

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”

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

-
- C824a** Corrêa, Gabriela de Oliveira Prado.
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.



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 (Participação Virtual)
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

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

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

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

Profa. Dra. REGINA MARIA BARRETTO CICARELLI (Participação 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 Prof^a Dr^a **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 Dr^a **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.



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



viii

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	25
1.1.1. Cenário atual do mercado cosmético	25
1.1.2. Definição e classificação de produtos cosméticos.....	26
1.1.3. Segurança microbiológica de produtos cosméticos.....	27
1.1.4. Legislações vigentes para conservantes	30
1.1.5. Propilparabeno e Metilparabeno.....	32
1.1.6. Fenoxietanol	34
1.1.7. Metilcloroisotiazolinona e metilisotiazolinona	36
1.1.8. DMDM hidantoína e imidazolidinil ureia.....	37
1.1.9. Dehidroacetato de sódio.....	39
1.1.10. Álcool benzílico.....	40
1.1.11. Cloreto de benzalcônio	41
1.1.12. Caprilil glicol.....	42
1.1.13. Benzoato de sódio.....	43
1.1.14. Etilhexilglicerina	43

1.1.15. Avaliação de segurança de matérias primas cosméticas	44
1.1.16. Métodos alternativos ao uso de animais.....	47
1.1.17. Metodologias <i>in vitro</i>	50
1.1.18. Metodologias <i>in silico</i>	59
2. OBJETIVOS	63
2.1. Objetivo geral.....	63
2.2. Objetivos específicos	63
3. MATERIAL E MÉTODOS	64
3.1. Material	64
3.1.1. Amostras	64
3.1.2. Material para rotina celular	64
3.1.3. Reagentes	64
3.1.4. Equipamentos.....	64
3.2. Métodos	65
3.2.1. Avaliação <i>in vitro</i>	65
3.2.1.1. Ensaio de exclusão do corante azul de tripano.....	65
3.2.1.2. Avaliação da citotoxicidade por meio das metodologias que utilizam os corantes vitais MTT e NR.....	66
3.2.1.3. Avaliação de dano ocular (Short Time Exposure – STE)	71
3.2.2. Avaliação <i>in silico</i>	76
3.2.3. Avaliação do perigo	81
3.2.4. Avaliação da exposição e caracterização do risco	83
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	84
4.1. Avaliação <i>in vitro</i>	84
4.1.1. Avaliação da citotoxicidade por meio das metodologias que utilizam os corantes vitais MTT e NR.	84
4.1.2. Avaliação de dano ocular (<i>Short Time Exposure</i> – STE).....	99
4.2. Avaliação <i>in silico</i>	104



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de Araraquara



4.3. Avaliação do perigo.....	114
4.4. Avaliação da exposição e caracterização do risco.....	119
5. CONCLUSÃO.....	123
6. REFERÊNCIAS.....	124

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 citotoxicidade 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	46
Figura 2. Cronograma de mudanças no Regulamento Europeu referentes aos testes em animais (Regulamento CE N. 1223/2009)	48
Figura 3. Desenho experimental para o ensaio de citotoxicidade MTT/NR	69
Figura 4. Desenho experimental para o ensaio de dano ocular STE	73
Figura 5. Curvas de viabilidade celular (Metodologia com o corante MTT)	89
Figura 6. Curvas de viabilidade celular (Metodologia com o corante NR)	91
Figura 7. Placa de 96 poços utilizada na avaliação da citotoxicidade por meio da metodologia com o corante MTT	94
Figura 8. Placa de 96 poços utilizada na avaliação da citotoxicidade dos conservantes por meio da metodologia com o corante NR	95
Figura 9. Células HaCaT e HDFa	96
Figura 10. Célula HepG2	97
Figura 11. Célula SIRC	101
Figura 12. <i>Layout do software VEGA HUB</i>	105
Figura 13. <i>Layout do software OECD QSAR toolbox</i>	106
Figura 14. Exemplo de análise realizada no PRED-SKIN	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Conservantes e concentrações utilizadas nos ensaios.....	67
Tabela 2. Parâmetros de avaliação do perigo.....	82
Tabela 3. Valores percentuais de IC ₅₀ (m/v) obtidos nos ensaios de citotoxicidade por meio da metodologia com o corante MTT	85
Tabela 4. Valores percentuais de IC ₅₀ (m/v) obtidos nos ensaios de citotoxicidade por meio da metodologia com o corante NR	86
Tabela 5. Valores percentuais de IC ₃₀ (m/v) obtidos nos ensaios de citotoxicidade por meio da metodologia com o corante MTT	87
Tabela 6. Valores percentuais de IC ₃₀ % (m/v) obtidos nos ensaios de citotoxicidade por meio da metodologia com o corante NR	88
Tabela 7. Classificação dos conservantes pela metodologia STE.....	99
Tabela 8. Resultados das predições <i>in silico</i> para os desfechos de irritação da pele, sensibilização da pele e fototoxicidade.....	109
Tabela 9. Resultados das predições <i>in silico</i> para o desfecho de irritação ocular	110
Tabela 10. Resultados das predições <i>in silico</i> para o desfecho de toxicidade oral aguda	111
Tabela 11. Resultados das predições <i>in silico</i> para o desfecho de atividade endócrina.....	112
Tabela 12. Resultados das predições <i>in silico</i> para os desfechos de carcinogenicidade, mutagenicidade e genotoxicidade	113
Tabela 13. Avaliação de perigo.....	115
Tabela 14. Avaliação da exposição	120

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Lista de conservantes antimicrobianos utilizados	31
Quadro 2. Informações químicas do propilparabeno e metilparabeno	33
Quadro 3. Informações químicas do fenoxietanol	35
Quadro 4. Informações químicas de metilcloroisotiazolinona e metilisotiazolinona	37
Quadro 5. Informações químicas de DMDM hidantoína e imidazolidinil ureia. 38	
Quadro 6. Informações químicas do dehidroacetato de sódio.....	39
Quadro 7. Informações químicas do álcool benzílico	40
Quadro 8. Informações químicas do cloreto de benzalcônio	41
Quadro 9. Informações químicas do caprilil glicol	42
Quadro 10. Informações químicas do benzoato de sódio	43
Quadro 11. Informações químicas da etilhexilglicerina	44
Quadro 12. Métodos alternativos aceitos pelo CONCEA (RN nº 18 e 31).....	49
Quadro 13. Classificação das substâncias-teste pela metodologia STE	76
Quadro 14. Notação química SMILES.....	77
Quadro 15. <i>Softwares</i> e modelos preditivos utilizados nas análises <i>in silico</i> ..	79

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Cálculo de viabilidade celular com corante azul de tripano	65
Equação 2. Cálculo da porcentagem de células mortas para os ensaios MTT/NRU	71
Equação 3. Cálculo da porcentagem de células vivas para os ensaios MTT/NRU	71
Equação 4. Cálculo da viabilidade celular (%) para o ensaio STE	74
Equação 5. Cálculo da SED para avaliação da exposição sistêmica	83
Equação 6. Cálculo da MoS para avaliação da exposição sistêmica	83

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

CO₂: 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*

IC₃₀: Concentração que inibe 30% da viabilidade celular

IC₅₀: 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.

1.1. Revisão da literatura

1.1.1. Cenário atual do mercado cosmético

Enquanto o PIB do Brasil retraiu 4,1% em 2020 – maior queda desde que foi iniciada a série histórica do IBGE em 1996 – e a indústria tenha recuado 3,5%, as vendas de produtos de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (HPPC), mesmo sob os impactos da pandemia do coronavírus (COVID-19), mantiveram a tendência de alta registrada em 2019 (3,9%) e fecharam 2020 com crescimento de 4,7%, atingindo cerca de 122 bilhões de reais, de acordo com a *Euromonitor International* (MENDONÇA, 2021).

A Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (ABIHPEC), divulgou, recentemente, os dados do mercado de HPPC referentes a 2020, nos quais o Brasil manteve a quarta posição no *ranking* mundial e, juntamente com a China, que aparece na segunda posição, foram os únicos países que tiveram resultado positivo, nas vendas em 2020, entre os cinco maiores mercados globais (1º Estados Unidos, 3º Japão e 5º Alemanha). As categorias de produtos, que apresentaram maior alta nas vendas, foram os produtos para banho (+18,5%), *skin care* (13,6%) e fragrâncias (+6,1%). Já em maquiagem, o Brasil acompanhou o movimento global e registrou queda de 6% nas vendas, passando de 10 bilhões para cerca de 9 bilhões de reais (ABIHPEC, 2021; MENDONÇA, 2021).

O mercado global de conservantes cosméticos ultrapassou US\$ 930 milhões de dólares em 2020 e estima-se uma taxa de crescimento anual composta (CAGR) de 7,85% entre 2021 e 2027. O aumento no consumo de

cosméticos, incluindo cremes faciais e produtos *hair care*, devem impulsionar o crescimento do mercado. Conservantes naturais e orgânicos estão ganhando força e estima-se uma CAGR (2020-26) em torno de 7% e, para os conservantes sintéticos, o aumento esperado é de 6% (AHUJA; SINGH, 2020).

1.1.2. Definição e classificação de produtos cosméticos

As palavras gregas *Kosmos* e *Kosmein* deram origem à palavra cosmético, cujo significado está relacionado com organizar, arrumar, enfeitar e adornar. As preparações cosméticas são enquadradas em quatro categorias de produtos: preparações para higiene, perfumes, cosméticos e preparações para uso infantil (CORRÊA, 2012).

Segundo a RDC 211 de 14 de julho de 2005, os produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfume são classificados como preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo, nas diversas partes do corpo humano, pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membranas mucosas da cavidade oral, com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência e ou corrigir odores corporais e ou protegê-los ou mantê-los em bom estado (ANVISA, 2015a).

Os produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes são classificados em duas categorias, graus 1 e 2, em função da probabilidade de ocorrência de efeitos não desejados, devido ao uso inadequado do produto, sua formulação, finalidade de uso, áreas do corpo a que se destinam e cuidados a serem observados, quando de sua utilização:

- Grau 1: caracterizam-se por possuir propriedades básicas ou elementares, cuja comprovação não seja inicialmente necessária e não requerem informações detalhadas quanto ao seu modo de usar e suas restrições de uso, devido às características intrínsecas do produto (ANVISA, 2015a);
- Grau 2: possuem indicações específicas, cujas características exigem comprovação de segurança e/ou eficácia, bem como informações e cuidados, modo e restrições de uso (ANVISA, 2015a).

1.1.3. Segurança microbiológica de produtos cosméticos

Em geral, as alterações nas formulações de cosméticos são devido ao aumento da presença de microrganismos ou podem ser resultantes da exposição ao oxigênio atmosférico. Para evitar esses efeitos, dois grupos distintos de substâncias podem ser utilizadas, sendo elas os conservantes antimicrobianos, que atuam nos microrganismos e os antioxidantes, capazes de suprimir os fenômenos de oxidação e a formação de radicais livres (HALLA et al., 2018). Existem, ainda, os ingredientes sequestrantes, matérias primas que apresentam a capacidade de complexar íons metálicos e alcalinos terrosos, os quais causam danos às formulações cosméticas, pois podem precipitar tensoativos e promover a oxidação de componentes graxos insaturados (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

De acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada, RDC 528/2021, os conservantes antimicrobianos são substâncias adicionadas como ingredientes aos produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes com a finalidade de inibir o crescimento de microrganismos durante sua fabricação e estocagem, ou para proteger os produtos da contaminação inadvertida, durante o uso (ANVISA, 2021).

O uso inadequado de conservantes, em uma concentração menor do que a adequada, pode levar à deterioração do produto; por outro lado, o uso excessivo pode aumentar o risco de reações adversas. A exposição cutânea a substâncias químicas pode levar a uma ampla variedade de reações, como dermatite de contato irritante, sensibilização, alterações na pigmentação da pele e acne. Aproximadamente 6% da população é sensibilizada pelos ingredientes dos cosméticos, especialmente conservantes e composições aromáticas, e a principal causa de inflamação não imunológica da pele é a exposição a substâncias irritantes (HALLA et al., 2018; HERMAN, 2019; PASTOR-NIETO et al., 2017; VAN DE SANDT et al., 1999).

A contaminação dos produtos cosméticos pode acontecer de duas maneiras diferentes: durante o processo de fabricação do produto (contaminação primária) e/ou durante o uso pelo consumidor (contaminação

secundária). É necessário que todas as fontes potenciais de contaminação sejam identificadas e monitoradas. Para isso, quatro etapas devem ser consideradas: i. inspeção e controle de matérias-primas; ii. processo de fabricação; iii. entrega do produto e iv. uso do produto pelo consumidor (HALLA et al., 2018).

Considerando a concentração de agente antimicrobiano a ser utilizado em um cosmético, a depender da ação pretendida, preconizam-se altas concentrações para substâncias ativas em produtos com ação antimicrobiana (ex. sabonete antisséptico), e baixas concentrações para ação conservante. Além dos agentes antimicrobianos para efeitos de preservação do produto, a indústria cosmética aplica outras estratégias, que incluem o controle da atividade de água e do pH e, ainda, o uso de ingredientes multifuncionais (HALLA et al., 2018).

Os microrganismos que mais, frequentemente, contaminam produtos cosméticos são *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca*, *Burkholderia cepacia*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Enterobacter gergoviae* e *Serratia marcescens*, entre outras bactérias, fungos e leveduras. A pele e as mucosas são protegidos contra microrganismos; no entanto, sua presença nesses produtos pode aumentar o risco de infecção microbiana (SCCS, 2016b).

A segurança de produtos cosméticos é, geralmente, determinada a partir do conhecimento da toxicidade dos ingredientes que compõem a formulação (SCCS, 2018; VAN DE SANDT et al., 1999). É necessária a realização de uma bateria de testes, que sejam complementares, de maneira que o conjunto final ofereça um resultado com os mesmos níveis científicos e de informação, em relação aos obtidos com os modelos *in vivo*. Os métodos alternativos devem ser validados, de acordo com os procedimentos internacionais na área de aplicação, para que sejam reconhecidos pelo meio científico e pelos órgãos regulatórios (ANVISA, 2012).

Apesar de os conservantes antimicrobianos serem geralmente utilizados em pequenas concentrações, eles são considerados um dos principais ingredientes cosméticos que causam alergia aos usuários, podendo

desencadear dermatite de contato alérgica (DCA) e irritativa (DCI). Foi demonstrado, ainda, que alguns conservantes são suspeitos de serem disruptores endócrinos. Estudos evidenciaram que algumas cepas bacterianas resistentes a conservantes, isoladas de produtos cosméticos, demonstraram um grau de resistência cruzada com antibióticos (HERMAN, 2019; VARVARESOU et al., 2009). Os consumidores chegam a utilizar em torno de dez produtos por dia e, muitas vezes, mais do que isso, sejam eles cosméticos ou produtos para higiene pessoal. Parece que, praticamente, todos os conservantes usados em formulações cosméticas são considerados “ruins” de algum modo. Às vezes, é, até difícil separar o que é verdade e o que é apelo de *marketing* (DEPA, 2015; STEINBERG, 2016).

Uma abordagem para minimizar os efeitos indesejados, causados pelos conservantes e, utilizada atualmente pela indústria cosmética, é o uso de *boosters*, um tipo de reforço para o sistema conservante ou criar formulações cosméticas autopreserváveis; ou seja, sem conservantes. Os *boosters* de conservantes são definidos como ingredientes cosméticos com propriedades antimicrobianas, que podem reduzir, significativamente, a concentração de conservantes sintéticos usados em produtos cosméticos. Além disso, os *boosters* apresentam não apenas atividade antimicrobiana, mas, também, muitos deles possuem outras propriedades desejáveis e úteis em produtos cosméticos como, por exemplo, hidratante, antioxidante, entre outras. Dentre as matérias primas utilizadas com esse apelo tem-se o caprilil glicol e a etilhexilglicerina, entre outros (HERMAN, 2019).

Ataques contínuos contra a maioria dos conservantes mantiveram os formuladores lutando para encontrar algo que não produzisse a temida alegação de rótulo “*free-of*” ou “*free-from*” conforme exigido pelo *marketing* (STEINBERG, 2016). E, ainda, haverá, nos próximos anos, o impacto da pandemia da COVID-19 no mercado de conservantes, com mais preocupação envolvendo a contaminação microbiológica os consumidores estarão mais dispostos a aceitar esses ingredientes, desde que as marcas forneçam evidências de eficácia e segurança, tanto de uma perspectiva de saúde, quanto ambiental (HENNIGAN, 2020).

O surgimento de novos patógenos, virais ou bacterianos, sempre representou sérios desafios à saúde pública, em todo o mundo. Atualmente, com o aumento dos hábitos de higiene, a escolha dos conservantes também pode ser impactada pelos consumidores optando por produtos seguros (CANAVEZ et al., 2021).

1.1.4. Legislações vigentes para conservantes

No Brasil, os conservantes permitidos para uso em cosméticos e suas respectivas concentrações são regulamentados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e estão dispostos na RDC 528 de 4 de agosto de 2021, publicada e atualizada de acordo com o Regulamento da Comissão Europeia (CE) Nº 1223/2009, que foi atualizado em 2020 (ANVISA, 2021; EUROPEAN UNION, 2009).

O Regulamento da Comissão Europeia (CE) 1223/2009, substituiu a Diretiva 76/768/CEE anterior e harmonizou, de forma exaustiva, as normas aplicáveis aos produtos cosméticos, assegurando um elevado nível de proteção à saúde humana. A conformidade com a regulamentação dos cosméticos é obrigatória para produtos comercializados na União Europeia. As substâncias proibidas estão enumeradas no seu anexo II e as substâncias sujeitas a restrições no anexo III. Além disso, as substâncias que se destinam a ser usadas como corantes, conservantes e filtros para radiações ultravioletas estão enumeradas nos anexos IV, V e VI, respectivamente (EUROPEAN UNION, 2009).

No Quadro 1, estão descritos os conservantes utilizados neste trabalho, seu respectivo número CAS (*Chemical abstracts service*) e as concentrações máximas permitidas de acordo a legislação brasileira (RDC 528/2021) e a europeia (CE 1223/2009).

Quadro 1. Lista de conservantes antimicrobianos utilizados

Conservante	INCI Name	Número CAS	Concentração (%) máxima permitida (RDC 528/2021)	Concentração (%) máxima permitida (CE) N. 1223/2009
Propilparabeno	<i>Propylparaben</i>	94-13-3	0,14-0,80 ¹	0,14-0,80 ¹
Metilparabeno	<i>Methylparaben</i>	99-76-3	0,40-0,80 ²	0,40-0,80 ²
Fenoxietanol	<i>Phenoxyethanol</i>	122-99-6	1,00	1,00
Metilcloroisotiazolinona e metilisotiazolinona	<i>Methylchloroisothiazolinone (and) Methylisothiazolinone</i>	26172-55-4/2682-20-4	0,0015 ³	0,0015 ³
DMDM hidantoína	<i>DMDM Hydantoin</i>	6440-58-0	0,60	0,60
Imidazolidinil ureia	<i>Imidazolidinyl Urea</i>	39236-46-9	0,60	0,60
Dehidroacetato de sódio	<i>Sodium dehydroacetate</i>	4418-26-2	0,60	0,60
Álcool benzílico	<i>Benzyl Alcohol</i>	100-51-6	1,00	1,00
Cloreto de benzalcônio	<i>Benzalkonium Chloride</i>	8001-54-5	0,10 ⁴	0,10 ⁴
Caprilil glicol	<i>Caprylyl Glycol</i>	1117-86-8	1,00 ⁵	1,00 ⁵
Benzoato de sódio	<i>Sodium Benzoate</i>	532-32-1	0,50-2,50 ⁶	0,50-2,50 ⁶
Etilhexilglicerina	<i>Ethylhexylglycerin</i>	70445-33-9	1,00 ⁵	1,00 ⁵

Fonte: (ANVISA, 2021; EUROPEAN UNION, 2009)

¹a) 0,14% (expresso como ácido) para a soma das concentrações individuais; b) 0,8% (expresso como ácido) para a soma das concentrações individuais das substâncias mencionadas na RDC 582/2021 nos itens 11 e 11-A (ácido 4-hidroxibenzóico, seus ésteres de metil, etilo, butilo e propilo, e seus sais) contidos no produto; neste caso a soma das concentrações individuais de butil e propilparabeno e seus sais não devem superar 0,14% (expresso como ácido).²a) 0,4% (expresso como ácido) individual, b) 0,8% (expresso como ácido) para misturas de sais ou ésteres. ³Proibido em produtos sem enxágue. ⁴Evitar contato com os olhos. ⁵Concentração usual para não regulados. ⁶2,5% (expresso como ácido) para produtos que se enxáguem, exceto os produtos para higiene bucal, 1,7% (expresso como ácido) para produtos de higiene bucal, 0,5% (expresso como ácido) para produtos que não se enxáguem.

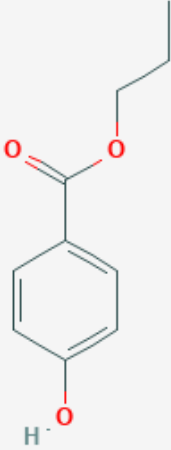
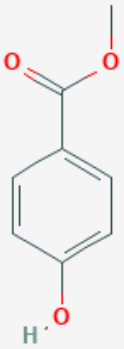
1.1.5. Propilparabeno e Metilparabeno

Os parabenos são ésteres do ácido p-hidroxibenzoico, que exibem atividade efetiva contra bactérias, leveduras e fungos e possuem toxicidade relativamente baixa, em humanos. São utilizados em quase todos os tipos de cosméticos e sua popularidade se deve a inúmeras propriedades benéficas adicionais, como: baixa frequência de sensibilização ou irritação, alta estabilidade química em uma ampla faixa de pH e temperatura, resistência à hidrólise, não causam alterações na consistência ou coloração dos produtos, biodegradabilidade, aceitação regulatória mundial e baixo custo. Também são utilizados em alimentos e produtos farmacêuticos (DARBRE; HARVEY, 2014; MAJEWSKA et al., 2017).

O propilparabeno (PP) e o metilparabeno (MP) (Quadro 2) são os parabenos mais utilizados em alimentos e cosméticos, por causa de sua atividade antimicrobiana de amplo espectro, baixa volatilidade e eficácia em uma ampla gama de pH (TAHAN et al., 2016).

Estudos demonstraram que os parabenos possuem fraca atividade estrogênica. A afinidade de ligação relativa dos parabenos aos receptores intracelulares de estrogênio humano é 10.000 - 1.000.000 de vezes inferior à do 17 β -estradiol, variando de acordo com o comprimento linear da cadeia alquil (benzilparabeno > butilparabeno > propilparabeno = etilparabeno > metilparabeno) (DARBRE; HARVEY, 2008, 2014).

Quadro 2. Informações químicas do propilparabeno e metilparabeno

Propilparabeno	
Estrutura química	
Fórmula molecular	$C_{10}H_{12}O_3$
Peso molecular	180,2 g/mol
Metilparabeno	
Estrutura química	
Fórmula molecular	$C_8H_8O_3$
Peso molecular	152,15 g/mol

Fonte: Pubchem.

1.1.6. Fenoxietanol

O fenoxietanol (FE) (Quadro 3) é um conservante de amplo espectro que possui excelente atividade contra uma ampla variedade de bactérias gram-negativas e gram-positivas, leveduras e fungos. Atua como agente bactericida, aumentando a permeabilidade da membrana celular aos íons potássio e exerce um efeito inibitório direto na síntese microbiana de DNA e RNA. É utilizado em muitas misturas (*blends*) com outros conservantes (DRÉNO et al., 2019a; SHABIR et al., 2010).

Com o decréscimo no uso dos parabenos, FE tem sido o conservante mais utilizado, sozinho ou em combinação com outros conservantes. O Comitê Científico de Segurança do Consumidor (*Scientific Committee on Consumer Safety* - SCCS) considerou a concentração máxima de 1% como segura para uso em produtos cosméticos, inclusive para crianças de todas as idades (DEPA, 2015; LILIENBLUM, 2016).

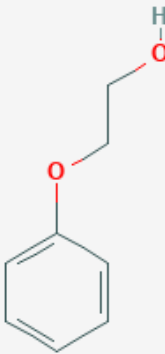
Recentemente, uma revisão de segurança afirmou que o FE é seguro na concentração máxima permitida, um raro agente sensibilizante, sendo considerado como um dos conservantes mais bem tolerados usados em produtos cosméticos, embora alguns estudos realizados em coelhos e roedores tenham demonstrado um potencial de causar irritação leve a moderada; contudo, o fenoxietanol é considerado irritante ocular, devendo ser utilizado com cautela em produtos que possam ter contato com os olhos (DRÉNO et al., 2019a; LILIENBLUM, 2016).

O mercado cosmético europeu vem utilizando, cada vez menos, esse conservante em seus produtos; inclusive, existe uma discordância entre a Agência Nacional Francesa para a Segurança de Medicamentos e Produtos de Saúde (ANSM) e as autoridades europeias sobre o uso seguro de FE, em produtos para bebês. O relatório da ANSM concluiu que a concentração máxima autorizada (atualmente de 1%, de acordo com o regulamento europeu e a ANVISA) de FE, para uso como conservante, deve ser reduzida para 0,4%, em produtos cosméticos para crianças menores de três anos. Além disso, o FE não deve ser usado em produtos cosméticos destinados à área das fraldas. Em

março de 2019, por despacho da Polícia Sanitária, a ANSM exigiu que os fabricantes de cosméticos sem enxágue contendo o conservante FE indicassem no rótulo que esses produtos não fossem utilizados nas nádegas de crianças menores de 3 anos; entretanto, as autoridades europeias seguem com a concentração máxima permitida de 1%, sendo que uma batalha legal parece inevitável (ANSM, 2012, 2019).

Em uma avaliação de segurança, o fenoxietanol e a mistura de fenoxietanol com metilisotiazolinona foram considerados os conservantes mais citotóxicos e com maior potencial de irritação ocular dentre as substâncias avaliadas (CORRÊA et al., no prelo).

Quadro 3. Informações químicas do fenoxietanol

Estrutura química	
Fórmula molecular	C8H10O2
Peso molecular	138.16 g/mol

Fonte: Pubchem.

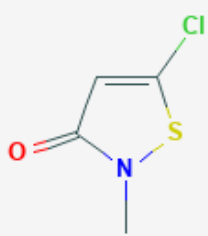
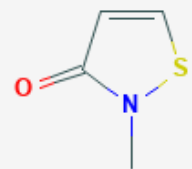
1.1.7. Metilcloroisotiazolinona e metilisotiazolinona

Metilcloroisotiazolinona (CMI) e metilisotiazolinona (MI) (Quadro 4) são utilizadas em uma mistura com proporção 3:1 (CMI/MI) ou MI como substância única. O mecanismo de ação das isotiazolinonas está relacionado com os grupos tiol e amina de suas estruturas químicas. Elas são classificadas como sensibilizadoras da pele, de acordo com o Regulamento (CE) N. 1272/2008 e são conhecidas por causar dermatite de contato alérgica (DCA) (EUROPEAN UNION, 2008; GARCIA-HIDALGO et al., 2018; HALLA et al., 2018; TOWLE et al., 2018).

A UE proibiu, a partir da 16 de abril de 2016, a utilização da mistura CMI/MI em produtos sem enxágue, enquanto equivalente proibição foi aplicada à MI, a partir de 12 de fevereiro de 2017. Para produtos com enxágue, a concentração máxima permitida, de acordo com Anexo V da Diretiva Cosmética Europeia (N. 1223/2009), atualizada em 23 de janeiro de 2020, é de 0,0015% para a mistura CMI/MI e MI. Isso foi aplicado para o Brasil, na recente atualização da lista de substâncias de ação conservante, disposto na RDC 528/2021 (ANVISA, 2021; EUROPEAN UNION, 2009, 2014, 2016).

O emprego desses conservantes vem diminuindo, nos últimos anos, devido ao grande número de artigos publicados correlacionando seu uso com a dermatite de contato alérgica (BERTHET et al., 2017; GARCIA-HIDALGO et al., 2018; GONZÁLEZ-MUÑOZ; CONDE-SALAZAR; VAÑÓ-GALVÁN, 2014; GROOT et al., 1988; LUNDOV; ZACHARIAE; JOHANSEN, 2011; YU; SOOD; TAYLOR, 2016).

Quadro 4. Informações químicas de metilcloroisotiazolinona e metilisotiazolinona

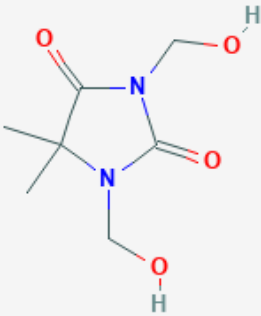
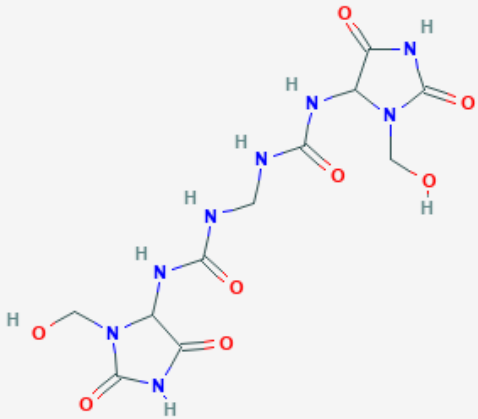
Metilcloroisotiazolinona	
Estrutura química	
Fórmula molecular	C ₄ H ₄ ClNOS
Peso molecular	149,6 g/mol
Metilisotiazolinona	
Estrutura química	
Fórmula molecular	C ₄ H ₅ NOS
Peso molecular	115,16 g/mol

Fonte: Pubchem.

1.1.8. DMDM hidantoína e imidazolidinil ureia

Os conservantes DMDM hidantoína (DMDMH) e imidazolidinil ureia (IMU) (Quadro 5) são conhecidos como conservantes liberadores/doadores de formaldeído. Liberam, lentamente, o formaldeído, por degradação ou por decomposição na formulação. O efeito biocida é devido à reticulação de proteínas, bem como do RNA e DNA (HALLA et al., 2018; LV et al., 2015).

Quadro 5. Informações químicas de DMDM hidantoína e imidazolidinil ureia

DMDM hidantoína	
Estrutura química	
Fórmula molecular	$C_7H_{12}N_2O_4$
Peso molecular	188,18 g/mol
Imidazolidinil ureia	
Estrutura química	
Fórmula molecular	$C_{11}H_{16}N_8O_8$
Peso molecular	388,29 g/mol

Fonte: Pubchem.

A exposição aguda ao formaldeído, pode levar à irritação ou à dermatite de contato alérgica, em várias partes do corpo; além disso, certos tipos de câncer, asma e toxicidade reprodutiva e de desenvolvimento, podem resultar da exposição a esta substância. Estima-se que 40 – 60% das reações adversas a estes conservantes foram causadas por uma reação ao formaldeído (LV et al., 2015). Os liberadores de formaldeído são regulamentados com base em seu conteúdo de liberação de formaldeído. A concentração máxima de uso

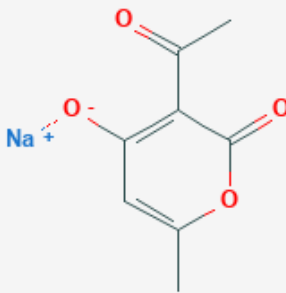
estabelecida para a DMDMH e IMU é de 0,6% de acordo com a RDC 528/2021 e o Anexo V da Diretiva Cosmética Europeia (ANVISA, 2021; EUROPEAN UNION, 2009).

1.1.9. Dehidroacetato de sódio

O dehidroacetato de sódio (SD) (Quadro 6) é o sal de sódio do ácido dehidroacético (DHA). É um conservante utilizado em alimentos e cosméticos para inibir o crescimento de bactérias, fungos e leveduras. A literatura sobre a toxicidade do SD associa seu uso com a dermatite de contato alérgica e danos celulares (CHEN et al., 2018; FOTI et al., 2012, 2016; MILPIED et al., 2011).

Os produtos cosméticos que contêm SD e DHA podem entrar em contato com as áreas da pele, cabelos, mucosa ocular e unhas, com possível exposição acidental à mucosa vaginal durante o uso de produtos para banho. Esses produtos podem ser usados, diariamente ou ocasionalmente, por um período de vários anos. A frequência e duração da aplicação podem resultar em exposição contínua (CIR, 1985).

Quadro 6. Informações químicas do dehidroacetato de sódio

Estrutura química	
Fórmula molecular	C ₈ H ₇ NaO ₄
Peso molecular	190,13 g/mol

Fonte: Pubchem.

De acordo com um estudo realizado em 2014, sobre a frequência do uso de conservantes nos Estados Unidos e Canadá, o SD está entre os 20

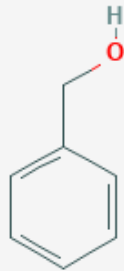
conservantes mais utilizados, e seu uso em formulações cosméticas vem aumento nos últimos anos. Em 2007, o SD estava presente em 866 formulações; em 2010, em 948 e, em 2014, em 2.457 nos Estados Unidos. No Canadá, o SD esteve presente em 6.013 formulações, em 2014 (STEINBERG, 2016).

1.1.10. Álcool benzílico

O álcool benzílico (BA) (Quadro 7) é um álcool aromático usado em uma ampla variedade de formulações cosméticas, como componente de fragrância, conservante, solvente e agente redutor de viscosidade. Em 2013, foi incluído no Anexo V da Diretiva Cosmética Europeia (N. 1223/2009), com a concentração máxima permitida de 1%. Mesmo em baixas concentrações, pode induzir a lise da membrana de microrganismos e, assim, desnaturar a estrutura das proteínas pela ligação a resíduos de aminoácidos (BINDU, 2001; EUROPEAN UNION, 2009; HALLA et al., 2018).

BA é classificado como alérgeno e estima-se que seja responsável por causar de 1,2 a 15% das reações alérgicas em usuários de produtos cosméticos (SCCS, 2011).

Quadro 7. Informações químicas do álcool benzílico

Estrutura química	
Fórmula molecular	C7H8O
Peso molecular	108,14 g/mol

Fonte: Pubchem.

1.1.11. Cloreto de benzalcônio

O cloreto de benzalcônio (BAC) (Quadro 8) é um surfactante catiônico, bactericida, usado como conservante desde 1935, em várias preparações farmacêuticas e cosméticas, em concentrações na faixa de 0,01 a 0,05%. Foi relatado que o BAC produz uma variedade de efeitos adversos em humanos, como dermatite e irritação da pele (CHOI et al., 2018). Em resposta à COVID-19, o aumento expressivo na produção de antissépticos a base de álcool etílico deixou este insumo em falta, no mercado. Deste modo, o BAC começou a ser utilizado no desenvolvimento de antisséptico para as mãos como um substituto do álcool etílico, devido à sua disponibilidade no mercado, apelo de *marketing* para formulação livre de álcool e eficácia contra vírus envelopados (JING et al., 2020).

O painel da *Cosmetic Ingredient Review* (CIR) concluiu que este conservante pode ser utilizado, com segurança, como agente antimicrobiano em concentrações de até 0,1%, mesmo valor estabelecido, até hoje, no anexo V da Diretiva Cosmética Europeia (CIR, 1989; EUROPEAN UNION, 2009), embora o uso do conservante tenha sido associado a reações tóxicas no nariz, olhos, ouvidos e pulmões e poder exacerbar os sintomas da rinite alérgica (GRAF, 1999).

Quadro 8. Informações químicas do cloreto de benzalcônio

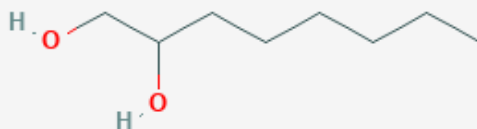
Estrutura química	
Fórmula molecular	C ₁₉ H ₃₄ ClN
Peso molecular	311.9 g/mol

Fonte: *Pubchem*.

1.1.12. Caprilil glicol

O caprilil glicol (CG) (Quadro 9) é um diol linear (C8), e devido ao comprimento da sua cadeia, ele instabiliza e rompe a membrana microbiana. É uma matéria prima multifuncional, com propriedades hidratantes e umectantes. Como umectante, pode influenciar na atividade da água e, consequentemente, na preservação de formulações cosméticas. Devido ao seu caráter anfifílico e tamanho médio, exibe propriedades moduladoras da viscosidade muito interessantes, especialmente em emulsões O/A. Essas funções primárias são complementadas por suas propriedades antimicrobianas podendo, ainda, ser utilizado em sinergia com outros conservantes. A uma concentração de 0,5 - 1,0%, é suficiente para conservar, sozinho, uma variedade de formulações aquosas, sendo utilizado para substituir conservantes mais tradicionais como parabenos, fenoxietanol e isotiazolinonas; contudo, pode causar irritação quando usado em formulações cosméticas em concentração superior a 0,5% (FANG et al., 2016; HERMAN, 2019; VARVARESOU et al., 2009).

Quadro 9. Informações químicas do caprilil glicol

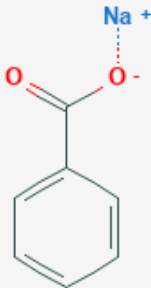
Estrutura química	
Fórmula molecular	C ₈ H ₁₈ O ₂
Peso molecular	146,23 g/mol

Fonte: *Pubchem*.

1.1.13. Benzoato de sódio

O benzoato de sódio (SB) (Quadro 10) é o sal sódico do ácido benzoico. Além do uso como conservante antimicrobiano, também é utilizado como ingrediente de fragrâncias, corretores de pH e/ou solvente, em uma ampla gama de produtos cosméticos com e sem enxágue, além de produtos de higiene bucal. A concentração máxima permitida depende do tipo de produto: 1. Produtos enxaguáveis: 2,5% (expresso como ácido); 2. Produtos para uso bucal: 1,7% (expresso como ácido); 3. Produtos sem enxágue: 0,5% (expresso como ácido). De acordo com a RDC 29/2012, seu uso fica proibido em sistemas pulverizáveis (como aerossóis e *sprays*) quando a concentração for maior que 0,5% (ANVISA, 2021; BINDU, 2001; EUROPEAN UNION, 2009; JOHNSON et al., 2017).

Quadro 10. Informações químicas do benzoato de sódio

Estrutura química	
Fórmula molecular	C ₇ H ₅ O ₂ Na
Peso molecular	144,1 g/mol

Fonte: Pubchem.

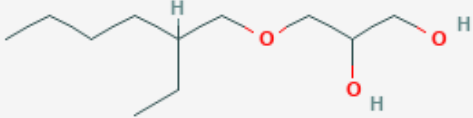
1.1.14. Etilhexilglicerina

A etilhexilglicerina (EEG) (Quadro 11) é uma matéria prima multifuncional, utilizada em produtos cosméticos devido às suas propriedades surfactantes, emolientes, umectantes, solubilizante de perfumes e atividade antimicrobiana. Geralmente, é utilizada na concentração de 1%, junto com outros conservantes sintéticos pois, sozinha, pode não ser capaz de conservar

o produto de maneira eficaz. Não possui classificação de conservante e seu uso não está regulamentado no Anexo V da Diretiva Cosmética Europeia, tampouco na RDC 29/2012 (HERMAN, 2019; LANGSRUD et al., 2016).

O mecanismo de ação antimicrobiano da EEG é baseado em sua estrutura semelhante a um surfactante, afetando a tensão interfacial na membrana celular dos microrganismos, permitindo que o conservante penetre de maneira mais eficaz. Apesar de suas características bastante interessantes para uso em cosméticos, diversos artigos publicados estão correlacionando seu uso com a dermatite de contato alérgica (AERTS; VERHULST; GOOSSENS, 2016; HAGEN; WARSHAW, 2017; HERMAN, 2019; LANGSRUD et al., 2016; MORTZ; OTKJAER; ANDERSEN, 2009; STAUSBØL-GRØN; ANDERSEN, 2007).

Quadro 11. Informações químicas da etilhexilglicerina

Estrutura química	
Fórmula molecular	C ₁₁ H ₂₄ O ₃
Peso molecular	204,31 g/mol

Fonte: Pubchem.

1.1.15. Avaliação de segurança de matérias primas cosméticas

Os testes em animais para ingredientes de uso em produtos cosméticos foram proibidos na União Europeia (UE) em 2009, de acordo com o Regulamento da Comissão Europeia (CE) N. 1223. Dada a indisponibilidade de metodologias alternativas para três desfechos (toxicidade de dose repetida,

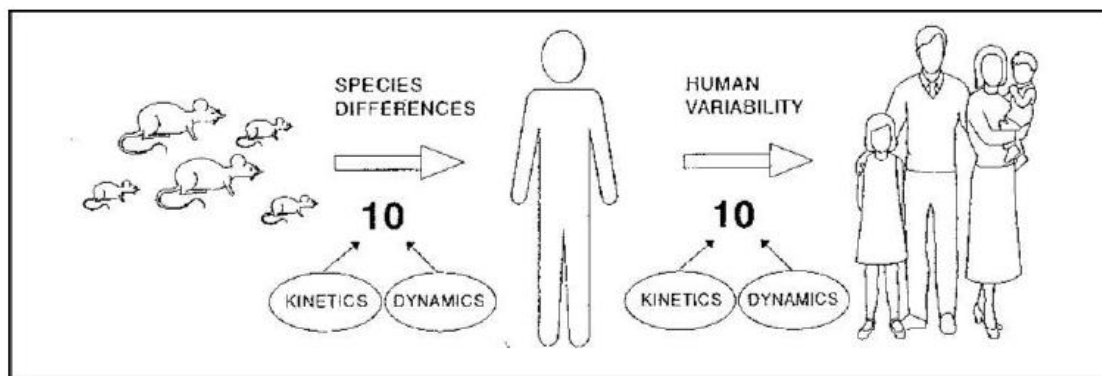
toxicidade reprodutiva e toxicocinética), eles foram excluídos da proibição, até 2013; entretanto, em março de 2013, a proibição dos testes e a comercialização de produtos testados em animais, na EU, cobriu todos os desfechos toxicológicos, independentemente de um conjunto completo de metodologias alternativas estar disponível para substituir os testes em animais correspondentes, trazendo desafios para os pesquisadores e avaliadores de segurança (EUROPEAN UNION, 2009). As principais metodologias alternativas que não utilizam animais e que sejam relevantes para a avaliação de segurança de cosméticos incluem *in vitro*, *in chemico* e *in silico*, além do uso de combinações entre estas ferramentas (SCCS, 2018).

O raciocínio, por trás da segurança dos produtos cosméticos, é baseado em seus ingredientes, devido ao fato de que muitos produtos diferentes são derivados dos mesmos ingredientes; portanto, os testes de toxicidade têm se concentrado nos ingredientes e, particularmente, naqueles que podem reagir com alvos biológicos e, portanto, oferecem um risco potencial para a saúde humana. Esta, também, é a base para as listas de substâncias autorizadas, proibidas e restritas (SCCS, 2018).

Em uma avaliação de segurança, o perigo representa qualquer substância natural ou sintética produzida pelo homem, agente químico, físico ou biológico, que é capaz de causar um resultado adverso à saúde, em certas circunstâncias. Já o risco, é uma estimativa do efeito de um resultado adverso à saúde, quando exposto a um perigo (IARC, 2019). A avaliação de risco é um processo de várias etapas, que inclui: identificação do perigo (uma substância pode levar a um resultado adverso à saúde em qualquer circunstância?); caracterização do perigo (qual é a probabilidade de um resultado adverso à saúde em vários níveis de exposição?); avaliação da exposição (qual é a extensão da exposição de uma substância em uma população?); e, finalmente, a caracterização do risco (a integração da caracterização do perigo e da avaliação da exposição, para estimar o nível de risco de um resultado adverso à saúde, nas populações mais sensíveis) (CHARTRES; BERO; NORRIS, 2019).

O produto cosmético deve ser seguro em condições normais ou razoavelmente previsíveis de uso, o que significa que os ingredientes devem ser incorporados à fórmula do produto em um nível de concentração que possua uma margem de segurança adequada (> 100). O cálculo da margem de segurança (MoS; *Margin of safety*), considera a relação entre o nível (dose) sem efeitos adversos observáveis (NOAEL; *No observed adverse effect level*) e a dose de exposição sistêmica (SED; *Systemic exposure dose*). O valor da MoS permite extrapolar dados, a partir de um grupo de animais de teste, para um ser humano médio e, subsequentemente, de seres humanos médios para subpopulações sensíveis. Geralmente, é aceito um valor padrão de 100 (10×10), como descrito na Figura 1, representando diferenças inter e intra-espécies, e uma MoS de, pelo menos, 100, indica, portanto, que um ingrediente cosmético é considerado seguro para uso (SCCS, 2018).

Figura 1. Representação esquemática da extrapolação do animal para o homem para o cálculo da margem de segurança



Fonte: SCCS, 2018.

A combinação de metodologias *in vitro* e *in silico*, além de aplicável à área cosmética, vem ganhando maior espaço na avaliação de parâmetros toxicológicos. Os dados obtidos são utilizados para a conclusão sobre os perigos dos compostos e a caracterização do risco, incluindo também a avaliação da exposição (GELLATLY; SEWELL, 2019). Adicionalmente, os testes *in vitro* utilizados na avaliação toxicológica possuem limitações para a predição de efeitos relacionados à exposição humana aos compostos, pois esses testes costumam ter, como padrão ouro (comparativo), os ensaios

realizados em animais, ocasionando uma maior dificuldade na transposição dos resultados obtidos.

Assim, dados isolados não configuram uma avaliação de segurança, é preciso avaliar o cenário como um todo e, com tantos dados disponíveis, a utilização de ferramentas que auxiliem o avaliador de segurança, na interpretação e integralização desses dados, são importantes. As abordagens integradas para teste e avaliação (IATA; *Integrated approaches to testing and assessment*) são abordagens estruturadas que integram e analisam diferentes tipos de dados para fins de avaliação de perigos e/ou avaliação de segurança de um produto químico ou grupo de produtos químicos. A IATA é considerada uma abordagem genérica e pode abranger estratégias de teste, tais como considerações de peso de evidência (WoE; *Weight of evidence*), para realizar uma compilação confiável e relevante de conhecimentos destinados a um determinado objetivo regulatório (ÅGERSTRAND; BERONIUS, 2016; TOLLEFSEN et al., 2014).

1.1.16. Métodos alternativos ao uso de animais

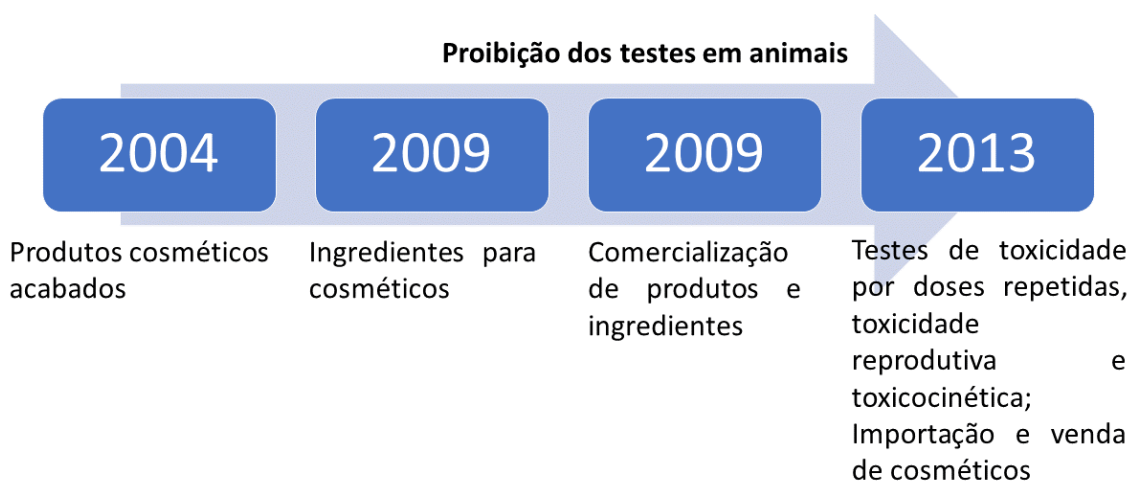
O princípio dos 3Rs, substituição, redução e refinamento (do inglês, *replacement, reduction and refinement*) foi desenvolvido há mais de 60 anos como um marco para a pesquisa sendo, gradativamente, incorporado à legislação mundial, que regulamenta o uso de animais em procedimentos científicos (RUSSEL; BURCH, 1959).

A proibição total do uso de animais para testes de produtos cosméticos, higiene pessoal e perfumes, em 2013, pela União Europeia (Figura 2), foi um marco muito importante, uma vez que houve uma enorme repercussão pelo mundo todo, alertando sobre um tema já discutido há algum tempo (EUROPEAN UNION, 2009).

No âmbito regulatório, está a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento econômico (OECD, *Organisation for Economic Co-operation and Development*), organização intergovernamental que representa mais de 30 países. Assim como a Comissão Europeia, a OECD tem, como objetivo, coordenar e harmonizar políticas, discutir questões de preocupação mútua e

trabalhar juntos para atender e responder problemas internacionais. A Divisão de Meio Ambiente, Saúde e Segurança (EHS, *Environment, Health and Safety*), subdivisão da OECD, é responsável pela publicação de diretrizes para a realização dos ensaios de segurança (EBERLIN et al., 2019).

Figura 2. Cronograma de mudanças no Regulamento Europeu referentes aos testes em animais (Regulamento CE N. 1223/2009)



Fonte: EUROPEAN UNION, 2009.

Nesse contexto, o Brasil assumiu o compromisso com a validação de métodos alternativos e está caminhando em direção ao reconhecimento dos métodos internacionalmente validados, à harmonização e à capacitação dos laboratórios comprometidos com os 3Rs e ao desenvolvimento de um sistema próprio de validação. Esse direcionamento resultou na criação, em julho de 2012, da Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA), pelo Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (MCTIC). Em setembro de 2012, foi criado o Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos (BraCVAM), uma parceria entre o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), e a ANVISA, que representou a primeira parceria estabelecida na América Latina, para validar e coordenar a substituição, a redução ou o refinamento do uso de animais em testes laboratoriais, para avaliação da segurança e eficácia de cosméticos, medicamentos e outras categorias de produtos, que se aplicam a estes ensaios (EBERLIN et al., 2019).

Em 2014, o BraCVAM recomendou o uso de 24 métodos alternativos validados e publicados pela OECD, que foram reconhecidos pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA) e resultaram na publicação das resoluções normativas (RNs) nº 17 (07/07/2014), nº 18 (24/06/2014) e nº 31 (18/08/2016). Em 2019, entraram em vigor 17 métodos contemplados na RN nº 18, para os desfechos de irritação e corrosão da pele, irritação e corrosão ocular, fototoxicidade, permeação cutânea, sensibilização cutânea, toxicidade aguda e genotoxicidade (Quadro 12). Em setembro de 2021, mais 7 métodos alternativos devem entrar em vigor para os desfechos de irritação e corrosão ocular, sensibilização cutânea, toxicidade reprodutiva e contaminação pirogênica (Quadro 12) (CONCEA, 2014a, 2014b, 2016; PRESGRAVE et al., 2016). O reconhecimento desses métodos pela ANVISA foi deliberado pela resolução da diretoria colegiada (RDC) nº 35 de 10 de agosto de 2015, a qual dispõe sobre a aceitação dos métodos alternativos de experimentação animal reconhecidos no Brasil pelo CONCEA (ANVISA, 2015b).

Quadro 12. Métodos alternativos aceitos pelo CONCEA (RN nº 18 e 31)

Desfecho	Método original	Métodos alternativos
Irritação e corrosão da pele	OECD TG 404	OECD TG 430 OECD TG 431 OECD TG 435 OECD TG 439
Irritação e corrosão ocular	OECD TG 405	OECD TG 437 OECD TG 438 OECD TG 460 OECD TG 491* OECD TG 492*
Fototoxicidade	Não se aplica	OECD TG 432
Permeação cutânea	OECD TG 427	OECD TG 428
Sensibilização cutânea	OECD TG 406	OECD TG 429 OECD TG 442A OECD TG 442B OECD TG 442C* OECD TG 442D*
Toxicidade oral aguda	OECD TG 401	OECD TG 129 OECD TG 420 OECD TG 423 OECD TG 425
Genotoxicidade	OECD TG 474	OECD TG 487
Toxicidade reprodutiva	Não se aplica	OECD TG 421* OECD TG 422*

Contaminação pirogênica	Não se aplica	Teste de endotoxina bacteriana*
-------------------------	---------------	---------------------------------

*Entrarão em vigor em setembro de 2021. Fonte: EBERLIN et al., 2019.

Em consonância com o advento dos métodos alternativos no Brasil, em março de 2019, a Academia de Ciências Farmacêuticas do Brasil (ACFB) e a Academia Nacional de Farmácia (ANF), juntamente com a Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial (ABDI), desenvolveram o compêndio "Métodos alternativos ao uso de animais em pesquisa reconhecidos no Brasil", um guia em língua portuguesa, com o objetivo de disseminar os métodos alternativos incorporados pelo país (MORETTO; STEPHANO, 2019).

No Brasil, o projeto de lei da Câmara (PLC) 70/2014, que proíbe testes em animais, de matérias primas e produtos cosméticos; que veda o comércio de produtos que tenham sido testados em animais e que incentiva técnicas alternativas para avaliar a segurança das formulações, encontra-se em tramitação no Plenário do Senado Federal (IZAR, 2020).

O estado de São Paulo, mais adiantado, proibiu o uso de animais para testes em cosméticos. O então governador do Estado, Geraldo Alckmin, sancionou, no dia 23 de janeiro de 2014, o projeto de lei (PL) 777/2013, que proíbe o uso de animais no desenvolvimento de cosméticos, perfumes e produtos de higiene pessoal. Com a sanção, o projeto passou a ser a Lei Estadual 15.316/2014. Outros estados, como Paraná, Rio de Janeiro, Mato Grosso do Sul, Pará, Amazonas e Minas Gerais, também proibiram os testes em animais (ALMG, 2018; CONSTANTINO, 2017).

1.1.17. Metodologias *in vitro*

Devido à evolução técnico-científica, na década de 80 foi iniciado o desenvolvimento de modelos experimentais alternativos para a área cosmética, em substituição ao uso de animais de laboratório (EBERLIN et al., 2019). Muitos dos métodos desenvolvidos já foram validados e outros estão em processo de validação. Ainda, existe a dificuldade da avaliação da reatividade de sistemas mais complexos, demonstrando a importância desse campo, atualmente.

- **Avaliação do potencial de corrosão, irritação e sensibilização da pele**

A corrosão cutânea refere-se à produção de danos irreversíveis na pele que se manifestam como necrose visível através da epiderme e na derme, após a aplicação de uma substância química de teste, como definido pelo Sistema Global de Harmonização de Classificação e Rotulagem de substâncias químicas (GHS; *Globally Harmonised System of Classification, Labelling and Packaging of Chemicals*) das Nações Unidas (ONU) (MORETTO; STEPHANO, 2019; USEPA, 2014).

Dentre as metodologias disponíveis para a avaliação da corrosão cutânea existem três validadas, que permitem a identificação de substâncias e misturas não-corrosivas e corrosivas de acordo com o GHS da ONU:

- OECD TG 430: baseia-se no teste de resistência elétrica transcutânea de pele de rato (TER), que utiliza discos de pele para identificar ingredientes corrosivos por sua capacidade de produzir uma perda de integridade do estrato córneo normal e função de barreira (OECD, 2015a).
- OECD TG 431: faz uso da epiderme humana reconstruída (RhE; *Reconstructed human epidermis*), obtida a partir de queratinócitos epidérmicos não transformados derivados de humanos, que imita de perto as propriedades histológicas, morfológicas, bioquímicas e fisiológicas da epiderme humana a epiderme (OECD, 2019a).
- OECD TG 435: essa metodologia de teste utiliza uma membrana artificial projetada para responder a produtos químicos corrosivos de maneira semelhante à pele de animal *in situ* (OECD, 2015a).

A irritação cutânea refere-se à produção de danos reversíveis na pele, após a aplicação de uma substância química em teste, durante até 4 horas, como definido pelo GHS da ONU. Este desfecho é avaliado por meio da OECD TG 439, um procedimento *in vitro* que pode ser usado para a identificação de perigo de produtos químicos irritantes (substâncias e misturas), de acordo com a categoria 2 do GHS. Nos países membros ou regiões que não adotarem a categoria 3 opcional do GHS (irritantes suaves), esta diretriz também pode ser

usada para identificar substâncias químicas não classificadas. Esta metodologia faz uso da epiderme humana reconstruída, na qual é possível a aplicação de amostras sólidas, líquidas, semissólidas e ceras. A viabilidade celular em modelos de RhE é medida por conversão enzimática do corante vital MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio], em azul de tiazolio (OECD, 2020a).

Existe uma IATA, desenvolvida pelo OECD, para avaliação da corrosão e irritação cutânea. Este documento descreve módulos que agrupam fontes de informação e ferramentas de análise, fornecendo orientações sobre: (i) como integrar e usar dados de teste e não-teste existentes para avaliação dos potenciais de irritação e corrosão cutâneas de substâncias químicas e (ii) propõe uma abordagem integrada, quando são necessários mais testes (OECD, 2014).

Um sensibilizador da pele se refere a uma substância que levará a uma resposta alérgica após contato repetido com a pele, conforme definido pelo GHS.

Existe um consenso sobre os principais eventos biológicos subjacentes à sensibilização da pele. O conhecimento atual dos mecanismos químicos e biológicos associados à sensibilização da pele foi resumido na forma de uma via de resultado adverso (AOP; *Adverse outcome pathway*), começando com o evento molecular inicial até eventos intermediários ao efeito adverso; ou seja, dermatite alérgica de contato. Esta AOP se concentra em produtos químicos que reagem com tiol (como a cisteína) e aminas primárias (como a lisina) (OECD, 2019b). Os quatro eventos chave envolvidos na sensibilização da pele estão descritos a seguir:

- Primeiro evento chave: o evento de iniciação molecular é a ligação covalente de substâncias eletrofílicas a centros nucleofílicos em proteínas da pele. Pode ser abordado usando o *in chemico* ensaio direto de reatividade de peptídeo (DPRA; *Direct peptide reactivity assay*; OECD TG 442C) (OECD, 2020b).
- Segundo evento chave: ocorre nos queratinócitos e inclui respostas inflamatórias, bem como mudanças na expressão gênica associadas a

vias de sinalização celular específicas, como vias dependentes do elemento de resposta a eletrófilos/antioxidantes. Este evento chave pode ser abordado usando os métodos de teste de luciferase ARE-Nrf2 *in vitro* (KeratinoSens™ ou LuSens; OECD TG 442D) (OECD, 2018a).

- Terceiro evento chave: ativação de células dendríticas, normalmente avaliadas pela expressão de marcadores de superfície celular específicos, quimiocinas e citocinas, e pode ser avaliado por meio de três ensaios *in vitro*: (i) teste de ativação de linhagem de célula humana (h-CLAT; *Human cell line activation test*); (ii) teste de ativação da linhagem celular U937 (U-SENS™); (iii) ensaio da Interleucina-9 (*Interleukin-9 Reporter Gene assay* - IL-8 Luc assay), conforme descritos na OECD TG 442E (OECD, 2018b).
- Quarto evento chave: proliferação de células T, que é indiretamente avaliada nos ensaios de linfonodo local (LLNA; *Local lymph node assays*) em murinos, apenas *in vivo*, descritos nas respectivas diretrizes OECD TG 429, 442A e 442B (OECD, 2010a, 2010b, 2018c).

- **Avaliação do potencial de irritação e corrosão ocular**

A irritação ocular é caracterizada pela produção de alterações após a aplicação de uma substância de teste na superfície frontal externa do olho, que é totalmente reversível em 21 dias. Nas lesões oculares graves, existe a presença de lesões nos tecidos do olho, ou deterioração física grave da visão, após a aplicação de uma substância de teste na superfície externa frontal do olho, que não é totalmente reversível em 21 dias (GHS, 2019a).

Existem três categorias de risco para irritação ocular de acordo com o GHS (GHS, 2019a):

- Categoria 1 (UN GHS Cat. 1) – causa sérios danos aos olhos.
- Categoria 2A (UN GHS Cat. 2A) – irritante: totalmente reversível em 21 dias.
- Categoria 2B (UN GHS Cat. 2B) – levemente irritante: se uma substância atende aos critérios de classificação para 2A e tais efeitos

podem ser reversíveis em 7 dias, a substância pode ser classificada como 2B.

- Substâncias químicas que não se enquadrem nas categorias acima são classificados como não categoria (UN GHS Não Cat.).

Atualmente, existem cinco metodologias alternativas validadas pela OECD para identificação de produtos químicos que induzem lesões oculares graves (UN GHS Cat. 1) ou que não requerem classificação para irritação ocular ou lesões oculares graves (UN GHS Não Cat.).

- Metodologia de teste da permeabilidade e opacidade da córnea bovina (BCOP; *Bovine corneal opacity and permeability*; OECD TG 437): utiliza córneas isoladas dos olhos de bovinos abatidos para fins comerciais, evitando, assim, o uso de animais de laboratório (OECD, 2020c).
- Metodologia de teste do olho de galinha isolado (ICE; *Isolated chicken eye*; OECD TG 438): assim como o BCOP, utiliza a córnea de animais abatidos para fins comerciais (OECD, 2018d).
- Metodologia de teste de extravasamento da fluoresceína (OECD TG 460) utilizado para identificação de corrosivos oculares e irritantes severos. Os efeitos tóxicos, após um curto tempo de exposição à substância de teste, são medidos por um aumento na permeabilidade da fluoresceína sódica, através da monocamada epitelial de células *Madin-Darby Canine Kidney* (MDCK) cultivadas em inserções permeáveis. A quantidade de extravasamento de fluoresceína que ocorre é proporcional ao dano induzido por produtos químicos às junções desmossomais (*tight junctions*) e membranas celulares, e pode ser usada para estimar o potencial de toxicidade ocular de uma substância de teste (OECD, 2017).
- Metodologia de teste de exposição a curto prazo (STE; *Short time exposure*; OECD TG 491): no ensaio STE, a amostra é aplicada sobre uma monocamada da célula *Statens Seruminstitut Rabbit Cornea* (SIRC), por 5 minutos e, após esse tempo, a viabilidade celular é mensurada por meio do corante vital MTT (OECD, 2018e).

- Metodologia de teste de epitélio humano semelhante à córnea (RhCE; *Reconstructed human cornea-like epithelium*; OECD TG 492): RhCE mimetiza as propriedades histológicas, morfológicas, bioquímicas e fisiológicas do epitélio córneo humano. A viabilidade celular do tecido também é mensurada por meio do corante vital MTT (OECD, 2019c).

Nenhum teste de irritação ocular *in vitro* é capaz de substituir totalmente o teste ocular de Draize *in vivo*, pois não existe metodologia alternativa validada que classifique a Categoria 2 (UN GHS Cat. 2A e 2B); no entanto, combinações de metodologias de testes alternativos dentro de uma estratégia (em níveis/camadas) e/ou abordagens integradas para teste e avaliação (IATA) podem ser capazes de substituir o ensaio de Draize. Duas abordagens podem ser utilizadas para auxiliar na escolha da metodologia alternativa, baseadas nas características da amostra. A abordagem *top-down*, é projetada para ser usada quando, com base nas informações existentes, um produto químico deve ter alto potencial de irritação (UN GHS Cat. 1), enquanto a abordagem *bottom-up* é projetada para ser usada quando, com base nas informações existentes, não se espera que um produto químico possa causar irritação ocular suficiente para exigir uma classificação (UN GHS Não Cat.) (OECD, 2019e).

Nos últimos anos, os pesquisadores têm se empenhado em desenvolver estratégias que possam identificar a UN GHS Categoria 2. Sabe-se que a maioria dos produtos químicos registrados não requerem classificação para lesões oculares graves/irritação ocular e, deste modo, foi proposta uma avaliação de propriedades físico-químicas e uma abordagem *bottom-up* de duas etapas aplicável a produtos químicos líquidos puros, que pode distinguir entre as três categorias do GHS da ONU (Cat. 1, Cat. 2 e Não Cat.). A estratégia é baseada na avaliação de regras de exclusão de propriedades físico-químicas com métodos de teste *in vitro*, por meio de uma combinação dos ensaios RhCE e BCOP. As regras de exclusão físico-químicas e o teste RhCE foram utilizados para identificar substância que não requeiram classificação para dano/irritação ocular (Não Cat.), enquanto o BCOP identifica

a Cat. 1 e, caso a substância não se enquadre como Não Cat. ou Cat. 1, ela pode ser classificada como Cat. 2 (ALÉPÉE et al., 2019).

- **Avaliação do potencial de fototoxicidade**

A fototoxicidade é definida como uma resposta tóxica induzida por produtos químicos fotorreativos administrados topicamente ou sistemicamente após a exposição do corpo à luz ambiental (OECD, 2019d).

O teste de fototoxicidade 3T3 *Neutral Red Uptake* (NRU; OECD TG 432) avalia a fotocitotoxicidade pela redução relativa da viabilidade da monocamada celular (linhagem BALB/c 3T3) expostas ao produto químico em estudo, na presença versus ausência de luz. A citotoxicidade é expressa como uma redução dependente da concentração da absorção do corante vital vermelho neutro (NR) (OECD, 2019d).

- **Avaliação da permeação cutânea**

A metodologia estabelecida para a avaliação da permeação cutânea está descrita na OECD TG 428. Esta diretriz apresenta princípios gerais para medir a absorção cutânea e liberação de uma substância de teste usando pele excisada. Pele de muitas espécies de mamíferos, incluindo humanos, podem ser utilizadas. As propriedades de permeabilidade da pele são mantidas após a excisão do corpo, pois a principal barreira de difusão de substâncias químicas é o estrato córneo não viável (OECD, 2004)

A substância de teste, que pode ser identificada a partir de um radioisótopo, é aplicada à superfície de uma amostra de pele que separa as duas câmaras de uma célula de difusão. A amostra permanece na pele por um tempo e condições especificadas, antes da remoção por um procedimento de limpeza apropriado. O fluido receptor é coletado em pontos temporais ao longo do experimento e analisado quanto ao produto químico em estudo e/ou metabólitos (OECD, 2004).

- **Avaliação da mutagenicidade e genotoxicidade**

Uma mutação significa uma mudança permanente na quantidade ou estrutura do material genético de uma célula. O termo "mutação" se aplica tanto a mudanças genéticas hereditárias, que podem se manifestar no nível fenotípico quanto às modificações de DNA subjacentes quando conhecidas (incluindo mudanças específicas de pares de bases e translocações cromossômicas). Substâncias mutagênicas dão origem a um aumento da ocorrência de mutações em populações de células e/ou organismos (SCCS, 2018).

Genotoxicidade é um termo mais amplo e se refere a processos que alteram a estrutura, o conteúdo da informação ou a segregação do DNA e não estão, necessariamente, associados à mutagenicidade. Todos os mutagênicos são genotóxicos, mas nem todas as substâncias genotóxicas são mutagênicas (OECD, 2016a).

De acordo com recomendações do *Scientific Committee on Consumer Safety* (SCCS) a avaliação do potencial de mutagenicidade de uma substância cosmética deve incluir informações sobre: i) mutagenicidade no nível do gene, ii) quebra e/ou rearranjos cromossômicos (clastogenicidade) e iii) aberrações cromossômicas numéricas (aneuploidia). Para esta tarefa, testes de genotoxicidade, que avaliam desfechos de mutação irreversíveis (mutações genéticas ou cromossômicas), devem ser utilizados. Os testes indicadores, que medem o dano ao DNA sem levar em consideração as consequências desse dano primário, podem fornecer evidências confirmatórias, mas não devem ser usados como testes independentes. Por último, antes de realizar qualquer ensaio, deve ser efetuada uma análise exaustiva de todos os dados disponíveis sobre a substância em avaliação (SCCS, 2018).

Para a avaliação da atividade mutagênica e genotóxica de ingredientes cosméticos são recomendados dois ensaios *in vitro*, realizados de acordo com as diretrizes de teste da OECD:

- Teste de mutação reversa bacteriana (*Ames test*, OECD 471) como um teste que cobre mutações genéticas (OECD, 2020d);

- Teste do micronúcleo (OECD 487) como um teste para aberrações cromossômicas estruturais (clastogenicidade) e numéricas (aneugenicidade) (OECD, 2016a).

Se os resultados de ambos os testes forem claramente negativos, é muito provável que a substância não tenha potencial mutagênico. Da mesma forma, se os resultados de ambos os testes forem claramente positivos, é muito provável que a substância tenha potencial mutagênico. Em ambos os casos, testes adicionais não são necessários; no entanto, se um dos dois testes for positivo, a substância é considerada um mutagênico *in vitro*, sendo necessários mais testes para excluir o potencial de mutagenicidade (e/ou clastogenicidade) da substância sob investigação (SCCS, 2018).

- **Avaliação da carcinogenicidade**

As substâncias são definidas como cancerígenas se, após inalação, ingestão, aplicação dérmica ou injeção, induzem tumores (benignos ou malignos) ou aumentam a sua incidência, malignidade ou encurtam o tempo que antecede a ocorrência de um tumor (ECHA 2017). Carcinógenos são frequentemente diferenciados como "carcinógenos genotóxicos" (substâncias reativas ao DNA) para os quais o modo mais plausível de ação carcinogênica inclui as consequências dos efeitos genotóxicos (isto é, mutação pontual e aberrações cromossômicas estruturais) e "carcinógenos não genotóxicos" (NGC), ou substâncias não reativas ao DNA, que são cancerígenas devido a outros mecanismos que não as interações diretas com o DNA (ECHA, 2017).

No momento, não estão disponíveis metodologias alternativas *in vitro* validadas para a avaliação da carcinogenicidade (ROGIERS et al., 2020); no entanto, existem novas abordagens *in vitro*, que podem ser úteis, em uma abordagem de peso de evidência geral, para indicar potenciais substâncias genotóxicas, bem como carcinogênicas não genotóxicas.

Para substâncias genotóxicas, os testes de mutagenicidade *in vitro* estão bem desenvolvidos. Devido à relação entre mutações e câncer, estes testes de genotoxicidade também podem ser vistos como uma pré-triagem para carcinogenicidade. Um resultado positivo, em uma bateria de testes de

mutagenicidade/genotoxicidade *in vitro*, pode ser indicativo para considerar uma substância como um suposto carcinógeno. Esta indicação pode, ainda, ser apoiada por um resultado positivo em Ensaio de Transformação Celular (ETC) (SCCS, 2018). ETC podem detectar tanto carcinógenos genotóxicos quanto NGC. Eles avaliam a transformação celular, que é uma etapa das várias etapas do processo da carcinogênese, abordando vários desfechos. Dois documentos de orientação sobre ETC, a OECD nº 214 (OECD, 2015b) e a OECD nº 231 (OECD, 2016b), podem ser usados em uma abordagem de peso de evidência no teste de substâncias para potencial carcinogênico; contudo, o potencial carcinogênico não pode ser derivado de um ETC independente (SCCS, 2018).

1.1.18. Metodologias *in silico*

As estratégias para analisar compostos químicos devem incluir vários tipos de metodologias para uma avaliação de segurança robusta. A revisão mais recente do guia Notas de Orientação do SCCS definiu o tom de como a avaliação regulatória da segurança de produtos e ingredientes cosméticos é realizada na Europa, o que inclui as propriedades físicas e químicas dos compostos em investigação, dados *in chemico*, *in silico*, *in vitro*, *ex vivo*, além de dados obtidos em estudos com animais (*in vivo*), antes da proibição (SCCS, 2018).

A modelagem computacional preditiva é uma abordagem rápida e barata que se tornou amplamente usada em estratégias de testes integrados para avaliação da segurança de substâncias químicas (BRAGA et al., 2017). Metodologias *in silico* baseadas na modelagem da relação estrutura-atividade (SAR) oferecem uma abordagem alternativa para gerar estimativas de toxicidade química, na ausência de dados experimentais. A disponibilidade de bancos de dados de alta qualidade, algoritmos de dados poderosos e crescente poder computacional, nas últimas décadas, resultou em ferramentas e sistemas computacionais mais versáteis e confiáveis para avaliar a toxicidade química. Esses "*non-testing methods*", ou seja, uma avaliação sem precisar executar um ensaio em laboratório, incluem diversos modelos computacionais preditivos e combinações de mais de um modelo/abordagem. Considerando a

ampla diversidade de estruturas químicas, uma série de metodologias e modelos podem ser necessários para avaliar diferentes produtos químicos e parâmetros toxicológicos e, para interpretar tais resultados, é necessário utilizar uma abordagem de peso da evidência (WoE) (BENFENATI et al., 2019).

No caso da indústria cosmética, as abordagens *in silico* estão se tornando ferramentas cada vez mais importantes para a avaliação da segurança (GELLATLY; SEWELL, 2019). Os modelos de relação quantitativa estrutura/atividade (QSAR, *Quantitative structure activity relationship*) baseiam-se no princípio de que é possível correlacionar características da estrutura molecular com as propriedades químicas, físicas e biológicas, podendo ser utilizado para prever efeitos tóxicos (CHERKASOV et al., 2014). A utilização de modelos farmacocinéticos e toxicocinéticos de base fisiológica (PBPK, *Physiologically-based Pharmacokinetics*; PBTK, *Physiologically-based Toxicokinetics*) são utilizados para prever a absorção, distribuição, metabolismo e excreção de produtos químicos. Todos esses processos precisam ser conhecidos para entender o destino das substâncias utilizadas (SCCS, 2018).

O uso de uma abordagem mecanística de via de resultado adverso (AOP, *Adverse outcome pathway*) apoia a compreensão de como a perturbação da biologia normal pode levar a um resultado adverso, ligando um evento de iniciação molecular (MIE, *Molecular initiating event*) para um produto químico a um desfecho apical e subsequentes efeitos no organismo de uma população, por meio de uma cadeia de eventos causal transparente e cientificamente comprovada. As abordagens *in vitro* de alto rendimento (por exemplo, ensaios de genes e eventos celulares) podem ser utilizadas para indicar o potencial tóxico (BURDEN et al., 2015). Essas abordagens podem gerar grandes volumes de dados de alto conteúdo (*Big data*) que não são passíveis de processamento com ferramentas tradicionais e, em vez disso, requerem análise bioinformática, que, às vezes, envolve técnicas de *machine learning* (ZHU et al., 2014). Outra ferramenta que pode ser usada em uma abordagem integrada com AOP é a estrutura do modo de ação toxicológica (MoA, *Mode of action*) que descreve como qualquer substância pode afetar

adversamente a saúde humana e usa esse conhecimento para desenvolver modelos teóricos, computacionais (*in silico*) e experimentais complementares (*in vitro*) que preveem pontos de partida quantitativos, necessários para avaliação de segurança (BERGGREN et al., 2015). O MoA descreve uma resposta biológica a um desafio químico específico, enquanto um AOP é uma construção conceitual que descreve atividades biológicas, começando com um MIE e progredindo através de diferentes níveis biológicos para um efeito adverso observável em uma população (ANKLEY et al., 2010; BURDEN et al., 2015).

O QSAR *toolbox*, é um *software* disponível gratuitamente para avaliação de perigo químico, além de ser usado para identificar motivos estruturais e possíveis mecanismos de ação, aliados a dados experimentais existentes, assim como prever possíveis efeitos tóxicos, em diferentes desfechos. As categorias químicas, agrupamento e *read-across* baseiam-se na identificação de produtos químicos de origem suficientemente relacionados, em que a similaridade é, geralmente, avaliada com base em frações estruturais e propriedades físico-químicas/biológicas (GELLATLY; SEWELL, 2019). Dependendo dos dados disponíveis, uma variedade de desfechos pode ser prevista, como o potencial genotóxico de metabólitos, quando não há dados experimentais disponíveis (EFSA, 2016). Embora os métodos *in silico* sejam atualmente usados, predominantemente, para tomada de decisão interna, em vez de regulamentar, à medida que aumenta a confiança em sua aplicabilidade e previsibilidade, é provável que isso mude (GELLATLY; SEWELL, 2019).

“Pesar” os resultados obtidos dos modelos *in silico* antes de sua integração é uma etapa importante, em uma abordagem de peso da evidência (HARDY et al., 2017). Esta avaliação é imprescindível, não apenas quando os modelos concordam, mas também quando os resultados não convergem (BENFENATI et al., 2019). Assim, cada tomada de decisão, é baseada nas particularidades dos modelos utilizados. Ao realizar qualquer ensaio, seja ele *in vitro* ou *in silico*, é importante avaliar se a substância alvo se enquadra no domínio de aplicabilidade (DA) do método/modelo. O conceito de DA dos modelos *in silico* foi introduzido para avaliar a probabilidade de uma substância

química ser coberta pelo conjunto de avaliação utilizado pelo modelo. As previsões fora do DA, normalmente, não são confiáveis e seu uso é difícil de justificar (CHERKASOV et al., 2014).

Apesar do grande progresso, nos últimos anos, em áreas específicas (toxicocinética, toxicidade de dose repetida, carcinogenicidade e toxicidade reprodutiva), a implementação completa dos métodos alternativos ainda pode levar algum tempo (ALMEIDA; SARMENTO; RODRIGUES, 2017). Em resumo, a expansão dos domínios de aplicabilidade (DA) de ferramentas *in vitro* e *in silico* e a colaboração contínua entre reguladores, academia e indústria são necessários para completar o desenvolvimento de métodos alternativos não animais.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a segurança de 13 conservantes antimicrobianos utilizados em produtos cosméticos por meio de uma abordagem integrada de métodos *in vitro*, *in silico*, avaliação de perigo, avaliação da exposição e caracterização de risco.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliação *in vitro* da citotoxicidade nas linhagens celulares HaCaT, HDFa e HepG2.
- Avaliação *in vitro* do potencial de irritação/dano ocular na linhagem celular SIRC.
- Avaliação *in silico* do potencial de irritação cutânea.
- Avaliação *in silico* do potencial de irritação/dano ocular dos conservantes que não puderam ser classificados pela metodologia *in vitro* utilizada;
- Avaliação *in silico* do potencial de sensibilização da pele;
- Avaliação *in silico* do potencial de fototoxicidade;
- Avaliação *in silico* da toxicidade oral aguda;
- Avaliação *in silico* do potencial de mutagenicidade;
- Avaliação *in silico* do potencial de genotoxicidade;
- Avaliação *in silico* do potencial de carcinogenicidade;
- Avaliação *in silico* do potencial da atividade endócrina;
- Avaliação do perigo, exposição e caracterização do risco.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Amostras

Propilparabeno (Clariant); Metilparabeno (Clariant); Fenoxietanol (Chemunion); Mistura de metilisotiazolinona e metilcloroisotiazolinona (Clariant); DMDM hidantoína (Chemunion); Imidazolidinil ureia (Chemunion); Dehidroacetato de sódio (Chemunion); Álcool benzílico (DSM); Cloreto de benzalcônio (Clariant); Caprilil glicol (Symrise); Benzoato de sódio (Jiali); Etilhexilglicerina (Schülke & Mayr GmbH).

3.1.2. Material para rotina celular

3-4(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT; Sigma); *Neutral red solution* 0,33% (NR; Sigma); Trypan blue solution 0,4% (Sigma); Soro fetal bovino (SFB; Cultilab), meio de cultura *Dulbecco's modified eagle's medium - high glucose* (DMEM; Cultilab) e *Minimum essential media* (MEM; Cultilab); *Phosphate buffered saline* (PBS); Tripsina (Sigma); Solução de antibiótico (Cultilab); *Human immortalized keratinocytes* (HaCaT); *Human dermal fibroblasts, adult* (HDFa); *Liver hepatocellular carcinoma* (HepG2); *Statens seruminstitut rabbit cornea* (SIRC).

3.1.3. Reagentes

Dimetilsulfóxido (DMSO; Synth); Lauril sulfato de sódio (LSS; Synth); Isopropranol (Synth); Ácido acético glacial (Synth); Ácido clorídrico (Synth); Etanol absoluto (Synth), Soro fisiológico (Needs); Óleo mineral (Needs).

3.1.4. Equipamentos

Balança analítica (Shimadzu AY220); Peagômetro digital (Gehaka PG1800); Agitador magnético (Marconi MA 085 L); Autoclave vertical (PHOENIX®); Fluxo laminar (VECO®); Estufa de cultivo CO₂ (Shel Lab); Freezer -80° C (SANYO MDF-U56VC); Refrigerador (Consul Facilite Frost

Free); Centrifuga (BOECO Germany U-32R); Microscópio invertido (OLYMPUS CK2); Microscópio óptico (LABOMED Lx 400); Leitor de placas (BMG LABTECH – Spectrostar Nano); Câmara de Neubauer (BOECO); Shaker (New Brunswick Scientific).

3.2. Métodos

3.2.1. Avaliação *in vitro*

3.2.1.1. Ensaio de exclusão do corante azul de tripano

O ensaio foi realizado de acordo com o protocolo estabelecido por Strober (2015).

As células foram tripsinizadas e centrifugadas a 1300 rpm, por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram suspensas em meio de cultura completo, contendo soro fetal bovino (SFB) e solução de antibióticos. Foi retirada uma alíquota de 50 µL da suspensão celular e foram acrescentados 50 µL da solução do corante azul de tripano, 0,4%. Após homogeneização, foi retirada uma alíquota de 10 µL, para realizar a contagem do número de células na câmara de Neubauer.

Foram contados os 4 quadrantes externos da câmara de Neubauer. As células com a aparência de transparentes, com citoplasma claro, foram consideradas, no cálculo, como viáveis e, as células com o citoplasma corado em azul, foram consideradas como não viáveis e não foram contabilizadas no cálculo. A soma dos 4 quadrantes foi multiplicada por 2 (fator de diluição para o azul de tripano) e o resultado dividido por 4 (número de quadrantes contabilizados) expresso como $\times 10^4$ células/mL, de acordo com a equação abaixo:

Equação 1. Cálculo de viabilidade celular com corante azul de tripano

$$\text{número de células vivas} = (Q1 + Q2 + Q3 + Q4) \times 2 \div 4$$

Q1 a Q4: valor de células viáveis contadas em cada quadrante.

Este teste foi realizado antes de todos os ensaios de citotoxicidade e dano ocular, para garantir que a padronização da suspensão celular fosse calculada a partir de uma viabilidade celular de 100%.

3.2.1.2. Avaliação da citotoxicidade por meio das metodologias que utilizam os corantes vitais MTT e NR

O ensaio MTT foi realizado de acordo com protocolo estabelecido no laboratório, seguindo o que é preconizado na literatura (MOSMANN, 1983; ZANONI et al., 2019). O ensaio NRU foi realizado de acordo com o protocolo da ISO (2009), com modificações.

As células HaCaT, HDFa e HepG2 foram cultivadas, separadamente, em meio de cultura completo, DMEM suplementado com 10% de SFB e 5% de solução de antibiótico, mantidas na estufa em uma atmosfera umidificada (80%) a $37\pm 2^\circ\text{C}$, na presença de 5% de dióxido de carbono (CO_2).

O meio de cultura foi trocado de 2 a 3 vezes por semana, e as células eram tripsinizadas quando a garrafa atingisse uma confluência de, aproximadamente, 75-85%. Os ensaios foram realizados após a terceira passagem das células.

A avaliação da citotoxicidade foi realizada durante três dias: assim, a metodologia foi dividida nos dias, didaticamente.

Dia 1

Ao atingir a confluência de 75-85%, as garrafas contendo as células foram tripsinizadas e o seu conteúdo foi colocado em tubos estéreis, para centrifugação, por 3 minutos a 1200 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células foram suspensas em meio de cultura. Em seguida, foi realizada a contagem das células, em câmara de Neubauer, como descrito no item 3.2.1.1. Ensaio de exclusão do corante azul de tripano. A concentração padronizada para os experimentos foi de 5×10^5 células/mL em meio de cultura DMEM completo.

A suspensão celular foi plaqueada, em microplaca estéril de 96 poços com fundo chato, própria para cultivo celular, para a qual foram transferidos

100 µL da suspensão, por poço. Os poços das bordas superior, inferior, direita e esquerda não foram plaqueados com célula, apenas foi colocado o meio de cultura. Em seguida, a microplaca foi incubada em estufa a $37 \pm 2^\circ \text{C}$, na presença de 5% de CO_2 , por 24 horas, para posterior tratamento.

Dia 2

Antes de realizar o tratamento, as microplacas foram observadas em microscópio invertido, para garantir que não havia contaminação.

Foi preparada uma solução estoque de cada conservante, em meio de cultura com 5% de SFB e 5% de solução de antibiótico, as quais foram filtradas no fluxo laminar, em filtro estéril, com porosidade de 0,22 µm. As concentrações utilizadas foram obtidas por meio de diluição seriada, em microtubos estéreis e estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Conservantes e concentrações utilizadas nos ensaios

Conservante	Concentrações utilizadas % (m/v)
Propilparabeno	0,01250; 0,0250; 0,050; 0,10 e 0,20
Metilparabeno	0,0250; 0,050; 0,10; 0,20 e 0,40
Fenoxietanol	0,1250; 0,250; 0,50; 1,00 e 2,00
Metilcloroisotiazolinona e metilisotiazolinona	0,00018750; 0,0003750; 0,000750; 0,00150 e 0,0030
DMDM hidantoína	0,0750; 0,150; 0,30; 0,60 e 1,20
Imidazolidinil ureia	0,0750; 0,150; 0,30; 0,60 e 1,20
Dehidroacetato de sódio	0,0750; 0,150; 0,30; 0,60 e 1,20
Álcool benzílico	0,1250; 0,250; 0,50; 1,00 e 2,00
Cloreto de benzalcônio	0,006250; 0,01250; 0,0250; 0,050 e 0,10
Caprilil glicol	0,06250; 0,1250; 0,250; 0,50 e 1,00
Benzoato de sódio	0,06250; 0,1250; 0,250; 0,50 e 1,00
Etilhexilglicerina	0,1250; 0,250; 0,50; 1,00 e 2,00

Fonte: A autora.

Foi retirado o meio de cultura das microplacas e adicionados os tratamentos, sendo 100 μ L de cada tratamento, nos poços correspondentes. Os controles utilizados para o ensaio com o MTT e NR foram:

- Controle negativo (MTT e NRU): meio de cultura, representando 100% de viabilidade celular;
- Controle positivo (MTT): DMSO a 10% diluído em meio de cultura. Nesta concentração, o DMSO resulta em uma viabilidade celular $\leq 30\%$;
- Controle positivo (NRU): lauril sulfato de sódio (LSS) em 4 concentrações: 0,05 mg/ml; 0,1 mg/ml; 0,15 mg/ml; 0,2 mg/ml, realizado em uma placa à parte, a cada experimento. A média histórica, concentração que inibe 50% da viabilidade celular (IC_{50}), de LSS é 0,093 mg/ml. O teste atendeu aos critérios de aceitação se o IC_{50} para LSS estivesse dentro do CI 95% (intervalo de confiança; 0,070 mg/ml a 0,116 mg/ml).

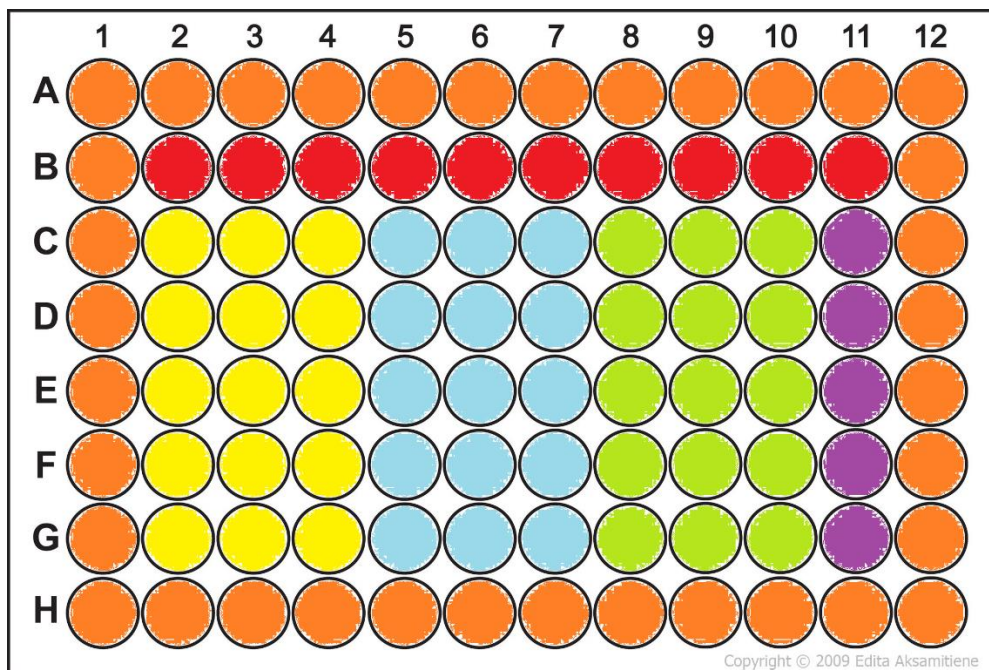
As microplacas foram incubadas, novamente, em estufa a $37 \pm 2^\circ$ C, na presença de 5% de CO_2 , por 24 horas. O desenho experimental das microplacas para os ensaios de citotoxicidade MTT/NRU está exemplificado na Figura 3.

Para os conservantes metilparabeno e propilparabeno, foi necessário utilizar 5% de etanol absoluto para a solubilização, no meio de cultura. Para controle, foi realizado o teste de citotoxicidade com o etanol nas mesmas concentrações utilizadas para solubilização dos conservantes (5%). Os valores obtidos foram descontados da citotoxicidade destes conservantes.

No dia 2 foi preparado o meio vermelho neutro na concentração de 40 μ g/mL para ser utilizado no terceiro dia do ensaio NR:

- 123 μ L da solução estoque de vermelho neutro (0,33%);
- 9,877 mL de meio de cultura. A quantidade preparada varia de acordo com o número de microplacas. A solução foi incubada *overnight* na mesma estufa de cultura celular.

Figura 3. Desenho experimental para o ensaio de citotoxicidade MTT/NR



Meio de cultura sem as células (laranja); Controle negativo (vermelho); Controle positivo ensaio MTT – DMSO (roxo); Amostra 1 (amarelo); Amostra 2 (azul); Amostra 3 (verde). Fonte: A autora.

Dia 3

Ensaio MTT

Após as 24 horas de tratamento, o meio de cultura foi retirado das microplacas, que foram lavadas com 100 μ L de PBS, por poço. Foram adicionados 100 μ L da solução de MTT preparada em PBS (1 mg/mL), previamente filtrada (porosidade de 0,22 μ L), em cada poço. As microplacas foram encubadas, por 3 horas, em estufa, na presença de 5% de CO₂, a 37 $\pm$ 2° C.

Posteriormente, foi retirada a solução de MTT das microplacas e foram adicionados 100 μ L de isopropanol, em cada poço. Em seguida, as microplacas ficaram sob agitação, por 10 minutos, e foi verificada a solubilização dos cristais de formazana. A leitura da absorbância foi realizada a 570 nm, em espectrofotômetro, com leitor de microplacas.

Ensaio NR

O meio vermelho neutro, preparado no dia 2, foi centrifugado por 10 minutos a 1800 rpm, para sedimentar qualquer precipitado do corante. Em seguida, o meio foi colocado em um reservatório com cuidado para não derrubar os cristais sedimentados.

Após as 24 horas de tratamento, o meio de cultura foi retirado das microplacas, que foram lavadas com 100 μ L de PBS por poço. Foram adicionados 100 μ L do meio vermelho neutro em cada poço. As microplacas foram encubadas, por 3 horas, em estufa com 5% de CO₂, a $37 \pm 2^\circ$ C.

As microplacas foram inspecionadas em microscópio invertido para checar a formação dos cristais de vermelho neutro. Foi preparada uma solução para extração do corante, contendo: 50% de etanol, 49% de água e 1% de ácido acético glacial.

O meio vermelho neutro foi removido e foi realizada a lavagem das microplacas com 100 μ L de PBS, por poço. Foram adicionados 150 μ L da solução de extração do corante a cada poço. As microplacas ficaram sob agitação, por 10 minutos, e foi verificada a solubilização dos cristais. A leitura da absorbância foi realizada a 540 nm, em espectrofotômetro, com leitor de microplacas.

Crítérios de aceitação dos resultados

Foram realizados, ao menos, três ensaios independentes, para cada metodologia. Foi aceito um desvio padrão da viabilidade celular final, derivada das três repetições independentes, menor que 15% para cada substância-teste, em cada concentração avaliada.

Pelos valores de densidade óptica (OD) obtidos, foi possível calcular a porcentagem de células mortas e viáveis, o IC₅₀ e IC₃₀ (concentração que inibe 50 e 30% da viabilidade celular, respectivamente), de acordo com as equações 2 e 3.

Equação 2. Cálculo da porcentagem de células mortas para os ensaios MTT/NRU

$$\% \text{ células mortas} = \frac{(OD_{Cn} - OD_{Am})}{OD_{Cn}} \times 100$$

OD_{Cn}: densidade óptica do controle negativo;

OD_{Am}: densidade óptica da amostra.

Equação 3. Cálculo da porcentagem de células vivas para os ensaios MTT/NRU

$$\% \text{ células vivas} = 100 - \% \text{ células mortas}$$

O IC₅₀ e IC₃₀ foram calculados no programa GraphPad Prism (versão 5.01), por meio de uma curva de regressão não linear, utilizando a concentração (log) *versus* a porcentagem de células viáveis. Os valores da viabilidade celular foram relatados como média ± desvio padrão (DP).

Foi realizada a análise estatística de variância *One-Way* ANOVA com pós teste Tukey, para comparar as médias das viabilidades celulares entre os conservantes dentro de uma mesma linhagem e testar quais resultados foram iguais e diferentes. A significância estatística foi estabelecida em $p < 0,05$ (Tabelas 3 a 6).

3.2.1.3. Avaliação de dano ocular (*Short Time Exposure – STE*)

A avaliação de dano ocular foi realizada de acordo com o protocolo da OECD 491 (OECD, 2018e).

Neste ensaio, foi utilizada a célula SIRC, cultivada em meio MEM, suplementado com 10% de SFB e 5% de solução de antibiótico, mantidas na estufa de cultivo celular em uma atmosfera umidificada a $37 \pm 2^\circ \text{C}$, na presença de 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado de 2 a 3 vezes por semana, e as células eram tripsinizadas quando a garrafa atingisse uma confluência de, aproximadamente, 75-85%. Os ensaios foram realizados após a terceira passagem das células.

Após obter a quantidade necessária de células, elas foram tripsinizadas e centrifugadas, por 3 minutos, a 1300 rpm. A contagem das células foi realizada em câmara de Neubauer como descrito no item 3.2.1.1. Ensaio de exclusão do corante azul de tripano.

Foram plaqueados 200 μ L da suspensão celular a 6×10^3 células por poço, em placas estéreis de 96 poços, com fundo chato e próprias para cultivo celular. As extremidades da placa não foram utilizadas devido à possibilidade de evaporação, que pode influenciar os resultados. Nestes poços só foi adicionado o meio de cultura, como exemplificado na Figura 4. Após o plaqueamento, as células foram acondicionadas na estufa de cultivo celular, por 4 dias.

No quarto dia, após plaqueamento, o experimento foi realizado. As amostras foram previamente solubilizadas, de acordo com suas características físico-químicas, nos solventes recomendados: soro fisiológico (1ª opção), 5% DMSO em soro fisiológico (2ª opção) ou óleo mineral (3ª opção).

As amostras foram dissolvidas no solvente selecionado para uma concentração de 5% (m/m) e, então, foi realizada uma diluição seriada de 10x para 0,5% e em seguida para 0,05%. As concentrações utilizadas foram a 5% e a 0,05%.

O meio de cultura foi usado como um controle em cada placa, de cada repetição, e a viabilidade das células no meio foi considerada 100%. As células também foram expostas a cada solvente utilizado, sendo considerado o controle negativo, para confirmar que eles não induzem efeitos adversos na viabilidade celular. O controle positivo utilizado foi o LSS a 0,01%, em soro fisiológico, que foi aplicado em cada placa, de cada repetição. Para calcular a viabilidade celular do controle positivo, cada placa de cada repetição incluiu um controle para o solvente soro fisiológico.

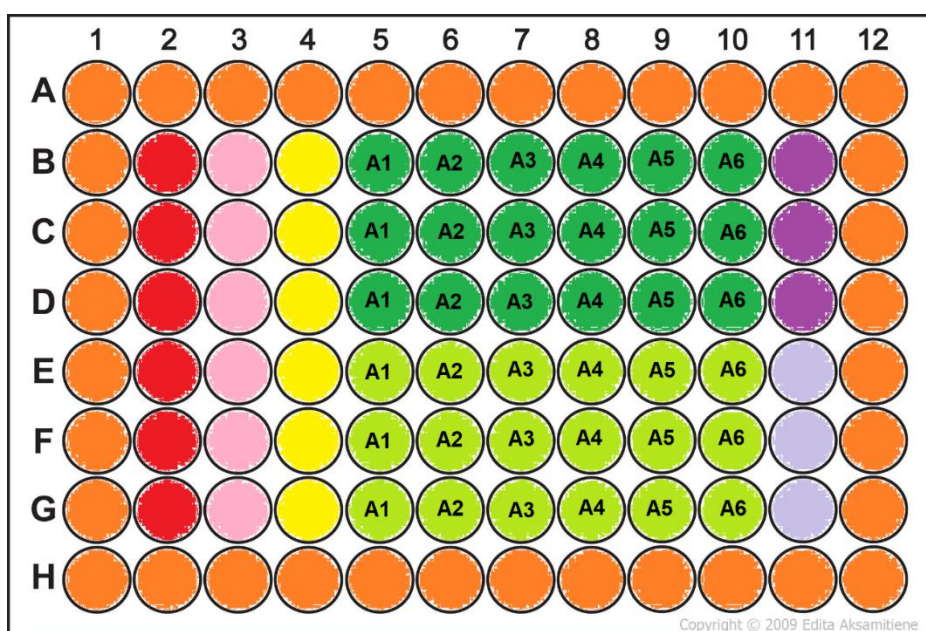
A placa de substâncias foi preparada em uma placa de 96 poços para micro titulação, sem a adição de células. Foi organizado o desenho experimental com os tratamentos (amostras) e controles de acordo com a Figura 4. Foram pipetados 300 μ L, por poço, de cada substância em seus respectivos poços, em triplicata, para cada concentração testada. Os controles estavam presentes em cada placa, de cada repetição experimental.

A microplaca com a cultura de células foi retirada da estufa e observada em microscópio invertido para avaliação da monocamada formada. Placas que apresentassem qualquer alteração fora dos padrões do experimento foram

descartadas. Dentro do fluxo laminar, o meio de cultura foi decantado para dar início ao experimento.

Com uma micropipeta multicanal foram aplicados, a partir da placa de substâncias, 200 μ L por poço de cada substância, na microplaca com as células plaqueadas, em triplicata, para cada concentração. A exposição durou 5 minutos e, após esse tempo, as substâncias foram aspiradas, na mesma ordem de aplicação, com a micropipeta multicanal.

Figura 4. Desenho experimental para o ensaio de dano ocular STE



Poços não utilizados no experimento (laranja); Meio de cultura com as células (vermelho); Controle negativo – solvente (rosa); Controle positivo – LSS (amarelo); Amostras a 0,05% (verde escuro); Amostras a 5% (verde claro); Amostra 1 (A1); Amostra 2 (A2); Amostra 3 (A3); Amostra 4 (A4); Amostra 5 (A5); Amostra 6 (A6); Branco - PBS (roxo); Controle do solvente soro fisiológico (lilás). Fonte: A autora.

As microplacas foram lavadas duas vezes com 200 μ L de PBS, removendo-o por decantação. Foram adicionados 200 μ L da solução de MTT (0,5 mg/mL diluídos em PBS) e as microplacas foram incubadas, no escuro, na estufa de cultivo celular, por 2 horas. Posteriormente, a solução de MTT foi decantada e, para solubilizar os cristais de formazana, foram adicionados, em cada poço, 200 μ L de isopropanol acidificado com 0,04 N de ácido clorídrico, por 60 minutos, no escuro.

A leitura da absorbância foi realizada a 570 nm, em espectrofotômetro, com leitor de microplacas. O PBS foi utilizado como branco, sendo adicionado antes da leitura em 3 poços que não continham células.

Avaliação dos resultados

Os valores de OD obtidos de cada amostra foram usados para calcular a viabilidade celular relativa ao controle negativo do solvente, que é considerado 100%. Foram calculadas as médias obtidas das ODs das triplicatas de poços de cada substância e controles. A equação utilizada para calcular a viabilidade celular está descrita abaixo:

Equação 4. Cálculo da viabilidade celular (%) para o ensaio STE

$$Viabilidade\ celular\ (\%) = \frac{(OD\ amostra) - (OD\ branco)}{(OD\ solvente) - (OD\ branco)} \times 10$$

OD: densidade óptica.

A viabilidade celular do solvente (controle negativo) foi calculada em relação ao meio de cultura e a viabilidade do controle positivo (LSS) foi calculado em relação ao seu solvente (soro fisiológico).

Foram realizados, ao menos, três ensaios independentes e a viabilidade celular relativa final foi calculada a partir da média aritmética das três repetições independentes.

Os valores de viabilidade celular foram relatados como média $\pm$ desvio padrão (DP). A significância estatística foi estabelecida em $p \leq 0,05$.

Crítérios de aceitação do teste

Os resultados do teste foram considerados aceitáveis quando satisfizeram os seguintes critérios:

- a) A densidade óptica do meio controle deve ser maior ou igual a 0,3 após a subtração da densidade óptica do branco.
- b) A viabilidade do solvente controle deve ser 80% ou mais, relativa ao meio controle.
- c) A viabilidade celular do controle positivo (LSS a 0,01%) deve estar entre os dois desvios padrões da média histórica ou caso o laboratório não tenha completado um número suficiente de experimentos para estabelecer uma média robusta, pode ser considerado valores entre 21,1% e 62,3%.
- d) O desvio padrão da viabilidade celular final, derivada das três repetições independentes, deve ser menor que 15% para cada substância-teste, em cada concentração avaliada.

Classificação da substância-teste

Após a execução do teste e cálculo da viabilidade celular relativa, para cada substância-teste comparados ao solvente controle, foi estimado o potencial risco ocular que esta substância apresenta.

Os valores de *cut-off* da viabilidade celular para a identificação de substâncias que induzem dano ocular severo (UN GHS Categoria 1) e substâncias que não requerem classificação para irritação ocular ou dano ocular severo (UN GHS Sem Categoria) estão descritos no Quadro 13.

Quadro 13. Classificação das substâncias-teste pela metodologia STE

Viabilidade celular		UN GHS Classificação	Aplicabilidade
5%	0,05%		
> 70%	> 70%	Não Categoria	Substâncias e misturas, com exceção de: i) substâncias altamente voláteis com pressão de vapor superior a 6 kPa ii) Produtos químicos sólidos (substâncias e misturas), exceto surfactantes e misturas compostas apenas de surfactantes
≤ 70%	> 70%	Nenhuma predição pode ser realizada	Não aplicável
≤ 70%	≤ 70%	Categoria 1	Substâncias e misturas

Fonte: (OECD, 2018e)

3.2.2. Avaliação *in silico*

Os desfechos escolhidos para avaliação *in silico* foram:

- Irritação da pele;
- Irritação ocular (CG e EEG);
- Sensibilização da pele;
- Fototoxicidade;
- Toxicidade oral aguda (LD₅₀; roedores);
- Carcinogenicidade;
- Mutagenicidade;
- Genotoxicidade;
- Atividade endócrina.

Para a análise dos compostos, foi inserida, nos *softwares* descritos acima, a notação química SMILES (*Simplified Molecular Input Line Entry System*) obtida no site do *PubChem*, disponíveis no Quadro 14.

A avaliação *in silico* dos desfechos carcinogenicidade, mutagenicidade, genotoxicidade e atividade endócrina, foi realizada por meio das ferramentas computacionais VEGA HUB versão 1.1.5 e OECD QSAR *toolbox* versão 4.4.1. Os *softwares* estão disponíveis para *download* gratuito nos endereços eletrônicos <https://www.vegahub.eu/> e <https://qsartoolbox.org/>. Ambos os *softwares* fornecem, junto com o resultado da análise, as informações sobre o domínio de aplicabilidade do método, baseado no composto químico em análise. Somente os resultados dentro do domínio de aplicabilidade (DA) do método foram considerados (ECHA, 2016). Os modelos de fototoxicidade e toxicidade oral aguda (LD₅₀; roedores) só estavam disponíveis no OECD QSAR *toolbox*; sendo assim, só foram avaliados nesta plataforma.

Quadro 14. Notação química SMILES

INCI name	SMILES
Propylparaben	<chem>CCCOC(=O)C1=CC=C(C=C1)O</chem>
Methylparaben	<chem>COC(=O)C1=CC=C(C=C1)O</chem>
Phenoxyethanol	<chem>C1=CC=C(C=C1)OCCO</chem>
Methylchloroisoithiazolinone (and) Methylisothiazolinone	<chem>CN1C(=O)C=C(S1)Cl</chem> <chem>CN1C(=O)C=CS1</chem>
DMDM Hydantoin	<chem>CC1(C(=O)N(C(=O)N1CO)CO)C</chem>
Imidazolidinyl Urea	<chem>C(NC(=O)NC1C(=O)NC(=O)N1CO)NC(=O)NC2C(=O)NC(=O)N2CO</chem>
Sodium dehydroacetate	<chem>CC1=CC(=C(C(=O)O1)C(=O)C)[O-].[Na+]</chem>
Benzyl Alcohol	<chem>C1=CC=C(C=C1)CO</chem>
Benzalkonium Chloride	<chem>[Cl-].CCCCCCCCC[N+](C)(C)CC1CCCCC1</chem>
Caprylyl Glycol	<chem>CCCCCCC(CO)O</chem>
Sodium Benzoate	<chem>C1=CC=C(C=C1)C(=O)[O-].[Na+]</chem>
Ethylhexylglycerin	<chem>CCCCC(CC)COCC(CO)O</chem>

Fonte: PubChem

A irritação da pele foi avaliada por meio do OECD QSAR *toolbox* e IrriTest (Alttox). O IrriTest é uma ferramenta computacional para previsão de irritação cutânea desenvolvida pela Alttox, utilizando conhecimentos derivados

de uma combinação de mecanismos e dados experimentais relacionados à irritação e corrosão cutânea. Somente os resultados dentro do DA foram utilizados.

Para o desfecho de sensibilização da pele, foi utilizada a plataforma *online* PRED-SKIN Web App 3.0, disponível no endereço eletrônico <http://predskin.labmol.com.br>, além dos *softwares* VEGA e OECD QSAR *toolbox*. O PRED-SKIN fornece um índice de confiabilidade do modelo *Bayesian outcome*. Desse modo, só foram considerados os resultados com confiabilidade alta (*high*) (BRAGA et al., 2017).

Foi realizada a predição do desfecho de irritação ocular somente para os conservantes que não foram classificados pela metodologia STE, caprilil glicol (CG) e etilhexilglicerina (EEG), por meios dos *softwares* OECD QSAR e iS Ocular. O iS Ocular é uma plataforma de avaliação *in silico* da Alttox, disponível no endereço eletrônico <https://alttox.com.br/>; contudo, o acesso é pago e foi gentilmente cedido pelo Grupo O Boticário. A predição toxicológica na ferramenta OECD QSAR *toolbox*, foi realizada por meio de *read-across*, utilizando como critérios: "Regras de Inclusão e Regras de Exclusão de Dano/Irritação Ocular por BfR" (Instituto Federal Alemão para Avaliação de Riscos), por agrupamento primário. Só foram utilizados os resultados que estavam dentro do DA do método. O iS Ocular realizou a predição de maneira automática, gerando um relatório de análise que englobou os três modelos constituintes da ferramenta e os critérios estabelecidos por ela. Somente os resultados dentro do DA foram utilizados.

Os resultados das análises *in silico* foram expressos como negativo; ou seja, a substância possui baixa probabilidade de exercer atividade no dado desfecho; ou positivo, quando a substância possui alta probabilidade de ser ativa, no desfecho selecionado. Alguns modelos, para algumas substâncias, estavam fora do domínio de aplicabilidade do método, portanto, esses resultados não foram considerados. Os *softwares* e modelos preditivos que foram utilizados para cada desfecho avaliado nas análises *in silico* foram disponibilizados no Quadro 15.

Quadro 15. Softwares e modelos preditivos utilizados nas análises *in silico*

Desfechos	Softwares	Modelos
Irritação da pele	OECD QSAR toolbox	Read-across → Skin irritation/corrosion Inclusion rules by BfR e Skin irritation/corrosion Exclusion rules by BfR
	IrriTest (Alttox)	Structural Alert Analysis, Skin irritation and corrosion predictions for met BfR Rules e Skin irritation and corrosion predictions for human and animal skin
Irritação ocular (CG e EEG)	IS-Ocular (Alttox)	Structural Alert Analysis, Eye irritation and corrosion predictions for met BfR Rules e Eye irritation and corrosion predictions for human and animal eyes
Sensibilização da pele	OECD QSAR toolbox	QSAR → Allergic Contact Dermatitis, Guinea Pig and Human - Danish QSAR DB battery model (1.0)
	VEGA HUB	Skin Sensitization model (CAESAR) 2.1.6 e Skin Sensitization model (IRFMN/JRC) 1.0.0
	PRED-SKIN	QSAR → considera dados <i>in chemico</i> (DPRA), <i>in vitro</i> (KeratinoSens e h-CLAT), <i>in vivo</i> (LLNA) e humanos (HRIPT e HMT) e modelo <i>Bayesian outcome</i> (avaliação de risco qualitativa integrativa [QRA])
Fototoxicidade	OECD QSAR toolbox	QSAR → Photoinduced toxicity based on 3T3 NRU data (1.0)
Toxicidade oral aguda (LD ₅₀ ; roedores)	OECD QSAR toolbox	QSAR → Acute toxicity in Mouse, Oral - Danish QSAR DB ACDLabs model (1.0)
Carcinogenicidade	OECD QSAR toolbox	QSAR → FDA RCA Cancer Female Mouse - Danish QSAR DB CASE Ultra model (1.0) e FDA RCA Cancer Male Mouse - Danish QSAR DB CASE Ultra model (1.0)
	VEGA HUB	Carcinogenicity model (CAESAR) 2.1.9 e Carcinogenicity model (ISS) 1.0.2

Mutagenicidade	OECD QSAR toolbox	QSAR → Ames test in <i>S. typhimurium</i> (<i>in vitro</i>) - Danish QSAR DB battery model (1.0) – ativação metabólica com S9
	VEGA HUB	Mutagenicity (Ames test) CONSENSUS model 1.0.3
Genotoxicidade	OECD QSAR toolbox	QSAR → Micronucleus Test in Mouse Erythrocytes - Danish QSAR DB battery model (1.0)
	VEGA HUB	<i>In vitro</i> Micronucleus activity (IRFMN/VERMEER) 1.0.0 <i>In vivo</i> Micronucleus activity (IRFMN) 1.0.1
Atividade endócrina	OECD QSAR toolbox	QSAR → Estrogen Receptor α Activation (Human <i>in vitro</i>) - Danish QSAR DB battery model (1.0) - ER activation e Estrogen Receptor α Binding, Balanced Training Set (Human <i>in vitro</i>) - Danish QSAR DB battery model (1.0)
	VEGA HUB	Estrogen Receptor Relative Binding Affinity model (IRFMN) 1.0.1 e Estrogen Receptor-mediated effect (IRFMN/CERAPP) 1.0.0

QSAR: Quantitative structure–activity relationship; BfR: German Federal Institute for Risk Assessment; DPRA: Direct Peptide Reactivity Assay; h-CLAT: Human Cell Line Activation Test; LLNA: Local lymph node assay; HRIPT: Human Repeated Insult Patch Test; HMT: Human Maximization Test; NRU: Neutral Red Uptake.

3.2.3. Avaliação do perigo

Para a construção da matriz toxicológica de perigo, os desfechos abordados neste trabalho foram parametrizados de acordo com o nível de toxicidade, definido como baixo (B) ou alto (A), em concordância com as principais diretrizes toxicológicas, como GHS, SCCS, *International Agency for Research on Cancer* (IARC), e *United States Environmental Protection Agency* (USEPA), como descrito na Tabela 2, considerando os desfechos de sensibilização e irritação da pele, irritação ocular, fototoxicidade, toxicidade oral aguda, carcinogenicidade, mutagenicidade, genotoxicidade e atividade endócrina.

Após a parametrização dos desfechos (Tabela 2), os dados obtidos de exposição local e sistêmica, por meio de métodos *in vitro* e *in silico*, foram categorizados de acordo com seus níveis de toxicidade (baixo ou alto).

Tabela 2. Parâmetros de avaliação do perigo

Grupo I – Toxicidade Local					Grupo II – Toxicidade Sistêmica				
	Sensibilização da pele	Irritação da pele	Irritação ocular	Fototoxicidade	Toxicidade oral aguda	Carcinogenicidade	Mutagenicidade	Genotoxicidade	Atividade endócrina
B = Baixo	Substância classificada como não sensibilizante	Viabilidade celular (HaCaT/HDFa) ≥70% ^a e/ou resultado negativo <i>in silico</i>	GHS Não Categoria ou resultado <i>in silico</i> ^b que não demonstre potencial de irritação ocular	Substância classificada como não fototóxica	LD ₅₀ > 2000 mg/kg pc/d	Substância classificada como não carcinogênica (IARC Grupo 3 ou 4)	Substância classificada como não mutagênica	Substância classificada como não genotóxica	Não ativo no receptor de estrogênio α
A = Alto	Substância classificada como sensibilizante	Viabilidade celular (HaCaT/HDFa) <70% ^a e/ou resultado positivo <i>in silico</i>	GHS Categoria 1 ou resultado <i>in silico</i> ^b que demonstre potencial de irritação ocular	Substância classificada como fototóxica	LD ₅₀ < 2000 mg/kg pc/d	Substância classificada como carcinogênica (IARC Grupo 1)	Substância classificada como mutagênica	Substância classificada como genotóxica	Ativo no receptor de estrogênio α

^aConsiderando a concentração máxima permitida; ^bAvaliação *in silico* realizada apenas para os conservantes que não puderam ser classificadas pelo ensaio *in vitro* de irritação ocular; GHS: *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals*; LD₅₀: *Lethal dose*; IARC: *International Agency for Research on Cancer*. Fonte: A autora.

3.2.4. Avaliação da exposição e caracterização do risco

A última etapa na avaliação de segurança de um ingrediente cosmético é o cálculo da margem de segurança (MoS), que é a razão entre o nível (dose) sem efeitos adversos observáveis (NOAEL) e uma estimativa da exposição (SED) (SCCS, 2018). Os valores de NOAEL utilizados neste trabalho foram obtidos na literatura e, deste modo, nenhum ensaio em animal foi realizado.

A SED foi calculada utilizando a seguinte equação, para cada ingrediente:

Equação 5. Cálculo da SED para avaliação da exposição sistêmica

$$SED = E_{product} (mg/kg pc/dia) \times \frac{C}{100} \times \frac{DAp}{100}$$

SED é a dose de exposição sistêmica.

$E_{product}$ (mg/kg pc/dia) é a exposição diária estimada a um produto cosmético por kg de peso corporal (pc), com base na quantidade aplicada e na frequência de aplicação. Foi considerado o valor de 269 mg/kg pc/dia (SCCS, 2018).

C (%) é a concentração de cada conservante, definida com base na concentração máxima de acordo com a ANVISA e o Regulamento da Comissão Europeia (CE) nº 1223/2009, ou máxima habitual, para os não regulamentados.

DAp (%) é a exposição dérmica, assumida como 50%, considerando o pior cenário (SCCS, 2021).

A MoS foi calculada utilizando a seguinte equação para cada ingrediente:

Equação 6. Cálculo da MoS para avaliação da exposição sistêmica

$$MoS = \frac{NOAEL}{SED}$$

MoS é a margem de segurança.

NOAEL é o nível sem efeitos adversos observáveis.

SED é a dose de exposição sistêmica.

A caracterização do risco foi baseada na avaliação do perigo e da exposição, considerando o valor da MoS, bem como outros parâmetros

importantes, levando em conta o peso da evidência, como: concentração do conservante, tipo de produto, frequência de uso, rota de exposição e população alvo (crianças, mulheres grávidas ou usuários de pele sensível). Desta forma, o avaliador de segurança pondera o uso ou não de determinado ingrediente, baseado nestes critérios.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As substâncias classificadas como conservantes (PP, MP, FE, CMI/MI, DMDMH, IMU, SD, BA, BAC e SB) avaliadas neste trabalho, foram selecionadas por estarem entre os conservantes mais utilizados nas últimas décadas (DEPA, 2015; STEINBERG, 2019; TAHAN et al., 2016). CG e EEG não são classificadas como conservantes; contudo, estão sendo utilizados como *boosters* do sistema conservante e, em alguns casos, até como conservantes principais de formulações cosméticas (HALLA et al., 2018; HERMAN, 2019).

4.1. Avaliação *in vitro*

4.1.1. Avaliação da citotoxicidade por meio das metodologias que utilizam os corantes vitais MTT e NR.

Os valores de IC₅₀ e IC₃₀ obtidos em ambos os ensaios de citotoxicidade e linhagens celulares estão descritos nas Tabelas 3 a 6. Os resultados foram expressos como a média de 3 ensaios independentes $\pm$ desvio padrão (DP).

As curvas de viabilidade celular estão representadas nas Figuras 5 e 6. Os resultados foram expressos como média de 3 ensaios independentes $\pm$ DP.

Tabela 3. Valores percentuais de IC₅₀ (m/v) obtidos nos ensaios de citotoxicidade por meio da metodologia com o corante MTT

Conservantes	IC ₅₀ % HaCat	IC ₅₀ % HDFa	IC ₅₀ % HepG2
PP	*	0,0194 ±4,9E-05 ^{aij}	0,0145 ±0,0012 ^{aijk}
MP	0,0330 ±0,0020 ^{ahi}	0,0730 ±0,0002 ^{bk}	0,0315 ±0,0093 ^{bilm}
FE	0,1636 ±0,0102 ^b	0,1516 ±0,0115 ^{ck}	0,2494 ±0,0126 ^{cn}
CMI/MI	0,0005 ±0,00001 ^{ch}	0,0011 ±0,0001 ^{di}	0,0008 ±0,00001 ^{djlo}
DMDMH	*	*	*
IMU	*	*	*
SD	0,2313 ±0,0236 ^d	0,5041 ±0,0220 ^e	0,3952 ±0,0790 ^{en}
BA	0,8427 ±0,0399 ^e	0,9534 ±0,0248 ^f	~2,095 ±0,1183 ^f
BAC	*	*	*
CG	0,0680 ±0,0055 ^{fi}	0,0744 ±0,0041 ^{gj}	0,0668 ±0,0035 ^{gkmo}
SB	0,3329 ±0,0116 ^g	0,5792 ±0,0577 ^h	0,5962 ±0,0329 ^h
EEG	*	*	*

Resultados expressos como média de três experimentos independentes ± desvio padrão.

*Inibiu mais de 50% da viabilidade celular na menor concentração testada. Letras iguais indicam valores significativamente iguais (*One-way ANOVA*, pós teste Tukey, $p < 0,05$). Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes (*One-way ANOVA*, pós teste Tukey, $p < 0,05$). PP: Propilparabeno; MP: Metilparabeno; FE: Fenoxietanol; CMI/MI: Metilcloroisotiazolinona e metilisotiazolinona; DMDMH: DMDM hidantoína; IMU: Imidazolidinil ureia; SD: Dehidroacetato de sódio; BA: Álcool benzílico; BAC: Cloreto de benzalcônio; CG: Caprilil glicol; SB: Benzoato de sódio; EEG: Etilhexilglicerina. Fonte: A autora.

Tabela 4. Valores percentuais de IC₅₀ (m/v) obtidos nos ensaios de citotoxicidade por meio da metodologia com o corante NR

Conservantes	IC ₅₀ % HaCat	IC ₅₀ % HDFa	IC ₅₀ % HepG2
PP	*	0,0158 ±0,0006 ^{aijk}	0,0142 ±0,0004 ^{aij}
MP	0,0413 ±0,0004 ^{ab}	0,0735 ±0,0055 ^{bilm}	0,0809 ±0,0081 ^{bk}
FE	0,2174 ±0,0077 ^b	0,2029 ±0,0075 ^{cj}	0,2076 ±0,0091 ^c
CMI/MI	0,0004 ±0,00001 ^{cb}	0,0003 ±0,00001 ^{dln}	0,0005 ±0,00001 ^{di}
DMDMH	*	*	*
IMU	*	*	*
SD	0,2820 ±0,0225 ^d	0,3358 ±0,0144 ^e	0,2701 ±0,0159 ^e
BA	0,9334 ±0,0316 ^e	~2,46 ±0,0622 ^f	~2,099 ±0,0315 ^f
BAC	*	*	*
CG	0,0977 ±0,0086 ^f	0,0759 ±0,0054 ^{gkmn}	0,0732 ±0,0007 ^{gjk}
SB	0,3658 ±0,0060 ^g	0,6154 ±0,0338 ^h	0,5503 ±0,0490 ^h
EEG	*	*	*

Resultados expressos como média de três experimentos independentes ± desvio padrão.

*Inibiu mais de 50% da viabilidade celular na menor concentração testada. Letras iguais indicam valores significativamente iguais (*One-way* ANOVA, pós teste Tukey, $p < 0,05$). Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes (*One-way* ANOVA, pós teste Tukey, $p < 0,05$). PP: Propilparabeno; MP: Metilparabeno; FE: Fenoxietanol; CMI/MI: Metilcloroisotiazolinona e metilisotiazolinona; DMDMH: DMDM hidantoína; IMU: Imidazolidinil ureia; SD: Dehidroacetato de sódio; BA: Álcool benzílico; BAC: Cloreto de benzalcônio; CG: Caprilil glicol; SB: Benzoato de sódio; EEG: Etilhexilglicerina. Fonte: A autora.

Tabela 5. Valores percentuais de IC₃₀ (m/v) obtidos nos ensaios de citotoxicidade por meio da metodologia com o corante MTT

Conservante	IC ₃₀ % HaCat	IC ₃₀ % HDFa	IC ₃₀ % HepG2
PP	*	0,0282 ±0,0018 ^{aij}	~0,0324 ±0,0057 ^{aijk}
MP	~0,0627 ±0,0029 ^{ah}	0,1505 ±0,0039 ^{bkl}	~0,1075 ±0,0313 ^{bilmn}
FE	~0,2944 ±0,0066 ^b	0,2050 ±0,0072 ^{cik}	0,3892 ±0,0567 ^{clo}
CMI/MI	0,0006 ±0,00001 ^c	0,0012 ±0,0001 ^d	0,0010 ±0,0001 ^{djmp}
DMDMH	*	*	*
IMU	*	*	*
SD	0,5622 ±0,0436 ^{di}	1,0963 ±0,0498 ^e	0,9044 ±0,133 ^{eq}
BA	1,3041 ±0,0289 ^e	1,4590 ±0,0759 ^f	~2,7954 ±0,3022 ^f
BAC	*	*	*
CG	~0,1168 ±0,0054 ^{fh}	~0,1068 ±0,0035 ^{gjl}	~0,0900 ±0,0043 ^{gknop}
SB	0,5327 ±0,0108 ^{gi}	0,7481 ±0,0252 ^h	0,8094 ±0,0282 ^{hq}
EEG	*	*	*

Resultados expressos como média de três experimentos independentes ± desvio padrão.

*Inibiu mais de 30% da viabilidade celular na menor concentração testada. Letras iguais indicam valores significativamente iguais (*One-way ANOVA*, pós teste Tukey, $p < 0,05$). Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes (*One-way ANOVA*, pós teste Tukey, $p < 0,05$). PP: Propilparabeno; MP: Metilparabeno; FE: Fenoxietanol; CMI/MI: Metilcloroisotiazolinona e metilisotiazolinona; DMDMH: DMDM hidantoína; IMU: Imidazolidinil ureia; SD: Dehidroacetato de sódio; BA: Álcool benzílico; BAC: Cloreto de benzalcônio; CG: Caprilil glicol; SB: Benzoato de sódio; EEG: Etilhexilglicerina. Fonte: A autora.

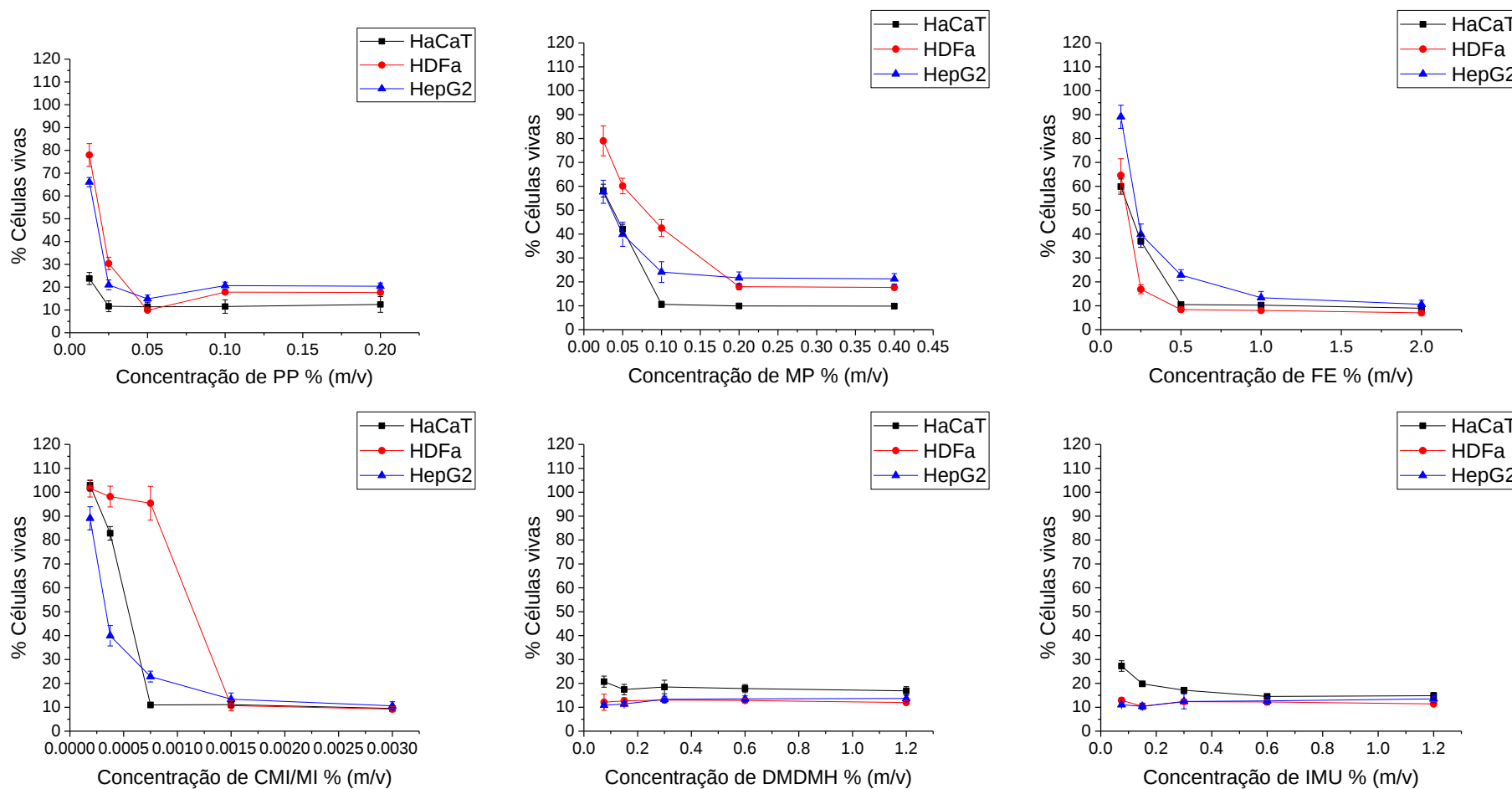
Tabela 6. Valores percentuais de IC₃₀ % (m/v) obtidos nos ensaios de citotoxicidade por meio da metodologia com o corante NR

Conservante	IC ₃₀ % HaCat	IC ₃₀ % HDFa	IC ₃₀ % HepG2
PP	*	~0,0205 ±0,0010 ^{aijkl}	~0,0176 ±0,0002 ^{aijkl}
MP	0,0524 ±0,0007 ^a	0,1262 ±0,0054 ^{bimno}	0,1344 ±0,0106 ^{bimno}
FE	0,2992 ±0,0167 ^b	0,2649 ±0,0056 ^{cjmpq}	0,2535 ±0,0122 ^{cjmpq}
CMI/MI	0,0005 ±0,00001 ^c	0,0004 ±0,00001 ^{dknpr}	0,0006 ±0,00001 ^{dknpr}
DMDMH	*	*	*
IMU	*	*	*
SD	0,5420 ±0,0384 ^{dh}	0,9186 ±0,0196 ^{es}	0,6379 ±0,0328 ^{es}
BA	1,2662 ±0,0201 ^e	~3,4591 ±0,3790 ^f	~3,0374 ±0,3481 ^f
BAC	*	*	*
CG	0,1280 ±0,0084 ^f	~0,0969 ±0,0036 ^{gloqr}	~0,0952 ±0,0020 ^{gloqr}
SB	0,5032 ±0,0114 ^{gh}	0,9075 ±0,0536 ^{hs}	0,8952 ±0,0740 ^{hs}
EEG	*	*	*

Resultados expressos como média de três experimentos independentes ± desvio padrão.

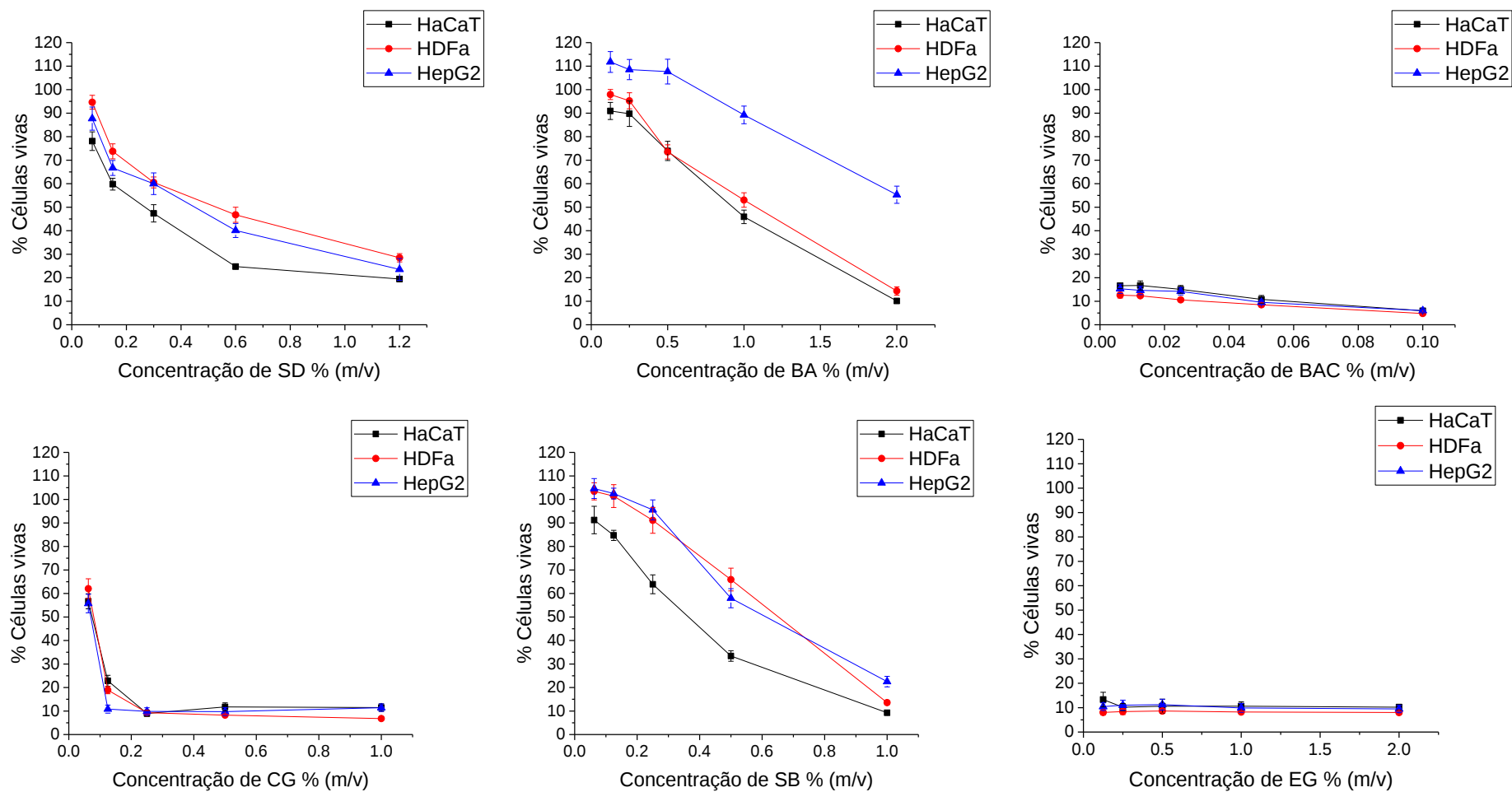
*Inibiu mais de 30% da viabilidade celular na menor concentração testada. Letras iguais indicam valores significativamente iguais (*One-way ANOVA*, pós teste Tukey, $p < 0,05$). Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes (*One-way ANOVA*, pós teste Tukey, $p < 0,05$). PP: Propilparabeno; MP: Metilparabeno; FE: Fenoxietanol; CMI/MI: Metilcloroisotiazolinona e metilisotiazolinona; DMDMH: DMDM hidantoína; IMU: Imidazolidinil ureia; SD: Dehidroacetato de sódio; BA: Álcool benzílico; BAC: Cloreto de benzalcônio; CG: Caprilil glicol; SB: Benzoato de sódio; EEG: Etilhexilglicerina. Fonte: A autora.

Figura 5. Curvas de viabilidade celular (Metodologia com o corante MTT)



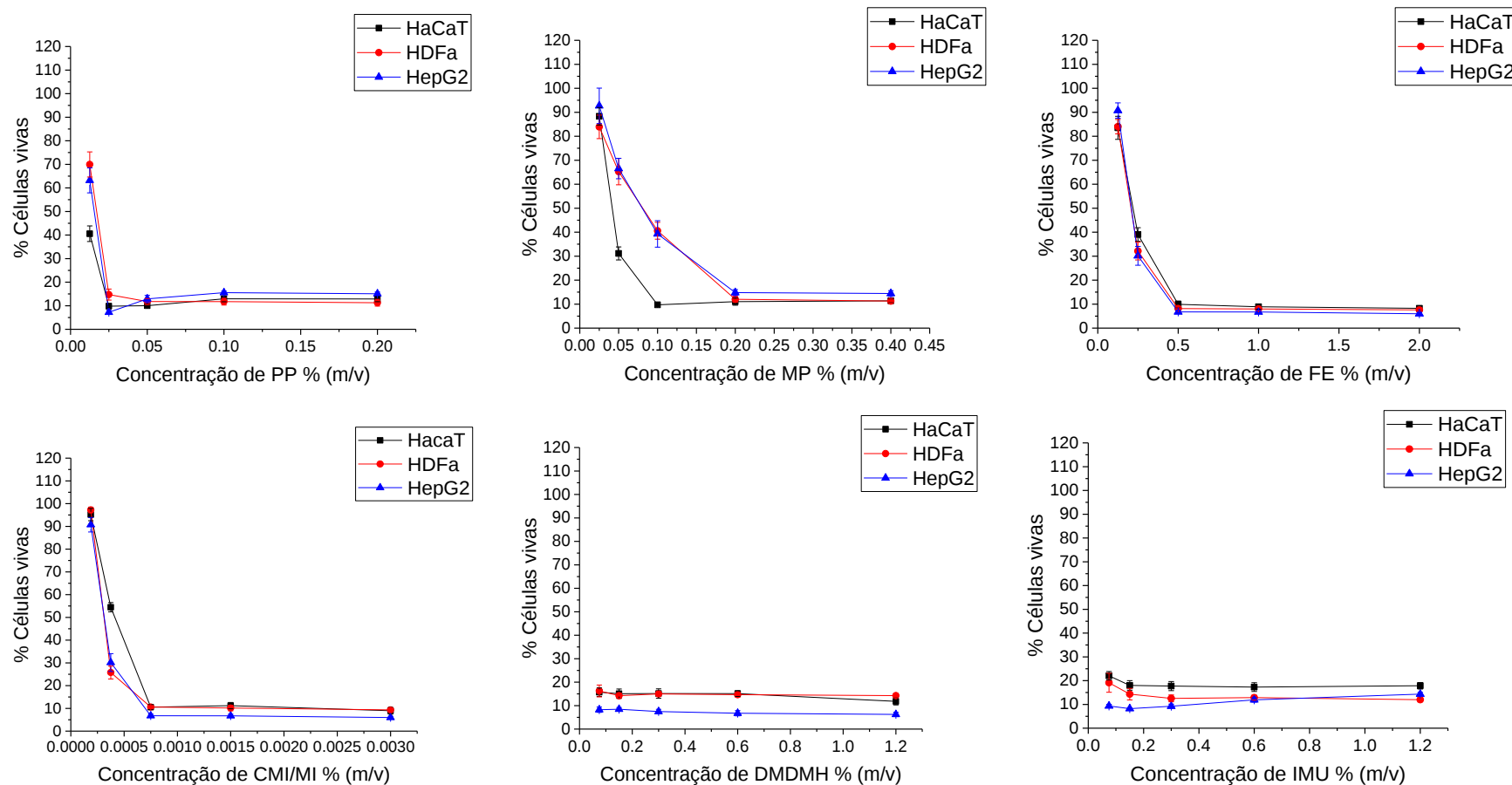
PP: Propilparabeno; MP: Metilparabeno; FE: Fenoxietanol; CMI/MI: Metilisotiazolinona e metilcloroisotiazolinona; DMDMH: DMDM hidantoína; IMU: Imidazolidinil ureia.

Continuação da Figura 5.



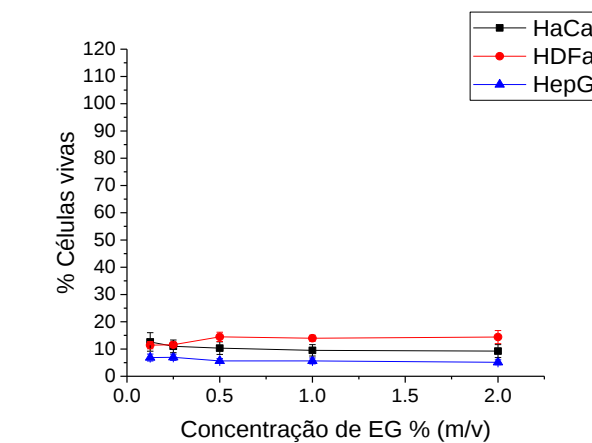
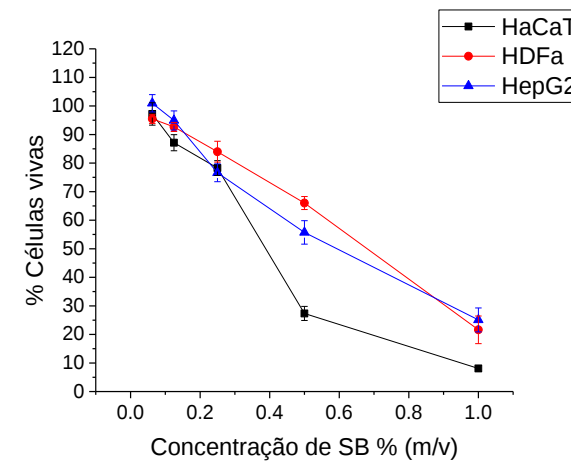
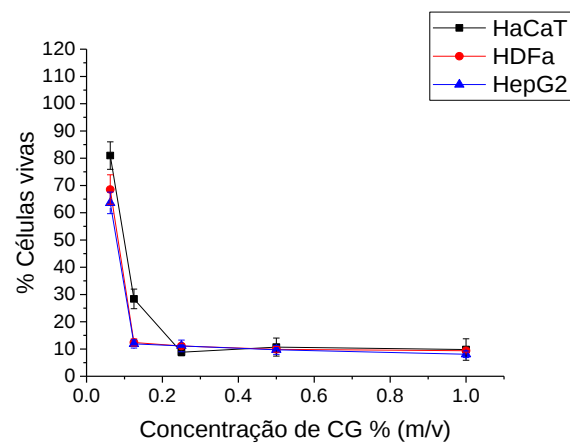
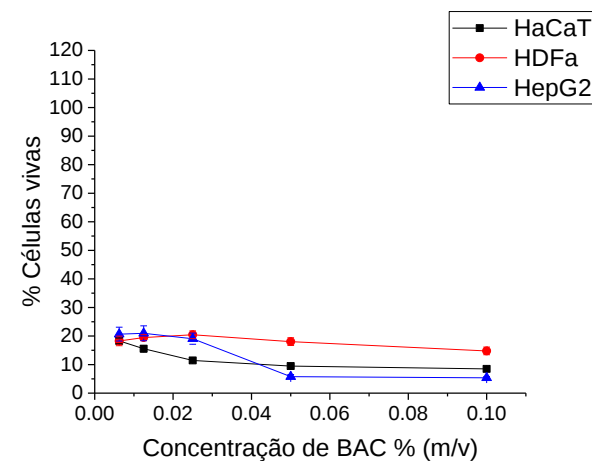
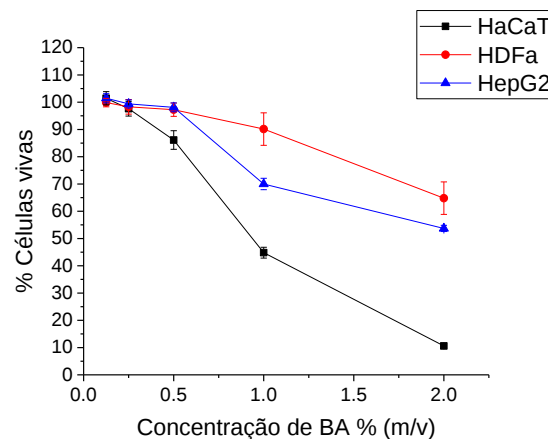
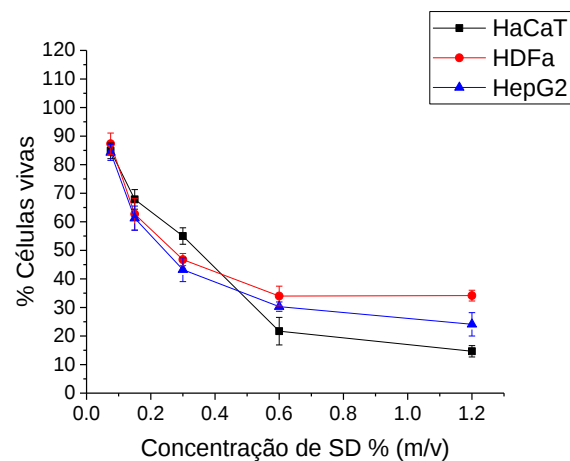
SD: Dehidroacetato de sódio; BA: Álcool benzílico; BAC: Cloreto de benzalcônio; CG: Caprilil glicol; SB: Benzoato de sódio; EG: Etilhexilglicerina.

Figura 6. Curvas de viabilidade celular (Metodologia com o corante NR)



PP: Propilparabeno; MP: Metilparabeno; FE: Fenoxietanol; CMI/MI: Metilisotiazolinona e metilcloroisotiazolinona; DMDMH: DMDM hidantoína; IMU: Imidazolidinil ureia.

Continuação da Figura 6.



SD: Dehidroacetato de sódio; BA: Álcool benzílico; BAC: Cloreto de benzalcônio; CG: Caprilil glicol; SB: Benzoato de sódio; EG: Etilhexilglicerina.

O princípio dos 3Rs foi elaborado, há mais de 60 anos, como um marco para a pesquisa animal e, ainda assim, muitos destes princípios são válidos até hoje. As espécies animais evoluíram para preencher nichos ambientais específicos e têm origens genéticas, fisiológicas e metabólicas divergentes. Isso é ilustrado pela alta taxa de falhas de candidatos a medicamentos durante os testes clínicos, devido à falta de eficácia em humanos e à identificação de níveis de toxicidade inaceitáveis, não identificados anteriormente, em testes pré-clínicos, em animais; portanto, se mamíferos não humanos são ruins para a previsão de toxicidade, com as células derivadas deles não se pode esperar que tenham um melhor desempenho (JENNINGS, 2015). Em alguns ensaios de citotoxicidade, são utilizadas células derivadas de animais, como a Balb/3T3 clone A31, um fibroblasto embrionário de camundongo; contudo, neste trabalho foram utilizadas linhagens celulares humanas para melhor transposição dos resultados.

Através do levantamento bibliográfico realizado, verificou-se que os dados publicados para os conservantes selecionados são limitados. Muitos destes dados são antigos, datados de 1970 a 1990, com testes realizados em animais, e a literatura disponível mostra que poucos dados novos foram publicados para estas substâncias (DEPA, 2015). Estes argumentos reforçam a necessidade de se complementar e aprimorar a avaliação da segurança de conservantes disponíveis no mercado, por meio de métodos alternativos ao uso de animais.

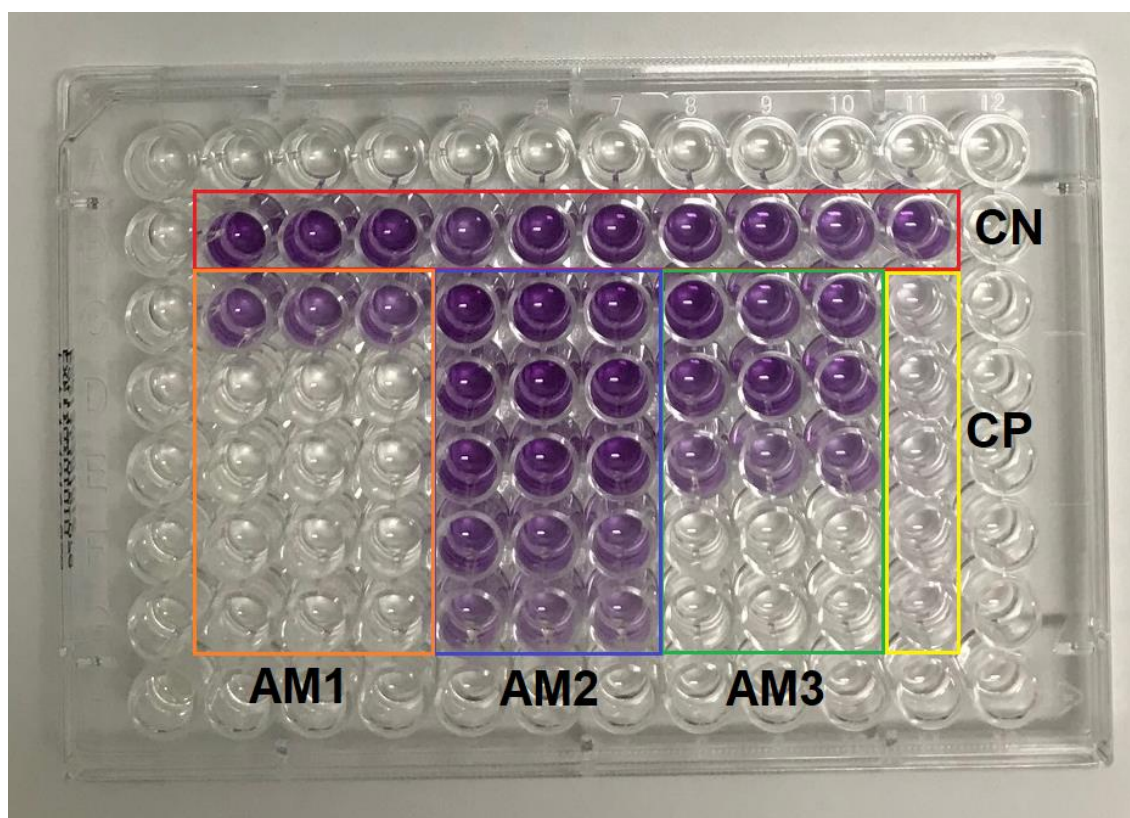
Os estudos de citotoxicidade são um passo inicial útil para determinar o potencial de toxicidade de substâncias químicas. Sua avaliação é essencial para o desenvolvimento bem-sucedido de uma preparação farmacêutica ou cosmética (MCGAW; ELGORASHI; ELOFF, 2014).

Em algumas situações, os resultados dos ensaios de citotoxicidade *in vitro* podem não estar diretamente relacionados aos resultados obtidos *in vivo*; entretanto, pode-se supor que, se dada substância induz uma reação citotóxica em testes envolvendo cultura de células, é provável que irá demonstrar potencial citotóxico quando aplicada em tecidos vivos (OSORIO et al., 1998); contudo, é indispensável a realização de outros ensaios *in vitro* ou *in silico* para melhor avaliar desfechos como corrosão e irritação da pele. Os resultados da avaliação da citotoxicidade *in vitro* são

utilizados para determinar a toxicidade e para estimar os valores de IC_{30} e IC_{50} ou qualquer outro valor de inibição de substâncias químicas.

O corante MTT quando metabolizado pela succinato desidrogenase, presente nas mitocôndrias de células viáveis, transforma o MTT, de coloração amarela e solúvel em água, em um derivado azul de formazana insolúvel no meio. A quantidade de formazana produzida é proporcional ao número de células viáveis restantes em uma cultura (MOSMANN, 1983; TRIGLIA et al., 1991).

Figura 7. Placa de 96 poços utilizada na avaliação da citotoxicidade por meio da metodologia com o corante MTT



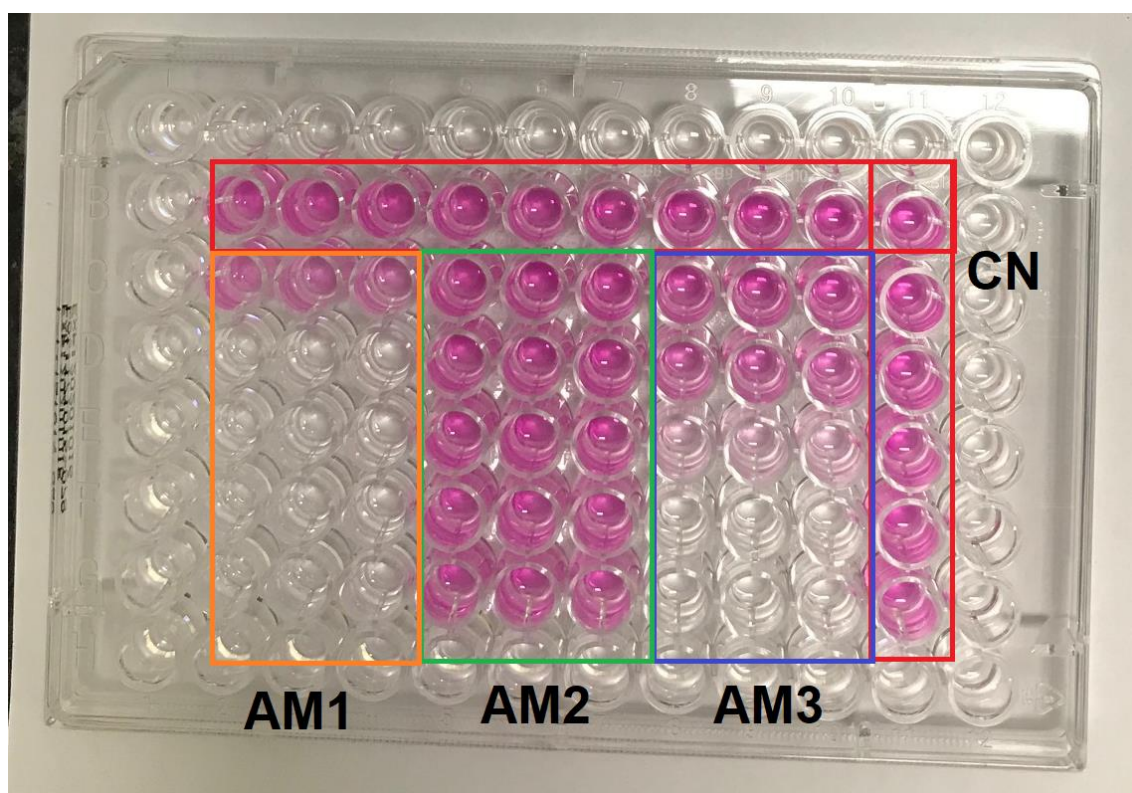
CN: controle negativo; CP: controle positivo; AM1: amostra 1; AM2: amostra 2; AM3: amostra 3.

Fonte: A autora.

O ensaio de captação de vermelho neutro é baseado na capacidade das células viáveis incorporarem e ligarem o corante vital solúvel em água. Este corante, fracamente catiônico, penetra nas membranas celulares por difusão passiva não iônica e concentra-se nos lisossomos, aos quais se liga, por ligações hidrofóbicas eletrostáticas, aos grupos aniônicos e/ou fosfato da matriz lisossômica. Substâncias

que danificam a superfície celular e as membranas lisossômicas podem inibir a incorporação do corante. A quantidade do corante vermelho neutro absorvida por uma cultura é, portanto, proporcional ao número de células viáveis (REPETTO; DEL PESO; ZURITA, 2008; TRIGLIA et al., 1991).

Figura 8. Placa de 96 poços utilizada na avaliação da citotoxicidade dos conservantes por meio da metodologia com o corante NR

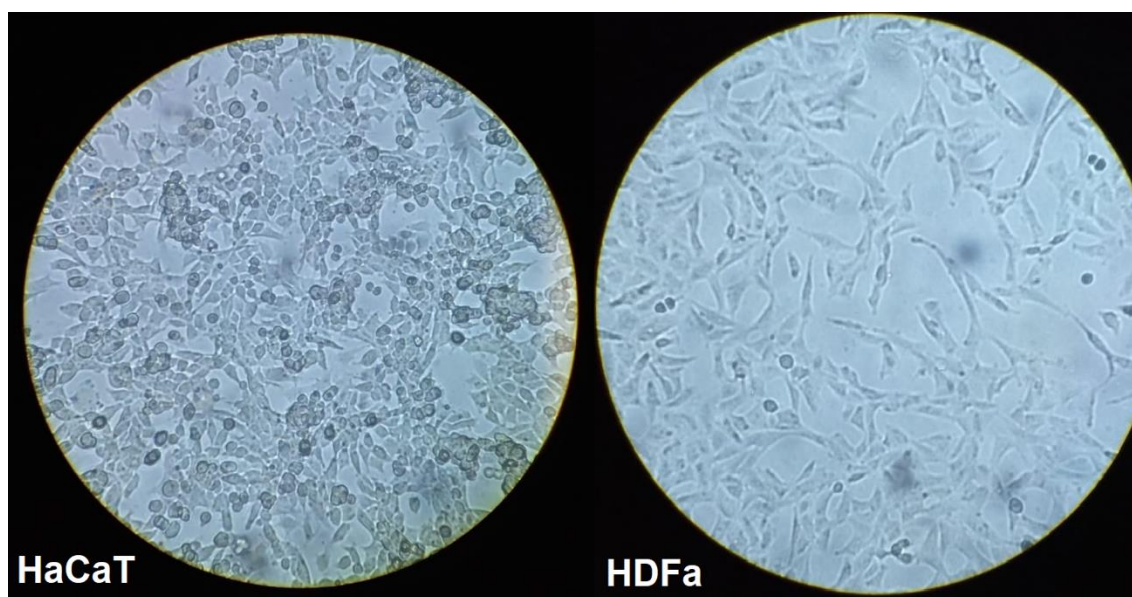


CN: controle negativo; AM1: amostra 1; AM2: amostra 2; AM3: amostra 3. Fonte: A autora.

Os queratinócitos são um alvo biologicamente relevante para irritantes de pele, pois são as primeiras células vivas que entram em contato, topicamente, com as substâncias aplicadas. Além disso, as células HaCaT apresentam várias características morfológicas e funcionais típicas dos queratinócitos epidérmicos normais, tornando-as um bom modelo para testes de toxicidade cutânea. Em ensaios realizados em cultura de monocamada, com um painel de irritantes de pele e mensurando a redução do MTT como desfecho de viabilidade, as células HaCaT exibiram uma classificação de toxicidade muito semelhante à dos queratinócitos normais, indicando que estas células podem ser boas candidatas para avaliar a irritação e toxicidade (TAOFIQ et al., 2019;

VAN DE SANDT et al., 1999). As linhagens celulares HaCat e HDFa (Figura 9) foram escolhidas por estarem presentes na epiderme e na derme humana, já que os cosméticos são produtos de uso externo, aplicados topicamente sobre a pele.

Figura 9. Células HaCaT e HDFa



Fonte: A autora.

A célula HepG2 (Figura 10) é uma linhagem de carcinoma hepatocelular humano metabolicamente competente e amplamente aplicada para simular a função hepática do organismo humano *in vitro*, mostrando atividade das enzimas das fases I e II, incluindo as enzimas do citocromo P450, sendo utilizadas para avaliar os efeitos de genotoxicidade e anti genotoxicidade de diferentes compostos. O uso das células HepG2 para analisar matérias primas cosméticas pode parecer desnecessário, pois é esperado que substâncias ativas cosméticas não penetrem na pele; no entanto, considerando a ampla aplicação de ensaios *in vitro* para testar a penetração cutânea de produtos cosméticos, o uso dessa linhagem se torna recomendado (BAUMANN; RICHARDS; GAULDIE, 1987; CHIARI et al., 2012; WILKENING; STAHL; BADER, 2003).

Antes da realização dos ensaios de citotoxicidade, foi realizado o teste de exclusão do corante azul de tripano, como descrito em Métodos no item 3.2.1.1. Este ensaio foi utilizado para determinar o número de células viáveis presentes na

suspensão celular que, posteriormente, foi plaqueada. O ensaio se baseia no princípio de que as células vivas possuem membranas celulares intactas que excluem certos corantes, como o azul de tripano, enquanto as células mortas, não (STROBER, 2015).

Figura 10. Célula HepG2



Fonte: A autora.

O IC_{50} (Tabelas 3 e 4) foi calculado como um parâmetro para comparação com outros trabalhos, pois este valor costuma ser mais encontrado na literatura. De acordo com a ISO 10993-5, uma redução da viabilidade celular em mais de 30% é considerada um efeito citotóxico (ISO, 2009). Por este motivo, foi realizado o cálculo do IC_{30} (Tabelas 5 e 6), que reflete a concentração capaz de inibir 30% da viabilidade celular, sendo considerada não citotóxica.

Apenas o conservante BA apresentou o valor do IC_{30} maior que a concentração máxima permitida (1%) em todas as condições estudadas, ou seja, mesmo utilizando a concentração máxima desse conservantes, a viabilidade celular se manteve igual ou maior que 70%. SB apresentou o valor do IC_{30} maior que a concentração máxima

apenas para a concentração máxima permitida para produtos não enxaguáveis (0,5%). O conservante SD apresentou o IC_{30} menor que a concentração máxima apenas na linhagem HaCaT, SD foi associado à dermatite de contato alérgica e danos celulares em diversos trabalhos publicados (CHEN et al., 2019; FOTI et al., 2012, 2016; MILPIED et al., 2011)

PP e MP foram mais citotóxicos na linhagem HaCaT. No caso do PP, não foi possível calcular os valores de IC_{50} e IC_{30} devido à acentuada citotoxicidade nesta linhagem celular. Considerando todos os resultados, seria indicado utilizar PP e MP a uma concentração de aproximadamente 0,02 e 0,1%, respectivamente. Resultados citotóxicos também foram observados em um trabalho que avaliou a toxicidade de MP em fibroblastos derivados da derme humana. Na concentração mais baixa (0,01%), não houve alteração significativa na viabilidade celular, mas em concentrações mais altas 0,03% e 0,05%, ocorreu um decréscimo na viabilidade celular de 40 e 60%, respectivamente (MAJEWSKA et al., 2017).

FE, CMI/MI e CG apresentaram valores de IC_{30} menores que a concentração máxima, o que implica em concentrações de uso nas quais a viabilidade celular fica abaixo de 70%. Em um estudo realizado com FE e CMI/MI, em linhagem celular de leucemia humana (HL60), foi demonstrado que, na menor concentração analisada (0,01% para FE e 0,001% para CMI/MI), a viabilidade celular se manteve acima de 70%. Nas maiores concentrações (0,5 e 1% para FE e 0,01% para CMI/MI), a viabilidade celular ficou abaixo de 30% (ANSELMi et al., 2002).

DMDMH, IMU, BAC e EEG apresentaram valores de viabilidade celular baixos, inviabilizando os cálculos de IC_{50} e IC_{30} ; contudo, foram considerados citotóxicos nas concentrações analisadas.

Devido à ação antimicrobiana, é esperado que os conservantes apresentem toxicidade a células em cultura. Estudos demonstraram que substâncias utilizadas como conservantes são citotóxicas e induzem apoptose celular (ANSELMi et al., 2002; CARVALHO et al., 2012; MAJEWSKA et al., 2017); entretanto, é importante ressaltar que estas substâncias costumam ser utilizadas em baixas concentrações nos produtos cosméticos e, portanto, esta condição deve ser considerada na avaliação do risco.

4.1.2. Avaliação de dano ocular (*Short Time Exposure* – STE)

Os resultados foram expressos como a média de três ensaios independentes para as duas concentrações utilizadas no ensaio (5% e 0,05%) $\pm$ DP na Tabela 7.

Os únicos conservantes que não foram solúveis no soro fisiológico foram o propilparabeno e o metilparabeno, sendo que, para estes conservantes, foi utilizado o óleo mineral, como solvente.

Apenas 2 dos 12 conservantes avaliados neste trabalho não puderam ser classificados através da metodologia STE, caprilil glicol e etilhexilglicerina, que apresentaram uma viabilidade celular abaixo de 70% na concentração de 5% e acima de 70% na concentração de 0,05%. Dos demais conservantes, 4 foram classificados como categoria 1 e os 6 restantes como não categoria.

Tabela 7. Classificação dos conservantes pela metodologia STE

% Viabilidade celular $\pm$ DP		Conservante	UN GHS Classificação
5%	0,05%		
80,10 $\pm$ 2,86%	90,96 $\pm$ 2,46%	Propilparabeno	Não categoria
75,79 $\pm$ 3,97%	77,80 $\pm$ 3,99%	Metilparabeno	Não categoria
31,49 $\pm$ 2,14%	48,23 $\pm$ 3,23%	Fenoxietanol	Categoria 1
24,14 $\pm$ 2,94%	36,26 $\pm$ 4,64%	Metilcloroisotiazolinona e metilisotiazolinona	Categoria 1
85,33 $\pm$ 3,81	91,25 $\pm$ 3,56	DMDM hidantoína	Não categoria
92,35 $\pm$ 1,54	95,96 $\pm$ 3,25	Imidazolidinil ureia	Não categoria
77,07 $\pm$ 4,60%	88,51 $\pm$ 2,92%	Dehidroacetato de sódio	Não categoria
53,21 $\pm$ 2,76%	65,96 $\pm$ 3,18%	Álcool benzílico	Categoria 1
20,70 $\pm$ 2,46%	29,13 $\pm$ 3,61%	Cloreto de benzalcônio	Categoria 1
62,30 $\pm$ 3,30%	88,88 $\pm$ 2,77%	Caprilil glicol	Nenhuma predição pode ser realizada
80,69 $\pm$ 2,63%	91,78 $\pm$ 4,63%	Benzoato de sódio	Não categoria
56,8 $\pm$ 3,70%	77,15 $\pm$ 2,13	Etilhexilglicerina	Nenhuma predição pode ser realizada

DP: Desvio padrão; UN GHS: *United Nations - Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals*. Fonte: A autora.

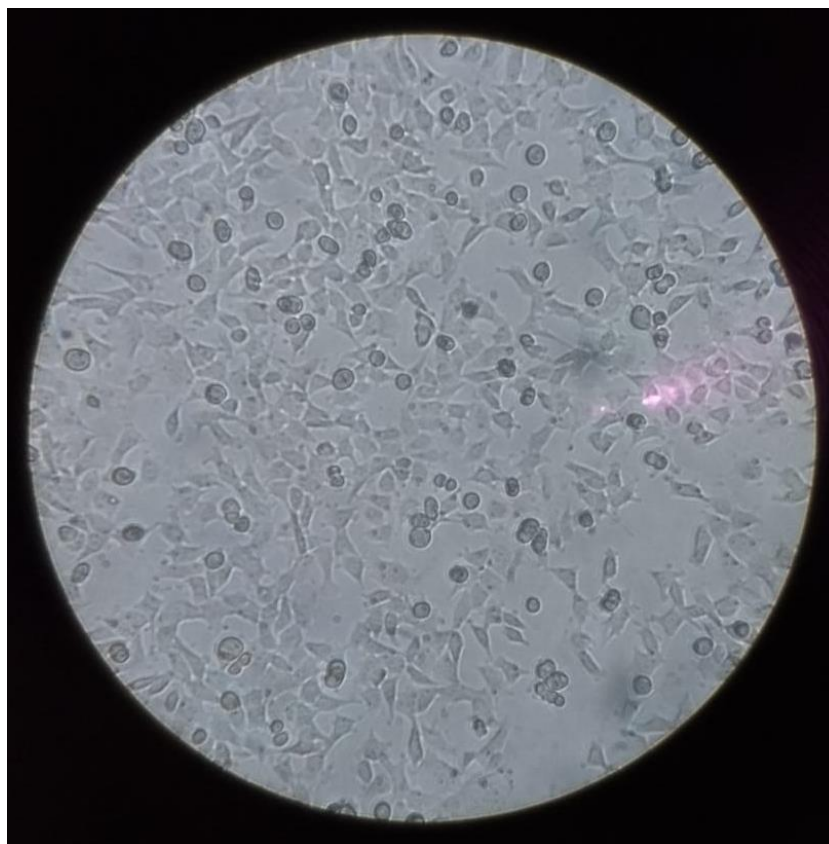
A avaliação do potencial de irritação ocular é uma etapa necessária na avaliação da segurança de produtos industriais e de consumo e, portanto, faz parte dos requisitos regulamentares internacionais para o teste de produtos químicos (ADRIAENS et al., 2018). O ensaio STE pode ser usado em certas circunstâncias e com limitações específicas para classificação de perigo para os olhos e rotulagem de produtos químicos, como descrito na OECD TG 491 (OECD, 2018e). A metodologia foi adotada pela OCDE para identificar, sem mais testes: (i) produtos químicos que induzem sérios danos aos olhos, de acordo com o GHS (UN GHS Categoria 1) e (ii) produtos químicos que não requerem classificação para lesões oculares graves/irritação ocular (UN GHS Não Categoria). O ensaio STE utiliza a linhagem celular SIRC (Figura 11), um fibroblasto isolado da córnea de um coelho em 1957 e, deste modo, o ensaio se correlaciona com o teste de Draize (OECD, 2018e).

Para as matérias primas não diluídas testadas *in vivo* no teste Draize, existe uma correlação com a concentração de 5% do teste *in vitro* STE (precisão: 89,6%). Para os materiais testados como uma solução de 10% no teste de Draize, a concentração testada no STE de 0,05% corresponde a esses resultados (precisão: 80,0%) (TAKAHASHI et al., 2008).

Vários estudos de irritação ocular realizados em coelhos foram conduzidos com produtos contendo metilparabeno (MP), etilparabeno, propilparabeno (PP) e/ou butilparabeno em concentrações de 0,1% a 0,8%. A maioria dos produtos não produziu sinais de irritação nos olhos, enquanto outros produtos produziram irritação ocular leve ou mínima. PP é classificado como não irritante aos olhos e o MP como ligeiramente irritante. MP produziu uma leve irritação transitória, com uma pontuação de irritação ocular de 1/110 no dia 1, quando aplicado nos olhos de coelhos (CIR, 2008a). PP e MP foram classificados como UN GHS Não Cat. e a viabilidade celular ficou acima de 70%, nas duas concentrações analisadas.

FE é classificado como irritante ocular (UN GHS Categoria 2A) por meio de metodologias *in vivo* (ANDERSEN, F. A., 2011; SCCS, 2016a). Ensaio *in vitro* de irritação ocular realizado em ovo embrionado de galinha (HET-CAM; *Hen's egg-chorioallantoic membrane*), classificou FE como irritante ocular severo (CORRÊA et al., no prelo). Essa característica se manteve no ensaio STE, no qual FE foi classificado como UN GHS Cat. 1.

Figura 11. Célula SIRC



Fonte: Foto da autora.

As izotiazolinonas, CMI/MI em uma proporção de 3:1, são irritantes e/ou corrosivas em altas concentrações. Em teste de irritação ocular, realizado *in vivo*, a uma concentração de 1,5%, CMI/MI foi classificada como corrosiva (CIR, 2008a; SCCS, 2009). Em ensaio *in vitro*, realizado por meio do ensaio HET-CAM, CMI/MI foi classificada como irritante ocular severo (CORRÊA et al., no prelo). Neste trabalho, CMI/MI foi classificada por meio do ensaio STE como substância química que induz sérios danos aos olhos (UN GHS Cat. 1).

Os conservantes DMDMH e IMU foram classificados como UN GHS Não Cat. por meio do ensaio STE. Ensaio realizado *in vivo*, para ambos os conservantes, corroboraram com esse resultado. DMDMH foi classificada como minimamente irritante ou não irritante ocular e IMU, a uma concentração de 5%, foi classificada como não tóxica aos olhos (BERKE; ROSEN, 1970; CIR, 1988).

SD é utilizado em uma ampla variedade de produtos, incluindo os para banho, os para cuidados com a pele, para bronzeador, em fragrâncias e preparações para o

cabelo, além de maquiagem para olhos e rosto. Ensaios *in vivo* classificaram SD como minimamente irritante, de acordo com a classificação de Draize; contudo, a *Cosmetic Ingredient Review* (CIR) concluiu que novos testes deveriam ser conduzidos (CIR, 1985). SD foi classificado como UN GHS Não Cat. neste trabalho, sendo seguro para uso em produtos que possam entrar em contato com olhos, nas concentrações permitidas (ANVISA, 2021; EUROPEAN UNION, 2009).

A toxicidade ocular de BA foi avaliada *in vivo* em 9 coelhos, em várias concentrações (0,0073%, 0,022%, 0,073%, 0,222% e 0,733%). Nas menores concentrações testadas (0,0073% e 0,022%), nenhuma alteração patológica notável foi identificada; no entanto, foi observada toxicidade ocular nas concentrações restantes, sendo que alterações na retina externa incluíram perda e encurtamento de segmentos externos e receptores (MORRISON et al., 2006). E, ainda, de acordo com o relatório de avaliação inicial da OECD SIDS sobre benzoatos, o álcool benzílico (4% em solução aquosa) é irritante para os olhos de coelhos (JOHNSON et al., 2017). Neste trabalho, BA foi classificado como UN GHS Cat. 1, categoria de produtos químicos que induzem sérios danos aos olhos.

BAC é classificado como UN GHS Cat. 1 pelas metodologias *in vivo* (CIR, 1989), e inclusive é uma das substâncias da lista de proficiência do ensaio STE. No ensaio de irritação ocular realizado, BAC também foi classificado como categoria 1. O BAC vem sendo utilizado, atualmente, para substituir o etanol em produtos antissépticos, devido à pandemia da COVID-19, conferindo ao produto um apelo "livre de álcool" (JING et al., 2020).

Nos últimos anos, tem aumentado o uso de ingredientes multifuncionais com atividade antimicrobiana e o apelo de *marketing* "nonpreservative", para etilhexilglicerina (EEG), os 1,2 dióis, pentileno glicol, 1,2-hexanediol e o caprilil glicol (CG). CG é o mais popular, e costuma não ser vendido como substância pura, mas sim em *blends* dissolvido em outros produtos químicos, como fenoxietanol, álcool benzílico ou EEG (STEINBERG, 2019). O potencial de irritação ocular de CG foi avaliado pelo ensaio *in vitro* HET-CAM, em concentrações de 1 e 3% em óleo neutro, sendo classificado como não irritante; entretanto, outro estudo com essa mesma metodologia, avaliou uma mistura de CG com 1,2-hexanediol (50:50, m/m), sendo a mistura classificada como um irritante ocular grave, em uma concentração de teste de 1%, em

solução aquosa (concentração efetiva por ingrediente = 0,5%) (JOHNSON et al., 2012). Ensaio realizado *in vivo* para avaliar o potencial de irritação ocular da EEG demonstraram graves danos aos olhos dos coelhos, quando aplicada não diluída e levemente irritante quando aplicada em solução aquosa a 5% (JOHNSON et al., 2013).

No ensaio de irritação ocular, realizado *in vitro* (STE) EEG e CG apresentaram a viabilidade celular < 70% na concentração de 5% e > 70% na concentração de 0,05%. Deste modo, não foi possível realizar uma predição, ficando fora do domínio de aplicabilidade da metodologia; contudo, é possível notar uma correlação do resultado *in vitro* com os dados *in vivo* para a EEG que, quando aplicada em uma solução aquosa a 5%, nos olhos dos coelhos, ela também foi classificada como levemente irritante (JOHNSON et al., 2013) e, nesta mesma concentração, no ensaio STE, a viabilidade celular ficou abaixo de 70%. CG e EEG são considerados ingredientes multifuncionais, por possuírem outras propriedades além da antimicrobiana, como ação hidratante, umectante, emoliente, surfactante e moduladores da viscosidade. O atributo da multifuncionalidade é visto com bons olhos pela indústria cosmética, pois as formulações podem ser otimizadas e se tornarem minimalistas; ou seja, com menos ingredientes. O minimalismo é uma das tendências mais contundentes entre os consumidores, predominantemente entre os formadores de opinião com idade de 20 a 29 anos (MENDONÇA, 2019). EEG na concentração de 1% costuma ser utilizada como *booster* de outros conservantes, enquanto uma formulação contendo 1,5% de EEG e 0,5% de CG é considerada um cosmético auto-preservante, conferindo o *claim* "livre de conservantes" (HERMAN, 2019).

Em um estudo realizado por Adriaens et al. (2018), foram avaliadas 80 substâncias químicas, dentre elas o SB que, assim como neste trabalho, foi classificado como UN GHS Não Cat. No entanto, um ensaio *in vivo* com aplicação de 60 mg de SB em pó, no saco conjuntival de três coelhos, classificou-o como ligeiramente irritante para os olhos do coelho, sem efeitos na córnea ou íris, mas o suficiente para justificar a classificação na Categoria 2 (efeitos oculares reversíveis). Outro estudo que aplicou 50 mg de SB em pó, no saco conjuntival de coelhos (número de animais não especificado) classificou SB como não irritante aos olhos (SCCP, 2005).

O teste Draize (OECD TG 405) realizado em coelhos, além de ser cruel, possui muitas limitações, como a dificuldade e subjetividade em interpretar os resultados. Metodologias *in vitro*, nas quais é possível mensurar os resultados, quantitativamente, oferecem maior segurança para fins de avaliação de perigos à saúde humana; porém, existe a dificuldade em se prever a categoria intermediária de irritação ocular (UN GHS Cat. 2A e 2B), por meio das atuais metodologias *in vitro*, mas esta limitação não tem impedido a indústria cosmética de avaliar este desfecho. Existem diferentes estratégias de testes que podem ser utilizadas englobando as metodologias *in vitro* e *in silico*, de acordo com a substância em análise (OECD, 2019e).

4.2. Avaliação *in silico*

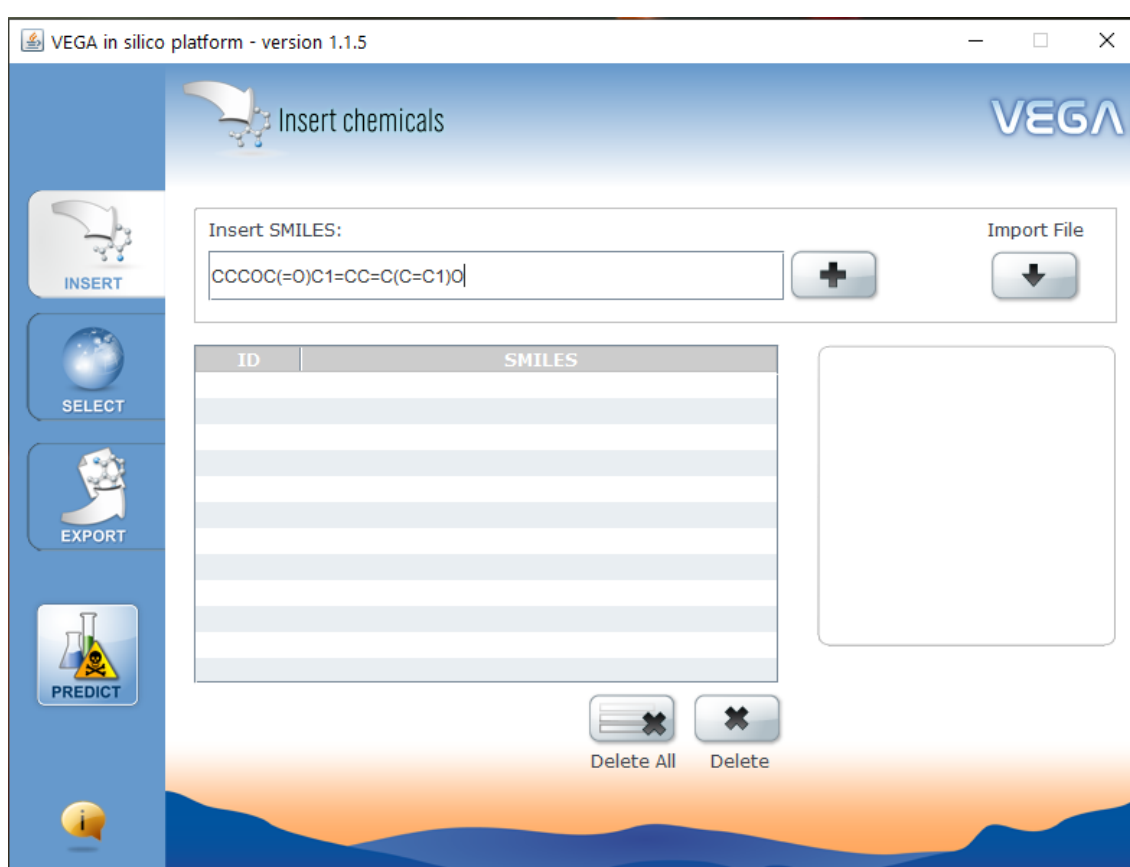
Os resultados das predições *in silico* estão disponíveis nas Tabelas 8 a 12.

Com a proibição dos testes em animais para fins cosméticos na União Europeia (EUROPEAN UNION, 2009), por diferentes razões (éticas, sociais, científicas e econômicas), os 3Rs foram reduzidos para apenas 1R, ou seja, *replacement* (substituição). Consequentemente, a pressão por metodologias *animal-free* aumentou, consideravelmente, para a avaliação da segurança de cosméticos. Em consonância com essas medidas, o SCCS leva em consideração para a avaliação da segurança das substâncias dos Anexos do Regulamento (CE) No. 1223/2009 (tinturas/corantes capilares, conservantes e filtros UV), todas as informações toxicológicas disponíveis, consistindo em dados *in chemico* (dados físico-químicos) e *in silico* (computacional), incluindo os modelos QSAR, *read-across*, agrupamento, PBPK e PBTK. Estes ensaios, no entanto, precisam ser combinados em uma abordagem de peso de evidência com resultados obtidos por meio de testes *in vitro/ex vivo* e quaisquer dados de animais existentes, obtidos antes dos prazos legislativos e, sempre que disponíveis, com informações geradas em estudos humanos, por meio de ensaios clínicos e biomonitoramento (ROGIERS et al., 2020).

Os modelos *in silico* estão mudando rapidamente de um conjunto de ferramentas separadas para uma arquitetura complexa, no qual diferentes módulos de *software* são integrados. Isso segue o esforço para se posicionar próximos aos requisitos regulamentares e industriais, que se referem à segurança de substâncias química

(ROGIERS et al., 2020). A plataforma VEGA (Figura 12), utilizada neste trabalho, foi desenvolvida para integrar modelos *in silico* QSAR e *read-across*, promovendo mais confiabilidade aos resultados, por meio da integração de vários dados disponíveis. A ferramenta, ainda, fornece uma medida do índice do domínio de aplicabilidade (ADI) e usa esse peso para integrar os resultados de diferentes modelos utilizados na predição (BENFENATI et al., 2019).

Figura 12. Layout do software VEGA HUB

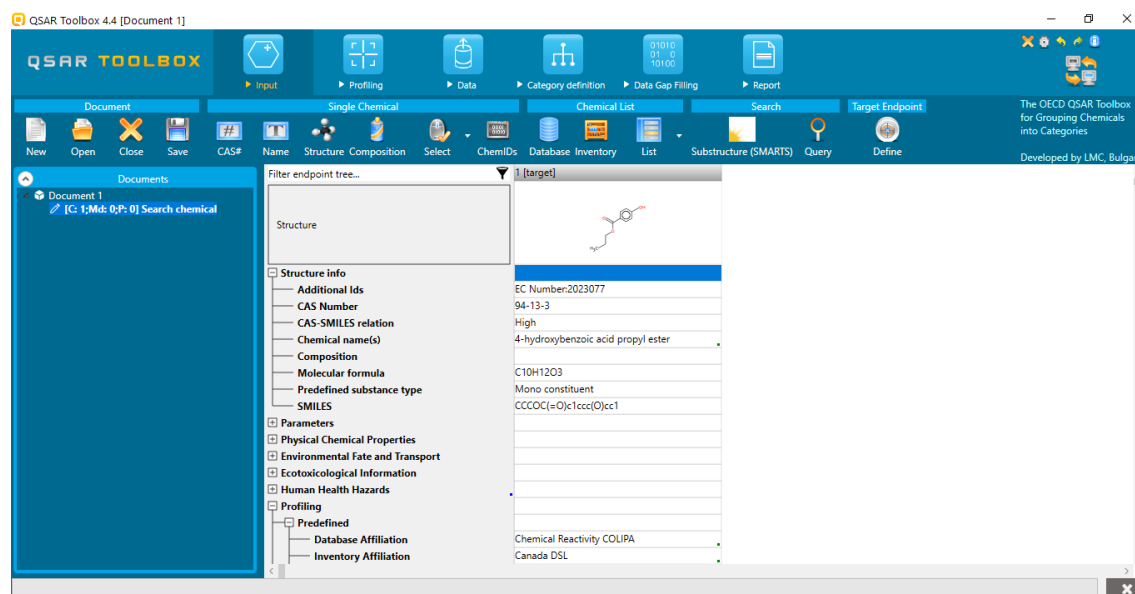


Fonte: VEGA versão 1.1.5

O QSAR *toolbox* (Figura 13) oferece suporte para avaliação de perigo de substâncias químicas, de forma reproduzível e transparente. Oferece funcionalidades para recuperar dados experimentais, simular o metabolismo e criar perfis de propriedades de substâncias químicas. Estas informações e ferramentas podem ser usadas para encontrar análogos estruturais e mecanisticamente definidos, além de categorias químicas que podem ser fontes para leitura transversal e análise de

tendência (*trend analysis*) para preenchimento de lacunas de dados (*data gap filling*). É possível, também, realizar análise preditiva QSAR e *read-across*. O QSAR é um modelo matemático que relaciona um ou mais parâmetros quantitativos, que são derivados da estrutura química, a uma medida quantitativa de uma propriedade ou atividade. Os modelos QSAR são desenvolvidos com base em várias abordagens estatísticas, incluindo, mas não se limitando a: análise de regressão, métodos de classificação, máquina de vetores de suporte e redes neurais artificiais (ECHA, 2016). O *read-across* constitui outra estratégia para derivar pontos de referência ou pontos de partida para a caracterização de perigos de produtos químicos não testados, a partir dos dados experimentais disponíveis para compostos estruturalmente semelhantes (BENFENATI et al., 2019)

Figura 13. Layout do software OECD QSAR toolbox



Fonte: OECD QSAR toolbox 4.4

Com o avanço da tecnologia, os modelos disponíveis vão sendo aprimorados e se tornando mais específicos, como é o caso do PRED-SKIN, desenvolvido exclusivamente para avaliar a sensibilização da pele (Figura 14). O PRED-SKIN propõe uma abordagem abrangente, que integra vários modelos QSAR desenvolvidos com dados *in chemico* (DPRA), *in vitro* (KeratinoSens e h-CLAT), *in vivo* (LLNA) e humanos (*Human Repeated Insult Patch Test* [HRIPT] e *Human Maximization Test* [HMT]) e, por

fim, o modelo Bayesiano que integra previsões de todos os outros ensaios para uma avaliação de risco qualitativa integrativa (QRA) de sensibilização da pele com base no peso da evidência (WoE) (ALVES et al., 2018).

Figura 14. Exemplo de análise realizada no PRED-SKIN

Chemical Exposure

Molecular initiating event *in chemico*

Cellular response *in vitro*

Tissue / Organ response *in vivo*

Organism response *in vivo*

Pred-Skin 3.0 Outcome *in silico*

- Skin Penetration
- Electrophilic substance: directly or via auto-oxidation or metabolism

Covalent interaction with proteins in the skin (OECD442C)

Haptenation: covalent modification of epidermal proteins

Keratinocyte responses (OECD442D)

- Activation of inflammatory cytokines
- Induce cytoprotective genes

Dendritic cells (DCs) (OECD442E)

- Induction of inflammatory cytokines
- Mobilization of DCs

Proliferation of antigen-specific T cells (OECD429)

- Histocompatibility complex: representation by DCs
- Activation of T cells
- Proliferation of activated T cells

Inflammation upon challenge allergen

To maximise the use of existing knowledge, we also incorporate historical HRIPT (human repeated insult patch test) and HMT (human maximization test)

The Bayesian model is a consensus model integrating predictions from all the other assays for an integrative qualitative risk assessment (QRA) of skin sensitization based on the weight of evidence (WoE).

- Exposure consideration ?
- Physicochemical and Biopharmaceutical properties ?
- Skin Penetration ?
- Skin Metabolism ?

Prediction DPRA Non-Sensitizer (-)

(AD, Confiability)
(Inside, 93.9%)

Probability map

Prediction KeratinoSens Sensitizer (+)

(AD, Confiability)
(Inside, 97.1%)

Probability map

Prediction h-CLAT Sensitizer (+)

(AD, Confiability)
(Inside, 59.3%)

Probability map

Prediction LLNA Sensitizer (+)

(AD, Confiability)
(Inside, 53.1%)

Probability map

Prediction HRIPT/HMT Non-Sensitizer (-)

(AD, Confiability)
(Inside, 99.5%)

Probability map

Bayesian Outcome

Non-sensitizer (-)

(Confiability)
(High)

Low (-) confidence prediction for the Bayesian model means two or more individual predictions are in disagreement with Bayesian Outcome.

Fonte: Predskin.

A avaliação da irritação cutânea *in silico* (Tabela 8) foi realizada com o propósito de agregar, maior peso de evidência, aos resultados de citotoxicidade obtidos nas análises *in vitro*. Somente com os resultados obtidos com os ensaios com cultura de células, em monocamada, seria possível realizar uma superestimação do resultado; entretanto, para os conservantes CMI e IMU, nenhuma predição pode ser realizada, pois o modelo ficou fora do DA do método. MP e FE apresentaram resultados diferentes nas plataformas utilizadas; no entanto, levando em conta que o índice de confiança do IrriTest foi de 84% e 98% respectivamente. Além disso, ao se pensar no pior cenário de exposição, como populações sensíveis e crianças, a opção foi por considerar o MP e o FE como irritantes baseando-se na análise *in silico* realizada.

A sensibilização da pele é um passo fundamental na complexa reação inflamatória da pele imunomediada, chamada dermatite de contato alérgica (DCA)

(BRAGA et al., 2017). A DCA é uma reação de hipersensibilidade retardada induzida pelo contato repetido com sensibilizantes e, aproximadamente, 20% da população humana, em geral, sofre com esse efeito adverso (ALVES et al., 2018). As matérias primas que mais frequentemente causam reações alérgicas são as composições aromáticas (fragrâncias), metais e conservantes. A capacidade de uma substância química agir como sensibilizante é um dos ensaios realizados com mais frequência em animais (VUKMANOVIĆ; SADRIEH, 2017). O ensaio de linfonodo local murino (LLNA) é considerado o teste *in vivo* preferido para avaliar a potência dos produtos químicos em causar a sensibilização da pele (BRAGA et al., 2017); contudo, com a proibição dos testes em animais, é necessário avaliar o desfecho de sensibilização da pele por meio de metodologias alternativas sempre que possível. O teste do LLNA *in vivo* só costuma ser realizado como um último recurso, quando os ensaios *in vitro* e *in chemico* descritos na via de desfecho adverso (OECD, 2019b) não são suficientes para chegar a uma conclusão. Apesar de grandes progressos no desenvolvimento de metodologias alternativas para avaliar o potencial de sensibilização da pele por substâncias químicas, não há nenhum teste *in vitro* que se correlacione totalmente com os dados humanos (BRAGA et al., 2017), sendo necessário o uso de outras ferramentas como os modelos preditivos computacionais. Dentre os 13 conservantes avaliados neste trabalho, 10 foram classificados como positivo, neste desfecho, em todas ou em alguma plataforma *in silico* utilizada (Tabela 8). Dentre os conservantes classificados como sensibilizantes, estão as izotiazolinonas (CMI e MI), que foram avaliadas, separadamente, nas predições *in silico*. CMI e MI são classificadas como sensibilizantes, de acordo o regulamento europeu e, por esse motivo, só são permitidas em produtos enxaguáveis (EUROPEAN UNION, 2009; SCCS, 2009, 2015). Elas, também, foram as únicas classificadas como fototóxicas, por meio da análise no OECD QSAR (Tabela 8). Devido à característica sensibilizante desses conservantes, eles vêm sendo utilizados somente em produtos enxaguáveis, diminuindo, consideravelmente, a exposição e, conseqüentemente, o risco de toxicidade.

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

	Irritação da pele		Sensibilização da pele			Fototoxicidade
	OECD QSAR	IrriTest	OECD QSAR	VEGA	PRED-SKIN	OECD QSAR
PP	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
MP	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
FE	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
CMI	FD	FD	FD	Positivo	Positivo	Positivo
MI	FD	Positivo	FD	Positivo	Positivo	Positivo
DMDMH	FD	Negativo	FD	Positivo	Positivo	Negativo
IMU	FD	FD	Positivo	FD	Positivo	Negativo
SD	Negativo	FD	FD	Positivo	Positivo	Negativo
BA	FD	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
BAC	Positivo	Positivo	FD	FD	Negativo	Negativo
CG	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
SB	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
EEG	FD	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

PP: Propilparabeno; MP: Metilparabeno; FE: Fenoxietanol; CMI: Metilcloroisotiazolinona; MI: Metilisotiazolinona; DMDMH: DMDM hidantoína; IMU: Imidazolidinil ureia; SD: Dehidroacetato de sódio; BA: Álcool benzílico; BAC: Cloreto de benzalcônio; CG: Caprilil glicol; SB: Benzoato de sódio; EEG: Etilhexilglicerina; FD: Fora do domínio. Fonte: A autora.

Foram realizadas as predições *in silico* do desfecho de irritação ocular somente para os conservantes que não foram classificados pelo ensaio STE; ou seja, CG e EEG. O *software* OECD QSAR contém dois perfis relevantes para avaliação de danos oculares graves/irritação ocular, de acordo com as regras do BfR. O modelo é baseado no uso combinado de duas abordagens preditivas: i) regras de exclusão físico-química, para identificar produtos químicos que, provavelmente, não causam irritação ocular/potencial de lesão ocular grave; e ii) regras de inclusão estrutural (*Structure-Activity-Relationships* - SARs) para identificar produtos químicos com potencial de causar dano ocular grave e/ou irritação ocular. O modelo iS-Ocular é uma ferramenta computacional para predição de irritação ocular desenvolvida pela Altox, utilizando conhecimentos derivados de uma combinação de mecanismos por meio de alertas de ligação de proteínas e análise de moléculas, que podem atender às regras do BfR, tanto para as regras de exclusão físico-química, quanto para as regras de inclusão baseadas em estrutura, além de dados experimentais relacionados à irritação e corrosão ocular, rigorosamente curados. O resultado da análise é fornecido em uma tabela resumida com todas as previsões individuais, o domínio de aplicabilidade e dados relevantes para cada desfecho/método. CG foi classificado como "Não irritante" em ambos os modelos do OECD QSAR e Positivo (Cat. 2), ou seja, irritante pelo iS Ocular (Tabela 9). Com esses resultados conflitantes, o indicado seria seguir com uma abordagem *Bottom-up*, por meio de metodologia *in vitro*, para avaliar melhor o baixo potencial de irritação ocular sugerido pelo OECD QSAR; contudo, ensaios realizados *in vivo* demonstraram que CG não seria irritante ocular (JOHNSON et al., 2012). EEG foi classificada como irritante ocular (Tabela 9).

Tabela 9. Resultados das predições *in silico* para o desfecho de irritação ocular

	OECD QSAR <i>toolbox</i>		iS Ocular
	Regras de inclusão (BfR)	Regras de exclusão (BfR)	
CG	Não irritante	Não irritante	Positivo (Cat. 2)
EEG	FD	Irritante	Positivo (Cat. 1)

CG: Caprilil glicol; EEG: Etilhexilglicerina; FD: Fora do domínio. BfR: *German Federal Institute for Risk Assessment*; Cat. 1: Categoria 1; Cat. 2: Categoria 2. Fonte: A autora.

Tabela 10. Resultados das predições *in silico* para o desfecho de toxicidade oral aguda

Conservantes	Toxicidade oral aguda (LD ₅₀) ^a
	OECD QSAR
PP	2.700 mg/kg pc/d
MP	2.400 mg/kg pc/d
FE	1.800 mg/kg pc/d
CMI	510 mg/kg pc/d
MI	390 mg/kg pc/d
DMDMH	1700 mg/kg pc/d
IMU	2.600 mg/kg pc/d
SD	1.600 mg/kg pc/d
BA	1.000 mg/kg pc/d
BAC	830 mg/kg pc/d
CG	5.900 mg/kg pc/d
SB	2.200 mg/kg pc/d
EEG	7.000 mg/kg pc/d

^aLD₅₀ (roedores); PP: Propilparabeno; MP: Metilparabeno; FE: Fenoxietanol; CMI: Metilcloroisotiazolinona; MI: Metilisotiazolinona; DMDMH: DMDM hidantoína; IMU: Imidazolidinil ureia; SD: Dehidroacetato de sódio; BA: Álcool benzílico; BAC: Cloreto de benzalcônio; CG: Caprilil glicol; SB: Benzoato de sódio; EEG: Etilhexilglicerina. Fonte: A autora.

O termo toxicidade aguda refere-se àqueles efeitos adversos que ocorrem após a administração oral ou dérmica de uma única dose de uma substância, ou múltiplas doses, administradas em 24 horas, ou uma exposição, por inalação, de 4 horas. Devido à proibição dos testes em animais para ingredientes cosméticos, os dados sobre toxicidade aguda não são obrigatórios para avaliar a segurança de ingredientes cosméticos, para uso pelo consumidor. Uma abordagem de peso de evidência pode ser suficiente - como conclusões justificadas de agrupamento químico/*read-across*, (Q)SAR, estudos *in vitro* ou, quando acessível, resultados de estudos de toxicidade de dose repetida (SCCS, 2021). Dos 13 conservantes avaliados, 7 apresentaram valores de LD₅₀ < 2000 mg/kg pc/d, sendo enquadrados como Categoria 4, de acordo com o GHS (LD₅₀ > 300 - ≤ 2000 mg/kg pc/d). Estas substâncias podem ser perigosas se ingeridas (Tabela 10). Existem 5 categorias de

toxicidade aguda no GHS, sendo a Categoria 1, a que apresenta maior risco de toxicidade e a Categoria 5, a que representa o menor risco (GHS, 2019b).

Tabela 11. Resultados das predições *in silico* para o desfecho de atividade endócrina

Conservantes	Atividade endócrina	
	OECD QSAR	VEGA
PP	Positivo	Positivo
MP	Fora do domínio	Negativo
FE	Negativo	Negativo
CMI	Fora do domínio	Negativo
MI	Fora do domínio	Negativo
DMDMH	Negativo	Negativo
IMU	Negativo	Negativo
SD	Negativo	Negativo
BA	Negativo	Negativo
BAC	Negativo	Fora do domínio
CG	Negativo	Negativo
SB	Negativo	Negativo
EEG	Negativo	Negativo

PP: Propilparabeno; MP: Metilparabeno; FE: Fenoxietanol; CMI: Metilcloroisotiazolinona; MI: Metilisotiazolinona; DMDMH: DMDM hidantoína; IMU: Imidazolidinil ureia; SD: Dehidroacetato de sódio; BA: Álcool benzílico; BAC: Cloreto de benzalcônio; CG: Caprilil glicol; SB: Benzoato de sódio; EEG: Etilhexilglicerina; FD: Fora do domínio. Fonte: A autora.

No desfecho de atividade endócrina (Tabela 11), PP foi o único conservante classificado como positivo. Estudos *in vivo* demostram que PP produziu uma resposta estrogênica no ensaio uterotrófico usando camundongos; porém, esta potência foi de 1.612 a 20.000 vezes menor quando comparado ao estradiol natural (CIR, 2008a). Alguns dos efeitos endócrinos observados em modelos animais não encontraram confirmação em estudos humanos (NOWAK et al., 2018).

Tabela 12. Resultados das predições *in silico* para os desfechos de carcinogenicidade, mutagenicidade e genotoxicidade

	Carcinogenicidade		Mutagenicidade		Genotoxicidade	
	OECD QSAR	VEGA	OECD QSAR	VEGA	OECD QSAR	VEGA
PP	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
MP	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
FE	Negativo	FD	Negativo	Negativo	FD	Negativo
CMI	FD	FD	Positivo	Positivo	Negativo	FD
MI	FD	FD	FD	Negativo	Negativo	FD
DMDMH	FD	Negativo	Negativo	Positivo	FD	Negativo
IMU	FD	Negativo	Negativo	FD	FD	Negativo
SD	Negativo	Negativo	Negativo	FD	Negativo	Positivo
BA	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
BAC	Negativo	FD	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
CG	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
SB	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
EEG	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	FD	Negativo

PP: Propilparabeno; MP: Metilparabeno; FE: Fenoxietanol; CMI: Metilcloroisotiazolinona; MI: Metilisotiazolinona; DMDMH: DMDM hidantoína; IMU: Imidazolidinil ureia; SD: Dehidroacetato de sódio; BA: Álcool benzílico; BAC: Cloreto de benzalcônio; CG: Caprilil glicol; SB: Benzoato de sódio; EEG: Etilhexilglicerina; FD: Fora do domínio. Fonte: A autora.

No desfecho de carcinogenicidade (Tabela 12), os resultados de CMI e MI ficaram fora do domínio de aplicabilidade, em ambos os *softwares* utilizados, não sendo possível obter um resultado; no entanto, CMI foi classificada como mutagênica. Substâncias que possuem potencial genotóxico podem, também, apresentar potencial carcinogênico (SCCS, 2018). Para avaliar melhor esse desfecho, seria recomendada a realização de ensaios complementares; contudo, para a avaliação da carcinogenicidade, não existe alternativa de substituição validada disponível. Atualmente, os pesquisadores têm se esforçado para desenvolver modelos *in vitro* e *in silico* para avaliação deste desfecho (ROGIERS et al., 2020). Somente 2 conservantes, DMDMH e SD, apresentaram resultados conflitantes, nas análises dos desfechos de mutagenicidade e genotoxicidade (Tabela 12), respectivamente, nos *softwares* utilizados (OECD QSAR e VEGA).

4.3. Avaliação do perigo

A identificação do perigo é, além da avaliação de dose-resposta e da exposição, um dos três pilares da avaliação da segurança dos ingredientes cosméticos que, tradicionalmente, eram realizados em animais de experimentação, antes da proibição destes ensaios (ROGIERS et al., 2020).

Tabela 13. Avaliação de perigo

Conservantes	Exposição local			Exposição sistêmica					
	Sensibilização da pele	Irritação da pele ^a	Irritação ocular	Fototoxicidade	Toxicidade oral aguda	Carcinogenicidade	Mutagenicidade	Genotoxicidade	Atividade endócrina
Propilparabeno	B	A	B	B	B	B	B	B	A
Metilparabeno	A	A	B	B	B	B	B	B	B
Fenoxietanol	A	A	A	B	A	B	B	B	B
Metilcloroisotiazolinona	A	A ^b	A ^b	A	A	FD	A	B	B
Metilisotiazolinona	A	A ^b	A ^b	A	A	FD	B	B	B
DMDM hidantoína	A	A	B	B	A	B	B	B	B
Imidazolidinil ureia	A	A	B	B	B	B	B	B	B
Dehidroacetato de sódio	A	B	B	B	A	B	B	A	B
Álcool benzílico	A	B	A	B	A	B	B	B	B
Cloreto de benzalcônio	B	A	A	B	A	B	B	B	B
Caprilil glicol	B	A	B	B	B	B	B	B	B
Benzoato de sódio	B	B	B	B	B	B	B	B	B
Etilhexilglicerina	B	A	A	B	B	B	B	B	B

A: Alto; B: Baixo; ^aConsiderando o ensaio de citotoxicidade nas linhagens HaCaT e HDFa (IC₃₀); FD: Fora do domínio; ^bO ensaio foi realizado com a mistura de CMI/MI. Fonte: A autora.

A sensibilização da pele é um desfecho importante na avaliação da segurança de ingredientes cosméticos e, por esse motivo, foram utilizadas 3 plataformas (OECD QSAR, VEGA e PRED-SKIN) para prever esse desfecho. Os conservantes PP, MP, FE e SB apresentaram resultados conflitantes, nos diferentes modelos preditivos, utilizados na avaliação da sensibilização. Estes conflitos de resultados são esperados e, por esse motivo, foram avaliados os desfechos por diferentes *softwares*. A classificação, de acordo com o nível de toxicidade (baixo ou alto), foi atribuída a estes conservantes levando em conta o peso da evidência de cada plataforma (Tabela 13), sendo o PRED-SKIN considerado como o nível de evidência mais alto pois, além de ser uma ferramenta específica para avaliar a sensibilização da pele, também mostra uma análise quantitativa, em porcentagem, da confiabilidade, no domínio de aplicabilidade do modelo.

Para o desfecho de irritação ocular, os conservantes classificados como Categoria 1 no STE foram classificados com nível alto de perigo, enquanto os classificados como Não Categoria foram classificados com nível baixo. CG e EEG ficaram fora do domínio do ensaio STE e baseado na avaliação *in silico*, CG foi classificado com nível baixo de perigo pois, mesmo obtendo resultados conflitantes nos modelos utilizados, dados *in vivo* não indicaram toxicidade ocular (JOHNSON et al., 2012). EEG foi classificada com nível alto de perigo devido a sua classificação de Irritante pelo OECD QSAR e Categoria 1 pelo iS Ocular (Tabela 13).

A capacidade dos ingredientes químicos, presentes nos cosméticos, causar irritação cutânea aguda, deve ser avaliada a fim de proteger os usuários destes produtos e, particularmente, as populações suscetíveis (como crianças) (KOSE et al., 2018). A irritação da pele é o efeito tóxico local mais comum após a exposição a produtos cosméticos (SCCS, 2018). Dos conservantes avaliados neste trabalho, 9 foram classificados com alto nível de toxicidade neste desfecho, baseado na combinação dos ensaios obtidos *in vitro* e *in silico*. SD, BA e SB foram os únicos classificados como nível baixo de toxicidade (Tabela 13). É importante a realização de outros ensaios para melhor avaliar este desfecho. O uso de modelos de tecidos tridimensionais são os mais

recomendados. A epiderme humana reconstituída (RhE) é o modelo preferido para mensurar a irritação da pele e o potencial de corrosão, ocasionados pelos ingredientes cosméticos e produtos, visto que sua morfologia é semelhante à da pele humana, permitindo, assim, uma transposição dos resultados mais adequada (KOSE et al., 2018). O uso de ingredientes com potencial irritante nos cosméticos, deve ser manejado de modo que o risco de um efeito adverso seja eliminado ou diminuído. Os cálculos de exposição e a avaliação do risco direcionam os formuladores na escolha de concentrações seguras, considerando vários fatores, como o tipo de produto, local e tempo de aplicação, público-alvo, entre outros.

Os testes de toxicidade aguda em animais utilizavam a mortalidade como o principal desfecho de observação para obter um valor de LD₅₀ (*Lethal dose*) ou LC₅₀ (*Lethal concentration*). Esses estudos, geralmente, incluíam 3 vias: oral (LD₅₀), dérmica (LD₅₀) e inalatória (LC₅₀). A dose letal mediana (LD₅₀) é a dose necessária para matar 50% de um grupo de animais em teste. É uma forma de medir o potencial de envenenamento, de curto prazo, de uma substância química. Devido à proibição dos testes em animais, a única metodologia validada *in vitro* existente, atualmente, para toxicidade oral aguda é o teste 3T3 NR (Vermelho Neutro) *uptake*, aplicável para produtos químicos não classificados, com base em *cut-off* de LD₅₀ > 2000 mg/kg pc/dia (SCCS, 2021). Neste trabalho, foi considerado, para o desfecho de toxicidade aguda, o valor oral (roedores) de LD₅₀ obtido por meio da predição *in silico* no software OECD QSAR. Dos conservantes avaliados, FE, CMI, MI, DMDMH, SD, BA e BAC, apresentaram valores de LD₅₀ abaixo de 2000 mg/kg, sendo classificados com nível alto de toxicidade, neste desfecho (Tabela 13). A toxicidade oral aguda está, diretamente, relacionada ao efeito sistêmico de uma única exposição/dosagem, e, como os cosméticos são de venda livre, é importante evitar o risco de intoxicação, caso haja uma ingestão acidental.

O conservante DMDMH foi classificado, no desfecho de mutagenicidade, como negativo, no OECD QSAR e positivo no VEGA (Tabela 13); entretanto, foi atribuído nível baixo de perigo neste desfecho pois, baseado no peso da evidência, os resultados obtidos no VEGA podem estar fora do domínio de

aplicabilidade (DA), enquanto na plataforma OECD QSAR o modelo está dentro do DA. De acordo com o Artigo 15 do Regulamento (CE) No. 1223/2009, uma substância classificada como cancerígena, mutagênica e reprotóxica (CMR), de Categoria 2, pode ser usada em produtos cosméticos, desde que a substância tenha sido avaliada pelo SCCS e considerada segura para uso. As substâncias classificadas como CMR da categoria 1A ou 1B são proibidas em produtos cosméticos, a menos que satisfaçam uma série de condições estabelecidas no parágrafo 2 do artigo 15, a título de isenção (EUROPEAN UNION, 2009).

Um resultado semelhante a DMDMH foi obtido com o SD no desfecho de genotoxicidade. Neste caso, SD obteve classificação negativa no OECD QSAR e positiva no VEGA (Tabela 13). Alguns modelos *in silico* não apenas fornecem a previsão, mas, também, uma descrição detalhada da verificação do DA. Se o resultado do modelo fornece um alto nível de detalhes, o avaliador de segurança pode ter maior confiança nos resultados. Em qualquer caso, o especialista deve verificar e "aprovar" qualquer resultado produzido pelo *software*. A plataforma VEGA HUB fornece um valor quantitativo do domínio de aplicabilidade, denominado índice do DA (ADI) que varia de 0 a 1, considerando compostos semelhantes no conjunto de análise do modelo. O cálculo automático do ADI é baseado em uma série de fatores, como a precisão dos resultados em compostos semelhantes; a similaridade dos compostos semelhantes; a concordância do valor previsto dos compostos alvo com os valores experimentais dos compostos semelhantes, entre outros (BENFENATI et al., 2019). O SD obteve um ADI de 1, demonstrando o mais alto nível de confiança no resultado; portanto, foi atribuído, para SD, alto nível de toxicidade no desfecho de genotoxicidade.

A avaliação do perigo permitiu a caracterização, dos níveis de toxicidade, dos desfechos de exposição local e sistêmica, avaliados nesse trabalho, em uma matriz toxicológica. O agrupamento dos dados nesta matriz facilitou a integração e a visualização dos resultados obtidos e, desse modo, auxilia na tomada de decisão.

4.4. Avaliação da exposição e caracterização do risco

A exposição humana é calculada com base nas funções e utilizações declaradas de uma substância como ingrediente cosmético, na quantidade presente nas respectivas categorias de produtos e na respectiva frequência de utilização (SCCS, 2021). A avaliação da exposição (Tabela 14) permitiu calcular a MoS e, desse modo, estabelecer concentrações seguras (MoS > 100) para o uso dos conservantes abordados nesse trabalho.

Para se obter o valor da MoS, vários parâmetros são considerados, dentre eles, a exposição diária estimada. No caso específico dos conservantes, o Comitê Científico Europeu de Produtos Cosméticos e Não Alimentares (SCCNFP), atualmente conhecido como Comitê Científico de Segurança do Consumidor (SCCS), propôs o cálculo de um valor de exposição diária, global, para todos os produtos cosméticos que uma pessoa pode aplicar, diariamente, na pele (SCCNFP/0321/00). Levando em consideração os valores de exposição e, considerando o pior cenário em que o consumidor usaria um conjunto de produtos cosméticos contendo o mesmo conservante, um valor agregado de 17,4 g/dia ou 269 mg/kg pc/dia é utilizado no cálculo da MoS (Lee et al., 2019; SCCNFP, 2000; SCCS, 2018).

Para a relação entre a exposição e a resposta tóxica, um ponto de partida (POD) é determinado. Em toxicologia, POD é definido como o ponto em uma curva de dose-resposta toxicológica estabelecida, a partir de dados experimentais ou dados observacionais, geralmente correspondendo a um nível de efeito baixo estimado ou nível de nenhum efeito. O NOAEL costuma ser o mais empregado como POD (SCCS, 2018).

Outro parâmetro importante levado em consideração, na avaliação da exposição, foi a absorção dérmica. Aconselha-se a realização de estudos de absorção cutânea no processo de avaliação de risco; contudo, na ausência de absorção cutânea determinada experimentalmente, um valor padrão de 50% é assumido. Este valor conservador também pode ser usado nos casos em que apenas dados inadequados de absorção cutânea estão disponíveis (SCCS, 2021).

Tabela 14. Avaliação da exposição

Conservantes	NOAEL (mg/kg pc/dia) ^a	Exposição diária estimada (mg/kg pc/dia)	Concentração máxima permitida ^b	DA (%)	SED (mg/kg pc/dia)	MoS	Referência
Propilparabeno	745	269	0,14	50	0,188	3956,45	CIR, 2008a, 2018; SCCS, 2013; SONI et al., 2001
Metilparabeno	1000	269	0,40	50	0,538	1858,74	CIR, 2008a, 2018; SCCS, 2013
Fenoxietanol	369	269	1,00	50	1,345	274,35	DRÉNO et al., 2019b; SCCS, 2016a
Metilcloroisotiazolinona	29,1	269	0,0015	50	0,0020175	14423,79	CIR, 1992; SCCS, 2009
Metilisotiazolinona	19	269	0,0015	50	0,0020175	9417,60	CIR, 1992; SCCS, 2009
DMDM Hidantoína	266	269	0,60	50	0,807	329,61	CIR, 1988
Imidazolidinil ureia	600	269	0,60	50	0,807	743,49	CIR, 2019
Dehidroacetato de sódio	100	269	0,60	50	0,807	123,91	CIR, 1985, 2008b
Álcool benzílico	400	269	1,00	50	1,345	297,40	Johnson et al., 2017; SCCNFP, 1999; SCCS, 2012
Cloreto de benzalcônio	70	269	0,10	50	0,134	520,45	Choi et al., 2018; CIR, 2008, 1989
Caprilil glicol	300	269	1,00	50	1,345	223,05	Johnson et al., 2012
Benzoato de sódio	100	269	0,50	50	0,672	148,70	Johnson et al., 2017; SCCNFP, 2002; SCCP, 2005
	100	269	1,70	50	2,286	43,73	
	100	269	2,50	50	3,362	29,74	
Etilhexilglicerina	100	269	0,5	50	0,672	148,70	Johnson et al., 2013
	100	269	1,00	50	1,345	74,35	

^aToxicidade oral subcrônica; ^bConcentração máxima de acordo com o Regulamento da Comissão Europeia (EC) No. 1223/2009 e ANVISA 29/2012 ou concentração usual; DA: Absorção dérmica de acordo com SCCS; SED: Dose de exposição sistêmica; MoS: Margem de segurança. Fonte: A autora.

Dos conservantes avaliados neste trabalho, apenas 2 (SB e EEG) obtiveram uma MoS < 100. O benzoato de sódio (SB) pode ser utilizado como conservante em uma ampla variedade de produtos, desde higiene bucal a cosméticos com e sem enxágue. A MoS do SB ficou baixa (< 100) para as concentrações de 2,5% (produtos enxaguáveis) e 1,7% (higiene bucal). Quando são usados produtos enxaguáveis, como xampus e condicionadores capilares, a exposição aos ingredientes dessas formulações é menor, quando comparada a produtos sem enxágue, que podem permanecer na pele por muitas horas e este raciocínio deve ser considerado em uma abordagem de avaliação do risco. Produtos de higiene bucal, tecnicamente, não devem ser ingeridos e seriam enxaguáveis; contudo, a chance de ingestão acidental é consideravelmente maior e, desse modo, seria importante avaliar melhor a concentração máxima do SB em produtos de higiene bucal.

A etilhexilglicerina (EEG) não é classificada como conservante, mas sendo utilizada como um *booster* do sistema conservante, com a finalidade de aumentar o espectro microbiológico. A MoS ficou baixa (< 100) para a concentração de 1%; entretanto, para a concentração de 0,5% a MoS foi considerada segura (> 100) e, deste modo, o mais indicado seria utilizar a concentração de 0,5%.

A caracterização do risco permitiu uma abordagem integrada da avaliação do perigo e da exposição, para estimar o efeito adverso à saúde quando exposto a determinado ingrediente cosmético. Vários fatores devem ser considerados ao avaliar o risco de um ingrediente cosmético, incluindo populações que são mais suscetíveis (devido a fatores biológicos intrínsecos), vulneráveis (devido a fatores ambientais) e sensíveis (suscetíveis e vulneráveis) (CHARTRES; BERO; NORRIS, 2019). Outros fatores também impactam nessa avaliação, como a concentração que será utilizada, o tipo e o formato do produto, o local de aplicação e a rota de exposição.

O avaliador de segurança pode assumir a caracterização do risco baseada na MoS obtida na avaliação da exposição; entretanto, para uma leitura mais abrangente dos resultados, deve-se considerar, também, a avaliação do perigo. Mesmo os ingredientes que obtiveram uma MoS acima de

100, são pontuados nesse tipo de análise, conhecida como avaliação de risco (SCCS, 2021). Em termos gerais, uma avaliação de risco é o esforço combinado de: identificar e analisar eventos potenciais, que podem impactar negativamente indivíduos, e fazer julgamentos "sobre a tolerabilidade do risco com base em uma análise de risco", enquanto considera outros fatores de influência (WILLIAMS; PAUSTENBACH, 2002).

Os ingredientes classificados como nível alto de toxicidade para os desfechos de irritação/sensibilização da pele podem ser evitados em produtos destinados a peles sensíveis ou públicos vulneráveis, como crianças, gestantes e idosos e, preferivelmente, ser utilizados em produtos enxaguáveis, diminuindo a exposição e o risco de efeitos adversos. Ingredientes fortemente irritantes oculares (GHS Cat. 1) não devem ser utilizados em produtos que podem facilmente entrar em contato com os olhos.

A toxicidade oral aguda está diretamente relacionada ao efeito sistêmico de uma única exposição/dosagem, sendo importante avaliar o risco de intoxicação caso haja uma ingestão acidental. Deste modo, os ingredientes classificados com nível alto de toxicidade neste desfecho poderiam ser evitados em produtos que possam ser ingeridos acidentalmente, como os destinados ao público infantil.

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.

ANSELMU, 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 benzoisothiazolinone 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.

LILIENTBLUM, 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 laluset® 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: *in 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.