat IC₅₀: >0,400 mg/mL; HDFa IC₅₀: >0,400 mg/mL; HepG2: 0,062 mg/mL), showed low cytotoxicity in the HaCaT and HDFa cells, and a more marked cytotoxicity in the HepG2 cell. In the HET-CAM assay, CMit Mit (IS: 5) and methylparaben (IS: 6) were considered moderately irritant, and propylparaben (IS: 0) was classified as practically non-irritant. In view of these results, it was possible to conclude that CMit/Mit, propylparaben and methylparaben presented results that allow their continuity as preservatives in cosmetics; but further testing is required to more accurately assess the safety of these preservatives as well as other preservatives tested.

Keywords: antimicrobial preservatives; cosmetics; safety.

Lista de Abreviaturas e Siglas

a.a.: Ao ano;
a.C.: Antes de Cristo;
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária;
ABIHPEC: Associação Brasileira de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos;
BCOP: *Bovine Corneal Opacity and Permeability*;
CAS: *Chemical Abstract Service*;
CCT: Comissão de Ciência, Tecnologia, Inovação, Comunicação e Informática;
CMA: Comissão de Meio Ambiente, Defesa do Consumidor e Fiscalização e Controle;
CMit: metilcloroisotiazolinona;
CMit/Mit: Mistura de metilcloroisotiazolinona e metilisotiazolinona;
CO₂: Dióxido de carbono;
DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose*;
DMSO: Dimetilsulfóxido;
ECVAM: *European Centre for the Validation of Alternative Methods*;
FAAH: *Fatty Acid Amide Hydrolase*;
Fenox/Mit: Mistura de fenoxietanol e metilisotiazolinona;
HET-CAM: *Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane*;
HaCaT: *Human immortalized keratinocytes*;
HDFa: *Human Dermal Fibroblasts adult*;
Hep G2: *Liver Hepatocellular Carcinoma*;
IC₅₀: Concentração capaz de provocar 50% de morte celular.
ICCVAM: *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*;
ISO: *International Standard Organization*;
Mit: metilisotiazolinona;
MTT: 3-(4,5 dimethyl thiazole-2yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide;
NaCl: Cloreto de sódio;
NaOH: hidróxido de sódio;
NRU: *Neutral Red Uptake*;
OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development;
PBS: *Phosphate Buffered Saline*;
PI: Pontuação de irritação;
PLC: Projeto de Lei da Câmara;
ppm: Partes por milhão;
RDC: Resolução da Diretoria Colegiada;
SEPED: Secretaria de políticas e programas de pesquisa e desenvolvimento
UFC: Unidades Formadoras de Colônias;
UVA: Ultravioleta A;
UV: Ultravioleta.

Lista de Tabelas e Quadros

Lista de Tabelas

Tabela 1. Conservantes e concentrações utilizadas nos ensaios	48
Tabela 2. Valores de IC ₅₀ obtidos nos ensaios de citotoxicidade em diferentes linhagens celulares.	54
Tabela 3. Pontuação de irritação (PI), tempo e classificação dos conservantes submetidas ao teste HET-CAM	58

Lista de Quadros

Quadro 1. Conservantes utilizados em cosméticos, com seus respectivos INCI Names, código CAS e fórmula molecular.	25
Quadro 2. Esquema de pontuação para Teste de Irritação (método HET-CAM)	52
Quadro 3. Pontuação referente aos fenômenos em função do tempo	52

Lista de Figuras

Figura 1. Estruturas químicas de sete ésteres alquílicos do ácido p-hidroxibenzóico (parabenos)	28
Figura 2. Estrutura química do Fenoxietanol	31
Figura 3. Estrutura química de Metilisotiazolinona (1) e Metilcloroisotiazolinona (2)	33
Figura 4. Curvas de viabilidade celular para linhagem HaCaT após 24h de tratamento com os conservantes Fenoxietanol, Fenox/Mit, CMit/Mit, Metilparabeno e Propilparabeno	55
Figura 5. Curvas de viabilidade celular para linhagem HDFa após 24h de tratamento com os conservantes Fenoxietanol, Fenox/Mit, CMit/Mit, Metilparabeno e Propilparabeno	56
Figura 6. Curvas de viabilidade celular para linhagem HepG2 após 24h de tratamento com os conservantes Fenoxietanol, Fenox/Mit, CMit/Mit, Metilparabeno e Propilparabeno	57
Figura 7. Avaliação do potencial de irritação na membrana córneo-alantoide do controle negativo NaCl 0,9% m/v, após 0,5, 2, e 5 min. *ST: sem tratamento	59
Figura 8. Avaliação do potencial de irritação na membrana córneo-alantoide do controle positivo NaOH 0,1N, após 0,5, 2, e 5 min	60
Figura 9. Avaliação do potencial de irritação na membrana córneo-alantoide do conservante fenoxietanol, após 0,5, 2, e 5 min	61
Figura 10. Avaliação do potencial de irritação na membrana córneo-alantoide do conservante Fenox/Mit, após 0,5, 2, e 5 min	62
Figura 11. Avaliação do potencial de irritação na membrana córneo-alantoide do conservante CMit/Mit após 0,5, 2, e 5 min	63
Figura 12. Avaliação do potencial de irritação na membrana córneo-alantoide do conservante propilparabeno, após 0,5, 2, e 5 min	64
Figura 13. Avaliação do potencial de irritação na membrana córneo-alantoide do conservante metilparabeno, após 0,5, 2, e 5 min	65

Sumário

1. Introdução	15
2. Revisão bibliográfica	18
2.1. Cosméticos	18
2.2. Conservantes	21
2.2.1. Parabenos	26
2.2.2. Fenoxietanol	30
2.2.3. Isotiazolinonas	32
2.3. Proibição do uso de animais	35
2.4. Ensaio para avaliação da segurança de conservantes	37
2.4.1. Ensaio biológico (<i>in vivo</i>)	38
2.4.2. Ensaio <i>in vitro</i>	39
3. Objetivos	42
3.1. Objetivo geral	42
3.2. Objetivos específicos	42
4. Material e Métodos	43
4.1. Material	43
4.1.1. Reagentes e matérias primas	43
4.2. Acessórios	44
4.2.1. Equipamentos	45
4.3. Métodos	45
4.3.1. Avaliação da citotoxicidade dos conservantes em linhagem celular HaCaT, HDFa e HepG2 pelo método do MTT	45
4.3.2. Ensaio de irritação em modelo organotípico – HET - CAM (<i>Hen's Egg Test on the Choriallantoic Membrane</i>)	49
5. Resultados	53
5.1. Avaliação da citotoxicidade dos conservantes em linhagem celular HaCaT, HDFa e HepG2 pelo método do MTT	53
5.2. Ensaio de irritação em modelo organotípico – HET - CAM (<i>Hen's Egg Test on the Choriallantoic Membrane</i>)	58
6. Discussão	66
6.1. Avaliação da citotoxicidade dos conservantes em linhagem celular HaCaT, HDFa e HepG2 pelo método do MTT	66
6.2. Ensaio de irritação em modelo organotípico – HET - CAM (<i>Hen's Egg Test on the Choriallantoic Membrane</i>)	70
7. Conclusão	74
Referências	76

1. Introdução

Existem vários tipos de conservantes antimicrobianos, sendo mais utilizados os parabenos que foram introduzidos nos anos 30, e são amplamente utilizados como conservantes em alimentos, bebidas, medicamentos e produtos de higiene pessoal. Essa classe de conservante se mostra pouco efetivo frente à *Pseudomonas aeruginosa*, sendo necessário, muitas vezes o uso de outros conservantes, como o fenoxietanol, isotiazolinonas ou ainda a imidazolidiniluréia¹⁻³.

Pelas mais diferentes formas, podem ser introduzida a contaminação microbiológica em produtos cosméticos ou correlatos, podendo estar presentes em alguma matéria prima, ou ser provenientes de equipamentos ou recipientes usados na manipulação, e ainda pela má utilização do produto pelo consumidor. São particularmente susceptíveis à contaminação microbiana algumas destas matérias primas como produtos de origem vegetal, água, gomas naturais, proteínas e amidos, pois podem possibilitar o crescimento de microrganismos⁴.

Quando se considera a qualidade microbiológica de produtos farmacêuticos de uso oral e tópico, é admissível a presença de um número limitado de microrganismos, tendo em vista as características de sua utilização⁴. A Farmacopeia Brasileira, em sua quinta edição (2010)⁵, estabelece os limites microbianos para produtos não estéreis. No caso dos produtos de uso tópico, deve haver ausência de patógenos, contagem total de bactérias aeróbias no máximo de 100 UFC/g e contagem total de fungos/leveduras no máximo de 10 UFC/g. A contaminação microbiana de um produto pode conduzir não somente à sua deterioração, com as mudanças físicas e químicas associadas, mas, também, ao risco de infecção para o usuário.

Podem ser indícios de contaminação microbiológica, as mudanças na coloração, no odor e na consistência de um produto. Para evitar essas alterações, a escolha do conservante tem que ser realizada conforme as características da formulação, tais como: susceptibilidade à contaminação, características físico químicas e possíveis incompatibilidades. Devido às dificuldades de se encontrar um conservante ideal, é possível utilizar misturas de conservantes, a fim de estabelecer uma combinação ou *blends* mais adequados⁶.

Ensaio *in vitro* tem sido empregados em avaliação de produtos cosméticos, desde que foi iniciada, há quase uma década, a campanha para não mais uso de animais para testes em cosméticos. Desde então, as metodologias têm sido empregadas considerando a política preconizada por Russel e Burch, em 1959, relativa à substituição, redução e refinamento; ou seja, aos 3 Rs, do inglês, *replace*, *reduce* e *refine* para os ensaios em animais. Dessa maneira, modelos animais têm sido restritos ao emprego de menor número de animais quanto possível, utilização do mesmo animal para diferentes testes e redução, ao máximo, do número de animais⁷⁻¹⁰.

É relativamente nova a ciência de conservação dos produtos farmacêuticos e cosméticos, sendo tratada de maneira científica a partir dos últimos 70 anos. Grande importância é dada ao assunto atualmente, existindo a preocupação com o potencial de irritação e toxicidade para o consumidor e não apenas com o aspecto microbiológico¹¹.

A avaliação da segurança está baseada na análise do risco e deve considerar os parâmetros toxicológicos dos ingredientes com base em dados atualizados, observadas as condições de uso do produto cosmético e o perfil do consumidor alvo. A maioria das informações necessárias na avaliação do risco potencial de um

produto cosmético resulta do conhecimento dos ingredientes que compõem sua fórmula. São eles que podem, diretamente, ser os responsáveis por qualquer efeito local e sistêmico. Contudo, a fórmula do produto acabado também pode interferir, à medida que facilita a absorção total ou parcial dos ingredientes. Além disso, as possíveis interações, resultantes da associação entre os ingredientes, podem influenciar no risco potencial de um produto¹².

Não raro, o que se observa é que o formulador deixa a escolha do conservante para o final do processo de desenvolvimento, havendo a tendência em se lançar mão sempre das mesmas matérias primas. Os conservantes são de extrema importância para uma formulação cosmética pois, prevenindo a contaminação microbiológica, problemas como perda da estabilidade, alterações das características organolépticas e inativação dos princípios ativos podem ser evitados.

A inserção no mercado de produtos livres de parabenos (*parabens free*) vem forçando as indústrias a desenvolver novos conservantes que, muitas vezes, não são tão efetivos quanto os parabenos e, ainda, em alguns casos, precisam ser utilizados em concentrações mais altas; conseqüentemente, aumentando as chances de efeitos tóxicos e reações adversas.

7. Conclusão

Os resultados obtidos no ensaio de citotoxicidade foram semelhantes ao ensaio HET-CAM, onde os conservantes mais citotóxicos nas três linhagens celulares analisadas, fenoxietanol e mistura de fenoxietanol com metilisotiazolinona foram, também, os considerados mais irritantes.

O fenoxietanol apresentou elevada citotoxicidade nas linhagens celulares analisadas (HaCat IC_{50} : 0,237 mg/mL; HDFa IC_{50} : 0,200 mg/mL; HepG2 IC_{50} : 0,248 mg/mL). No ensaio HET-CAM, foi considerado irritante (PI: 16).

A mistura de fenoxietanol e metilisotiazolinona também apresentou elevada citotoxicidade nas linhagens celulares analisadas (HaCat IC_{50} : 0,156 mg/mL; HDFa IC_{50} : ~0,056 mg/mL; HepG2 IC_{50} : 0,119 mg/mL). No ensaio HET-CAM, foi considerado irritante (PI: 10).

A mistura de conservantes CMit/Mit apresentou pouca citotoxicidade nas três linhagens celulares analisadas. A viabilidade celular foi mantida entre 85 a 100%, na concentração máxima de uso permitida pela ANVISA, de 0,0015% (RDC 29/2012). No ensaio HET-CAM, foi considerada moderadamente irritante (PI: 5).

Os parabenos, propilparabeno (HaCat IC_{50} : ~0,200 mg/mL; HDFa IC_{50} : >0,200 mg/mL) e metilparabeno (HaCat IC_{50} : >0,400 mg/mL; HDFa IC_{50} : >0,400 mg/mL), também apresentaram resultados satisfatórios nos ensaios de citotoxicidade, exceto na linhagem HepG2, na qual os valores de IC_{50} : 0,039 mg/mL para o propilparabeno e 0,062 mg/mL para o metilparabeno, ficaram dentro da concentração usual 0,02 – 0,1% e 0,05 – 0,25%, respectivamente. No ensaio HET-CAM o propilparabeno foi considerado praticamente não irritante (PI: 0) e o metilparabeno moderadamente irritante (PI: 6).

Diante destes resultados, foi possível concluir que os conservantes CMit/Mit, propilparabeno e metilparabeno apresentaram resultados que viabilizam sua continuidade como conservantes em cosméticos, porém é necessária a realização de outros ensaios para avaliar de maneira mais precisa a segurança desses conservantes, assim como para os demais conservantes testados.

Referências

- (1) Aubert N, Ameller T, Legrand J. Systemic exposure to parabens: Pharmacokinetics, tissue distribution, excretion balance and plasma metabolites of [¹⁴C]-methyl-, propyl- and butylparaben in rats after oral, topical or subcutaneous administration. *Food Chem Toxicol.* 2012 Mar; 50(3-4): 445-54.
- (2) Fransway AF. The problem of preservation in the 1990s. Agents with preservative function independent of formaldehyde release. *Am J Contact Dermat.* 1991 Sept; 2(3): 145-74.
- (3) Soni MG, Taylor SL, Greenberg N, Burdock GA. Evaluation of the health aspects of methyl paraben: a review of the published literature. *Food Chem Toxicol.* 2002 Oct; 40(10): 1335-73.
- (4) Oliveira TA, Paixão FG, Prestes PS, Campos MP, Polacow MLO, Leonardi GR, et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de sistemas nanoestruturados. *Lat Am J Pharm.* 2007 Out; 26(6): 878-82.
- (5) Farmacopéia Brasileira 5ª ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília: 2010. 523 p.
- (6) Tavares AT, Pedriali CA. Relação do uso de parabenos em cosméticos e sua ação estrogênica na indução do câncer no tecido mamário. *Rev Mult Saúde.* 2011; 6: 61-4.

- (7) Chiari BG, Magnani C, Salgado HRN, Corrêa M, Isaac VLB. Estudo da segurança de cosméticos: presente e futuro. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.* 2012; 33(3): 323-30.
- (8) Gad CS. Recent developments in replacing, reducing, and refining animal use in toxicologic research and testing. *Fundam Appl Toxicol.* 1990 July; 15(1): 8-16.
- (9) Marona HRN, Lucchesi MBB. Protocol to refine intestinal motility test in mice. *Lab Anim.* 2004 July; 38(3): 257-60.
- (10) Marona HRN, Lucchesi MBB. Refining the intestinal motility test in mice to reduce animal stress. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.* 2003; 24(1): 79-82.
- (11) Pinto T, Kaneko TM, Pinto AF. Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos. 4. ed. Barueri: Manole; 2015. 416 p.
- (12) Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos. Brasília: ANVISA; 2012. p. 10-49.
- (13) Peyrefitte G, Martini FC, Chivot M. *Estética Cosmética: cosmetologia, biologia geral, biologia da pele.* 1. ed. São Paulo: Andrei; 1998. 322 p.
- (14) Schmaltz C, Santos JV, Guterres SS. Nanocapsulas como uma tendência promissora na área cosmética: A imensa potencialidade deste pequeno grande recurso. *Infarma.* 2005;16(13-14): 80-5.

(15) Brasil. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 79, de 31 de agosto de 2000. Definição de cosméticos e classificação de produtos [Internet]. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. 2000 ago 28 [acesso em 2017 jan 9]. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/anvisalegis/resol/2000/79_2000.pdf.

(16) Siegert W. Comparison of microbial challenge testing methods for cosmetics. H and PC Today. 2013; 8(2): 32-9.

(17) Apolinário AC, Silva PCD, Araújo GMF, Pedrosa MO, Pachú AC, Silva PCD, et al. Uso de cosméticos por mulheres do município de Esperança, Paraíba, Brasil. Rev Ciênc Farm Básica Apl. 2013; 34(3): 395-99.

(18) Apolinário AC, Souza MSR, Silva PCD, Pedrosa MO, Pachú CO. Investigação de possíveis riscos à saúde advindos da utilização de cosméticos. Rev Bras Farm. 2011 Set; 92(4): 323-26.

(19) Agência nacional de vigilância sanitária. Classificação de Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes. [Internet]. Brasil: Brasília. [acesso em 2016 set 23]. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/conceitos-e-definicoes>.

(20) Associação Brasileira das Indústrias de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos. Panorama do Setor 2017. [Internet]. [acesso em 2017 out 5]. Disponível em: <https://abihpec.org.br/publicacao/panorama-do-setor-2017>.

(21) Fernandes JPS, Savino G, Amarante ACG, Sousa MR, Silva GR, Cianciulli ME, et al. Estudo da relação entre estrutura e atividade de parabenos: uma aula prática. *Quím. Nova*. 2013 Mar; 36(6): 890-93.

(22) Carvalho CM, Menezes PFC, Letenski GC, Praes CEO, Feferman IHS, Lorencini M. *In vitro* induction of apoptosis, necrosis and genotoxicity by cosmetic preservatives: application of flow cytometry as a complementary analysis by NRU. *Int J Cosmet Sci*. 2012 Apr; 34(2):176-82.

(23) Brasil. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 29, de 1 junho de 2012. “Lista de Substâncias de Ação Conservante permitidas para Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes” [Internet]. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. 2012 jun 4 [acesso em 2017 jan 9]. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3285739/RDC_29_2012_.pdf/c74fbb1a-c98b-4899-81ae-7ad9e18d807e.

(24) Berthet A, Spring P, Vernez D, Plateel G, Hopf NB. *Ex vivo* human skin permeation of methylchloroisothiazolinone (MCI) and Methylisothiazolinone (MI). *Arch Toxicol*. 2017 Nov;91(11): 3529-3542.

(25) Shabir GA, Bradshaw TK, Shar GQ, Arain A. Development and Validation of a RPLC Method for the Determination of 2-Phenoxyethanol in Senselle Lubricant Formulation. *Indian J Pharm Sci*. 2010 May-June; 72(3): 312–17.

(26) Ma W, Zhao X, Lin ZY, Mohammed MO, Zhang ZF, Liu LY, Song WW, Li YF. A survey of parabens in commercial pharmaceuticals from China and its implications for human exposure. *Environ Int.* 2016 Oct; 95: 30-5.

(27) Oishi S. Effects of propyl paraben on the male reproductive system. *Food Chem Toxicol.* 2002 Dec; 40(12): 1807-13.

(28) Soni MG, Carabin IG, Burdock GA. Safety assessment of esters of hydroxybenzoic acid (parabens). *Food Chem Toxicol.* 2005 July; 43(7): 985-1015.

(29) Darbre PD, Harvey PW. 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. *J Appl Toxicol.* 2014 Sept; 34(9): 925-38.

(30) Sasseville D, Alfalah M, Lacroix JP. "Parabenoia" Debunked, or "Who's Afraid of Parabens?". *Dermatitis.* 2015 Nov-Dec; 26(6): 254-9.

(31) Rodas M, Portugal LA, Avivar J, Estela JM, Cerdà V. Parabens determination in cosmetic and personal care products exploiting a multi-syringe chromatographic (MSC) system and chemiluminescent detection. *Talanta.* 2015 Oct; 143: 254–62.

(32) Tahan GP, Santos NKS, Martins ACAI. Determination of parabens in serum by liquid chromatography tandem mass spectrometry: Correlation with lipstick use. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2016 Aug; 79: 42-48.

(33) Darbre PD, Harvey PW. Paraben esters: review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks. *J Appl Toxicol*. 2008 July; 28(5): 561-78.

(34) Darbre PD, Aljarrah A, Miller WR, Goldham NG, Sauer MJ. Concentrations of parabens in human breast tumours. *J Appl Toxicol*. 2004 Jan-Feb; 24(1): 5-13.

(35) Kodani SD, Overby HB, Morisseau C, Chen J, Zhao L, Hammock BD. Parabens inhibit fatty acid amide hydrolase: A potential role in paraben-enhanced 3T3-L1 adipocyte differentiation. *Toxicol Lett*. 2016 Nov; 262: 92-99.

(36) Roper CS, Howes D, Blain PG, Williams FM. Percutaneous Penetration of 2-Phenoxyethanol through Rat and Human Skin. *Food Chem Toxicol*. 1997 Oct-Nov; 35(10-11): 1009-16.

(37) Anselmi C, Ettore A, Andreassi M, Centini M, Neri P, Di Stefano A. *In vitro* induction of apoptosis vs. necrosis by widely used preservatives: 2-phenoxyethanol, a mixture of isothiazolinones, imidazolidinyl urea and 1,2-pentanediol. *Biochem Pharmacol*. 2002 Feb 1; 63(3): 437-53.

(38) Lilienblum W. Opinion of the Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS) e final version of the opinion on Phenoxyethanol in cosmetic products. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2016 Dec; 82: 156.

(39) Scognamiglio J, Jones L, Letizia CS, Api AM. Fragrance material review on 2-phenoxyethanol. *Food Chem Toxicol*. 2012 Sept; 50 Suppl 2: S244-55

(40) Lundov MD, Zachariae C, Johansen JD. Methylisothiazolinone contact allergy and dose–response relationships. *Contact Dermatitis*. 2011 June; 64(6): 330-6.

(41) Groot AC, Bruynzeel DP, Bos JD, Van Der Meeren HL, Van Joost T, Jagtman BA, Weyland JW. The Allergens in Cosmetics. *Arch Dermatol*. 1988 Oct; 124(10): 1525-9.

(42) Laguna C, Cuandra J, Martín-González B, Zaragoza V, Martínez-Casimiro L, Alegre V. Dermatitis alérgica de contacto por cosméticos. *Actas Dermosifiliogr*. 2009; 100(1): 53-60.

(43) Rogero SO, Lugão AB, Ikeda TI, Cruz AS. Teste *in vitro* de Citotoxicidade: Estudo comparativo entre duas metodologias. *Mat. Res*. 2003 Abr-Jun; 6(3): 317-20.

(44) Caldeira JP. A proibição de testes em animais para cosméticos na União Europeia. [Internet]. 2013. [acesso em 2017 nov 5]. Disponível em: <https://jornalggn.com.br/noticia/a-proibicao-de-testes-em-animais-para-cosmeticos-na-uniao-europeia>.

(45) Izar R. Projeto de Lei da Câmara nº 70. [Internet]. 2014. [acesso em 2017 nov 5]. Disponível em: <https://www25.senado.leg.br/web/atividade/materias/-/materia/118217>.

(46) Eskes C, Sá-Rocha Vde M, Nunes J, Presgrave O, Carvalho D, Masson P, et al. Proposal for a Brazilian Centre on Alternative Test Methods. *Altex*. 2009; 26(4): 303-6.

(47) Presgrave O, Eskes C, Presgrave R, Alves E, Freitas JC, Caldeira C, et al. A Proposal to Establish a Brazilian Center for Validation of Alternative Methods (BraCVAM). *Altex*. 2010; 27: 47-51.

(48) Presgrave O. The Need for the Establishment of a Brazilian Centre for the Validation of Alternative Methods (BraCVAM). *Altern Lab Anim*. 2008 Dec; 36(6): 705-8.

(49) Brasil. Extrato de acordo de cooperação técnica, nº 1 de 17 de janeiro de 2012. [Internet]. 2012. [acesso em 2017 ago 5]. Disponível em: <https://juslaboris.tst.jus.br/handle/1939/56181>.

(50) Brasil. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Portaria .nº 491 de 3 de julho de 2012. Institui a Rede Nacional de Métodos Alternativos – Renama. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. 2012 jul. 3; Seção 1. p 19.

(51) Brasil. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. Portaria nº 3.586, de 30 de junho de 2017. Renova a Rede Nacional de Métodos Alternativos - Renama e dá outras providências. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. 2017a jun 30; Sessão 1. p 8.

(52) Brasil. Ciência e Tecnologia. Conceia reconhece 17 métodos alternativos ao uso de animais. [Internet]. 2014 set 3. [acesso em 2017 ago 10]. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/ciencia-e-tecnologia/2014/09/conceia-reconhece-17-metodos-alternativos-ao-uso-de-animais>.

(53) Draize JH, Wooddard G, Calvery HO. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. J Pharmacol Exp Ther. 1944; 82: 377-90.

(54) OECD 427. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Skin absorption: *in vivo* method. [Internet] 13 abr 2004. [acesso em 2017 jul 15]. Disponível em: http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-427-skin-absorption-in-vivo-method_9789264071063-en.

(55) ICCVAM. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods. Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) Test Method. [Internet]. 2010. [acesso em 2017 nov 5]. Disponível em: <https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/protocols/ivocular-hetcam.pdf>.

(56) OECD 437. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants. [Internet]. 2009 set 8. [acesso em 2017 nov 5]. Disponível em: http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-437-bovine-corneal-opacity-and-permeability-test-method-for-identifying-ocular-corrosives-and-severe-irritants_9789264076303-en.

(57) Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983 Dec 16; 65(1-2): 55-63.

(58) OECD 432. OECD Guideline for Testing of Chemicals. *In Vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test. [Internet]. 2004 nov 23. [acesso em 2017 ago 8. Disponível em: http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-432-in-vitro-3t3-nru-phototoxicity-test_9789264071162-en.

(59) OECD 428. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Skin Absorption: *In Vitro* Method. [Internet]. 2004 nov 23. [acesso em 2017 mar 8]. Disponível em: http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-428-skin-absorption-in-vitro-method_9789264071087-en.

(60) Zhang Y, Wu LJ, Tashiro S, Onodera S, Ikejima T. Evadiamine induces tumor cell death through different pathways: apoptosis and necrosis. *Acta Pharmacol Sin*. 2004 Jan; 25(1): 83-9.

(61) Chiari BG, Trovatti E, Pecoraro E, Corrêa MA, Cicarelli RMB, Ribeiro SJL et al. Synergistic effect of green coffee oil and synthetic sunscreen for health care application. *Ind Crops Prod*. 2014 Jan; 52: 389–93.

(62) Luepke NP. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. *Food Chem Toxicol*. 1985 Feb; 23(2): 287-91.

(63) Maruno M. Desenvolvimento de nanoemulsões à base de óleo de gergelim aditivadas de óleo de framboesa para queimaduras da pele. [Tese]. Ribeirão Preto: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo; 2009. 158 f.

(64) McKenzie B, Kay G, Matthews KH, Knott RM, Cairns D. The hen's egg chorioallantoic membrane (HET-CAM) test to predict the ophthalmic irritation potential of a cysteamine-containing gel: Quantification using Photoshop® and ImageJ. *Int J Pharm.* 2015 July 25; 490(1-2): 1-8.

(65) Bernardi DS. Desenvolvimento de nanoemulsão de óleo de arroz como adjuvante no tratamento de dermatite atópica e psoríase. [Dissertação]. Ribeirão Preto: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo; 2011. 124 f.

(66) Hernandez M, Mercier-Fresnel MM. Manual de cosmetologia. 3. ed. Rio de Janeiro: Revinter; 1999. 228 p.

(67) Prunieras M. Manual de cosmetologia dermatológica. 2. ed. São Paulo: Editora Andrej; 1994. 212 p.

(68) 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. *J Immunol.* 1987 Dec 15; 139(12): 4122-8.

(69) Wilkening S, Stahl F, Bader A. Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2 with regard to their biotransformation properties. *Drug Metab Dispos.* 2003 Aug; 31(8): 1035-42.

(70) Martins LEAM, Reis VMS. Imunopatologia da dermatite de contato alérgica. *An Bras Dermatol.* 2011 jun; 86(3): 419-33.

(71) Oishi, S. Effects of butylparaben on the male reproductive system in mice. *Arch Toxicol.* 2002 July; 76(7): 423-9.

(72) Oishi, S. Effects of butylparaben on the male reproductive system in rats. *Toxicol Ind Health.* 2001 Feb; 17(1): 31-9.

(73) Oishi, S. Lack of spermatotoxic effects of methyl and ethyl esters of p-hydroxybenzoic acid in rats. *Food Chem Toxicol.* 2004 Nov;42(11):1845-9.

(74) Janjua NR, Mortensen GK, Andersson AM, Kongshoj B, Skakkebaek NE, Wulf HC. Systemic uptake of diethyl phthalate, dibutyl phthalate and butyl paraben following whole-body topical application and reproductive and thyroid hormone levels in humans. *Environ Sci Technol.* 2007 Aug 1; 41(15): 5564-70.

(75) Byford JR, Shaw LE, Drew MG, Pope GS, Sauer MJ, Darbre PD. Oestrogenic activity of parabens in MCF7 human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2002 Jan; 80(1):49-60.

(76) Darbre PD, Byford JR, Shaw LE, Horton RA, Pope GS, Sauer MJ. Oestrogenic activity of isobutylparaben *in vitro* and *in vivo*. J Appl Toxicol. 2002 July-Aug; 22(4): 219-26.

(77) Darbre PD, Byford JR, Shaw LE, Hall S, Coldham NG, Pope GS, Sauer MJ. Oestrogenic activity of benzylparaben. J Appl Toxicol. 2003 Jan-Feb; 23(1): 43-51.

(78) Okubo T, Yokoyama Y, Kano K, Kano I. ER-dependent estrogenic activity of parabens assessed by proliferation of human breast cancer MCF-7 cells and expression of ER alpha and PR. Food Chem Toxicol. 2001 Dec; 39(12):1225-32.

(79) Cazedey ECL., Carvalho FC, Fiorentino FAM, Gremião MPD, Salgado HRN. Corrositex®, BCOP and HET-CAM as alternative methods to animal experimentation. Braz. J. Pharm. Sci. 2009 Oct-Dec; 45(4): 759-66.

(80) Murillo G, Perez U, Tur E, Vinardell MP, García G, Pascual JR. Estudio comparativo de três variantes Del ensayo de la membrana corioalantoidea Del huevo de La Galina para la evaluación de la irritación ocular. Rev. Toxicol. 2003; 20(3): 187-192.

(81) Vinardell MP, García L. The quantitative chorioallantoic membrane test using trypan blue stain to predict the eye irritancy of liquid scintillation cocktails. Toxicol *In Vitro*. 2000 Dec; 14(6): 551-5.

(82) Derouiche MTT, Abdennour S. HET-CAM test. Application to shampoos in developing countries. *Toxicol In Vitro*. 2017 Dec; 45(Pt 3): 393-396.

(83) Eiras F, Amaral MH, Silva R, Martins E, Lobo JMS, Silva AC. Characterization and biocompatibility evaluation of cutaneous formulations containing lipid nanoparticles. *Int J Pharm*. 2017 Mar 15; 519(1-2): 373-380.

(84) Mehling A, Kleber M, Hensen H. Comparative studies on the ocular and dermal irritation potential of surfactants. *Food Chem Toxicol*. 2007 May; 45(5): 747-58.

(85) 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). *Regul Toxicol Pharmacol*. 2011 Apr; 59(3): 471-92.

(86) Scott L, Eskes C, Hoffmann S, Adriaens E, Alepée N, Bufo MA, et al. A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace *in vivo* studies using Bottom-Up and Top-Down approaches. *Toxicol In Vitro*. 2010 Feb; 24(1): 1-9.

(87) Wilson TD, Steck WF. A modified HET-CAM assay approach to the assessment of anti-irritant properties of plant extracts. *Food Chem Toxicol*. 2000 Oct; 38(10): 867-72.