

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

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

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

Gabriela de Oliveira Prado Corrêa

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

Araraquara
2018

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

**Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Câmpus de Araraquara**

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

Gabriela de Oliveira Prado Corrêa

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

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

Araraquara
2018

Ficha Catalográfica

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

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

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas.
Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Vera Lucia Borges Isaac.

1. Conservantes antimicrobianos. 2. Cosméticos. 3. Segurança. I. Isaac, Vera Lucia Borges, orient. II. Título.

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

CAPES: 40300005

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: AVALIAÇÃO IN VITRO DA CITOTOXICIDADE E POTENCIAL DE IRRITAÇÃO DE CONSERVANTES ANTIMICROBIANOS UTILIZADOS EM COSMÉTICOS

AUTORA: GABRIELA DE OLIVEIRA PRADO CORRÊA

ORIENTADORA: VERA LUCIA BORGES ISAAC

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de conhecimento: SEM ÁREA DE CONHECIMENTO pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. VERA LUCIA BORGES ISAAC

Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP



Prof. Dr. MARCOS ANTONIO CORREA

Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP



Profª. Dra. GISLAINE RICCI LEONARDI

Faculdade de Ciências Farmacêuticas / Universidade Estadual de Campinas- UNICAMP

Araraquara, 19 de fevereiro de 2018

Dedicatória

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

Agradecimentos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Muito obrigada!

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

(Pablo Picasso)

Resumo

Cosméticos são usados pelo homem desde a antiguidade e o consumo desse segmento vem aumentando a cada ano, praticamente imune a crises. O Brasil é o quarto maior mercado de cosméticos no mundo, ficando atrás apenas dos Estados Unidos, China e Japão, segundo dados da Associação Brasileira de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos. Dentre as matérias primas que mais causam reações alérgicas estão os conservantes, corantes e composições aromáticas. Assim sendo, a preocupação com a segurança dos conservantes cosméticos deve ser intensificada. Grande importância é dada ao assunto atualmente, existindo a preocupação com o potencial de irritação e toxicidade para o consumidor e não apenas com o aspecto microbiológico. Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a citotoxicidade e potencial de irritação de conservantes antimicrobianos que são utilizados em cosméticos. Foram realizados ensaios de citotoxicidade, através do método MTT, em células de fibroblastos humano (HDFa), células de queratinócitos humano (HaCaT) e células de carcinoma hepatocelular humano (HepG2) e potencial de irritação em ovos embrionados de galinha através do método HET-CAM. Foram utilizados os conservantes: fenoxietanol, mistura de fenoxietanol e metilisotiazolinona (Fenox/Mit), mistura de metilcloroisotiazolinona e metilisotiazolinona (CMit/Mit), metilparabeno e propilparabeno, que são amplamente utilizados em cosméticos. Os conservantes mais citotóxicos e com maior pontuação de irritação (PI) considerados irritantes, foram: fenoxietanol (HaCat IC_{50} : 0,237 mg/mL; HDFa IC_{50} : 0,200 mg/mL; HepG2 IC_{50} : 0,248 mg/mL; PI: 16) e Fenox/Mit (HaCat IC_{50} : 0,156 mg/mL; HDFa IC_{50} : ~0,056 mg/mL; HepG2 IC_{50} : 0,119 mg/mL; PI: 10). Os demais conservantes, CMit/Mit (HaCat: não tóxico; HDFa: não tóxico; HepG2: >0,0045 mg/mL), propilparabeno (HaCat IC_{50} : ~0,200 mg/mL; HDFa IC_{50} : >0,200 mg/mL; HepG2: 0,039 mg/mL) e metilparabeno (HaCat IC_{50} : >0,400 mg/mL; HDFa IC_{50} : >0,400 mg/mL; HepG2: 0,062 mg/mL), apresentaram baixa citotoxicidade nas linhagens HaCaT e HDFa, e uma citotoxicidade mais acentuada na linhagem HepG2. No ensaio HET-CAM, CMit/Mit (PI: 5) e metilparabeno (PI:6) foram considerados moderadamente irritantes, e o propilparabeno (PI: 0) foi classificado como praticamente não irritante. Diante destes resultados, foi possível concluir que CMit/Mit, propilparabeno e metilparabeno apresentaram resultados que viabilizam sua continuidade como conservantes em cosméticos; porém é necessária a realização de outros ensaios para avaliar de maneira mais precisa a segurança desses conservantes, assim como para os demais conservantes testados.

Palavras chave: conservantes antimicrobianos; cosméticos; segurança.

Abstract

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

Keywords: antimicrobial preservatives; cosmetics; safety.

Lista de Abreviaturas e Siglas

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

Lista de Tabelas e Quadros

Lista de Tabelas

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

Lista de Quadros

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

Lista de Figuras

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

Sumário

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

1. Introdução

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Cosméticos

A palavra cosmético deriva do grego *kosmetikós*, que significa *hábil em adornar*. Existem evidências arqueológicas do uso de cosméticos para embelezamento e higiene pessoal desde 4000 a.C. Os primeiros registros tratam dos egípcios, que pintavam os olhos com sais de antimônio para evitar a contemplação direta do Deus Ra, representado pelo sol. Para proteger sua pele das altas temperaturas e do clima desértico da região, os egípcios recorriam à gordura animal e vegetal, cera de abelhas, mel e leite, no preparo de cremes para a pele. Existem registros de historiadores romanos relatando que a rainha Cleópatra frequentemente se banhava com leite para manter pele e cabelos hidratados¹³.

A busca do ser humano pela beleza é algo que sempre existiu, mesmo quando não estavam disponíveis os recursos que estão hoje. No entanto, nos últimos tempos, é evidente o aumento da preocupação, tanto de mulheres como de homens, com a aparência visual. Esta postura começa com um maior cuidado com a pele, seja no intuito de corrigir imperfeições, seja na tentativa de prevenir e/ou retardar o aparecimento dos sinais de envelhecimento. Este comportamento pode ser explicado, em parte, pela ampla divulgação de padrões de beleza, maior facilidade de acesso aos produtos e, também, pela maior valorização da aparência¹⁴.

Cosméticos são destinados à proteção ou ao embelezamento das diferentes partes do corpo humano, como: pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membranas mucosas da cavidade oral, sendo de uso externo. Os ingredientes cosméticos podem ser sintéticos, naturais, produtos de biotecnologia ou

associação de ingredientes como, por exemplo, as composições aromáticas (ANVISA, 2017). De acordo com os artigos 3º e 26º da Lei 6.360/76 1 e 3º, 49º e 50º do Decreto 79.094/77, podem ser enquadrados em quatro categorias: produtos de higiene, cosmético, perfume e produto de uso infantil¹⁵.

A cosmetologia, ciência que estuda cosméticos desde seus componentes até as suas aplicações no produto final, vem assumindo um importante papel no mundo atual. Na medida em que ocorre a sofisticação das técnicas e das formulações, além de melhorias das matérias primas, o resultado é notado em produtos cada vez mais complexos, sendo o sistema conservante de extrema importância para a formulação, uma vez que vai garantir a integridade do produto por mais tempo, além de proteger o consumidor de prováveis problemas causados por microrganismos. Parte desse avanço é devido a um aumento progressivo da utilização de cosméticos pela população, somada às mudanças do seu estilo de vida¹⁶.

Embora não seja desejável, há relatos na literatura de reações adversas a cosméticos¹⁷⁻¹⁸. O produto cosmético deve ser seguro em condições normais ou previsíveis de utilização, independente do grau de risco que ele apresente. A segurança pode ser definida em termos de probabilidade de que o produto não provoque danos significativos. É sabido que não existe 100% de segurança em nenhuma substância química, já que até mesmo água pode ser perigosa se administrada em quantidades inadequadas¹⁶.

Considerando possíveis riscos que tais produtos podem acarretar à saúde, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA - RDC 211/05), classifica os produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes em duas categorias: produtos grau 1, que são caracterizados por possuírem propriedades básicas ou elementares, cuja comprovação não seja inicialmente necessária e não requeiram informações

detalhadas quanto ao seu modo de usar e suas restrições de uso, devido às características intrínsecas do produto, e produtos de grau 2, os que possuem indicações específicas, cujas características exigem comprovação de segurança e/ou eficácia, bem como informações e cuidados, modo e restrições de uso¹⁹.

Segundo dados da ABIHPEC, a indústria brasileira de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos apresentou um crescimento médio deflacionado composto próximo a 11,4% a.a. nos últimos 20 anos, tendo passado de um faturamento "Ex-Factory", líquido de imposto sobre vendas, de R\$ 4,9 bilhões em 1996 para R\$ 42,6 bilhões em 2015. Praticamente imune a crises, em 2015 houve uma pequena queda, mas o mercado já voltou a se recuperar, fechando 2016 com -6% de queda real, frente -9% em 2015. Atualmente o Brasil é o quarto maior mercado de cosméticos no mundo, ficando atrás apenas dos Estados Unidos, China e Japão²⁰.

Alguns tipos de reações indesejadas podem ser observadas, com o uso de produtos cosméticos¹²:

- Irritação: reações de desconforto no local onde o produto foi aplicado, de intensidade variada, manifestadas como ardor ou prurido, podendo causar destruição do tecido;
- Sensibilização: reação alérgica, envolvendo processos imunológicos. Pode ser de efeito imediato ou tardio e pode ocorrer em regiões diferentes da área de aplicação;
- Efeito sistêmico: quando quaisquer componentes do produto atingem a corrente sanguínea, por via oral, inalatória, transcutânea ou transmucosa, metabolizados ou não.

No Brasil, existem duas entidades principais que acompanham, comercialmente, este setor: a Associação Brasileira das Indústrias de Higiene Pessoal, Perfumaria e

Cosméticos (ABIHPEC), que considera em suas estatísticas as vendas líquidas *ex-factory* das suas associadas, e a *Euromonitor International*, que utiliza o critério de vendas à base de *balcão*.

2.2. Conservantes

Os conservantes são substâncias químicas (naturais ou sintéticas), adicionadas a um produto (alimento, cosmético, medicamento, etc.) com o propósito de aumentar seu tempo de vida útil, protegendo-o de bactérias, fungos, leveduras e quaisquer tipos de organismos ou reações químicas que possam tornar o item impróprio para o uso. Podem, segundo alguns autores, ser categorizados em três tipos^{6,11,18}:

- Antimicrobianos: atuam inibindo ou matando bactérias, fungos e leveduras. São divididos em: *bacteriostáticos/fungistáticos*: impedem a multiplicação dos microrganismos, mas não os matam. São, em sua maioria, inibidores de síntese proteica e atuam por ligação reversível aos ribossomos; *bactericida/fungicida*: causam a morte dos microrganismos, através de mecanismos como inibição irreversível da replicação do DNA, mas não necessariamente destroem as bactérias; *bacteriolíticos*: além de matar as bactérias impedindo sua proliferação e crescimento, também eliminam as células já mortas através de um processo natural denominado lise celular;
- Antioxidantes: impedem a oxidação do produto, bloqueando o efeito danoso das espécies reativas de oxigênio;
- Sequestrantes: são componentes que apresentam capacidade de complexar íons metálicos e alcalinos terrosos que causam danos às formulações

cosméticas, pois podem precipitar tensoativos e promover a oxidação de componentes graxos insaturados.

Um conservante considerado ideal deve ser efetivo em uma concentração baixa, não apresentar toxicidade, ter boa solubilidade, compatibilidade com outros componentes dos excipientes; amplo espectro de atividade para bactérias e fungos e custo razoável²¹.

Para que seja possível definir a susceptibilidade do produto a uma maior contaminação por bactérias, fungos ou leveduras, é preciso avaliar, inicialmente, a atividade de água do produto. Quanto mais aquosa, mais susceptível a bactérias. Em geral, cremes e loções exigem proteção tanto bacteriostática quanto fungistática, sendo necessário utilizar misturas de conservantes de amplo espectro de atividade⁶.

Na Europa, os cosméticos são tipicamente regulados pelo Comitê Científico da Segurança do Consumidor (SCCS) e pela Diretoria Geral de Saúde e Política de Concessão (DG SANCO) da Comissão Europeia. Nos Estados Unidos, a Revisão de Ingredientes Cosméticos (CIR), um conselho científico, realiza revisões de ingredientes utilizados pela indústria de cosméticos e publica os resultados de suas descobertas, uma vez que a agência FDA tem uma visão regulatória da indústria de cosméticos, sendo responsável por garantir a segurança pública²².

O primeiro aspecto a ser considerado na escolha do conservante é a regulamentação do uso de substâncias de ação conservante permitidas, determinada de acordo com cada país. O segundo passo é conhecer suas propriedades físico-químicas; assim, é possível prever possíveis incompatibilidades com os componentes da fórmula e até uma inativação do conservante, como é o caso do polissorbato 80, um surfactante que inativa a ação dos parabenos e

fenoxietanol. As propriedades organolépticas também devem ser consultadas, a fim de se prever possíveis interferências no sabor, na cor e, também, no odor^{6, 11}.

A ANVISA estabeleceu, na RDC nº 29, de 1 de junho de 2012, a Lista de substâncias de ação conservante permitidas para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes; a definição de conservantes como substâncias adicionadas aos produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes com a finalidade primária de preservá-los de danos e/ou deteriorações, causados por microrganismos durante sua fabricação e estocagem, bem como proteger o consumidor de contaminação inadvertida durante o uso do produto. Na RDC 29/2012, estão estabelecidas as 57 substâncias que podem ser utilizadas como conservante antimicrobiano²³.

No Quadro 1, é possível verificar alguns dos conservantes mais amplamente^{1,24-25} utilizados em cosméticos, incluindo sua nomenclatura internacional, o seu código CAS e sua fórmula molecular. O CAS é o identificador numérico único, referente ao registro no banco de dados do *Chemical Abstracts Service*, divisão da *Chemical American Society*, para uma determinada substância. Não possui nenhum significado químico. Além disso, os números de registro do CAS podem conter mais de nove dígitos, divididos por hifens em três partes, sendo o último dígito o verificador.

Atualmente, há muita discussão sobre o assunto e não existe um consenso geral de qual/quais conservantes devem ou não ser usados. Houve um grande envolvimento, dos consumidores de produtos cosméticos, gerando confusão sobre os possíveis efeitos que determinados conservantes podem ter na saúde humana. A mídia, também, tem pressionado as indústrias, trazendo muitas vezes informações falsas e sensacionalistas. Cabe, aos pesquisadores, determinar dados confiáveis

que possam deixar os formuladores seguros, na escolha dos conservantes que melhor sejam adequados à formulação.

Quadro 1. Conservantes mais amplamente utilizados em cosméticos, com seus respectivos *INCI Names*, código *CAS* e fórmula molecular.

Conservantes	<i>INCI Name</i>	Código CAS	Fórmula Molecular
Fenoxietanol	<i>Phenoxyethanol</i>	122-99-6	C ₈ H ₁₀ O ₂
Metilcloroisotiazolinona	<i>Methylchloroisothiazolinone</i>	26172-55-4	C ₄ H ₄ ClNOS
Metilisotiazolinona	<i>Methylisothiazolinone</i>	2682-20-4	C ₄ H ₅ NOS
Metilparabeno	<i>Methylparaben</i>	99-76-3	C ₈ H ₈ O ₃
Propilparabeno	<i>Propylparaben</i>	94-13-3	C ₁₀ H ₁₂ O ₃

Fonte: Adaptado de Aubert et al.¹; Berthet et al.²⁴; Shabir et al.²⁵.

2.2.1. Parabenos

Os parabenos são os conservantes mais utilizados em cosméticos, artigos de higiene pessoal, produtos farmacêuticos e alimentos, devido à sua toxicidade relativamente baixa em seres humanos, efetiva atividade antimicrobiana, baixa concentração de uso, baixo custo, o que leva a um ótimo custo-benefício. São amplamente utilizados em produtos de uso diário, o que implica a uma exposição frequente a esses compostos. A exposição ocorre através da ingestão em alimentos e produtos farmacêuticos, e absorção dérmica em produtos de higiene pessoal e cosméticos²⁶⁻²⁷.

A exposição humana aos parabenos é estimada em 76 mg/dia, sendo aproximadamente 1 mg/dia de alimentos, 50 mg/dia de cosméticos e itens de cuidados pessoais e 25 mg/dia de formulações farmacêuticas²⁸. Com base nas concentrações de parabenos medidas nos alimentos e nas taxas de ingestão diária per capita de alimentos, foi estimada uma ingestão diária nos Estados Unidos da América de 307 ng/kg de peso corporal para adultos²⁹.

Os parabenos vem sendo utilizados como conservantes antimicrobianos em alimentos, medicamentos, cosméticos e produtos de higiene pessoal por quase 10 décadas. Representam substâncias altamente valiosas, dada a sua atividade antimicrobiana frente a uma ampla gama de microrganismos, sua segurança (baixa toxicidade aguda, baixo potencial de irritação ou sensibilização) e sua estabilidade em um grande faixa de pH. No entanto, nos últimos 15 anos, eles estiveram sob os holofotes, devido a seus supostos efeitos estrogênicos e antiandrogênicos. Artigos científicos que apoiam essas afirmações levaram a Comunidade Europeia a proibir o uso de alguns parabenos (isopropilparabeno, isobutilparabeno, fenilparabeno,

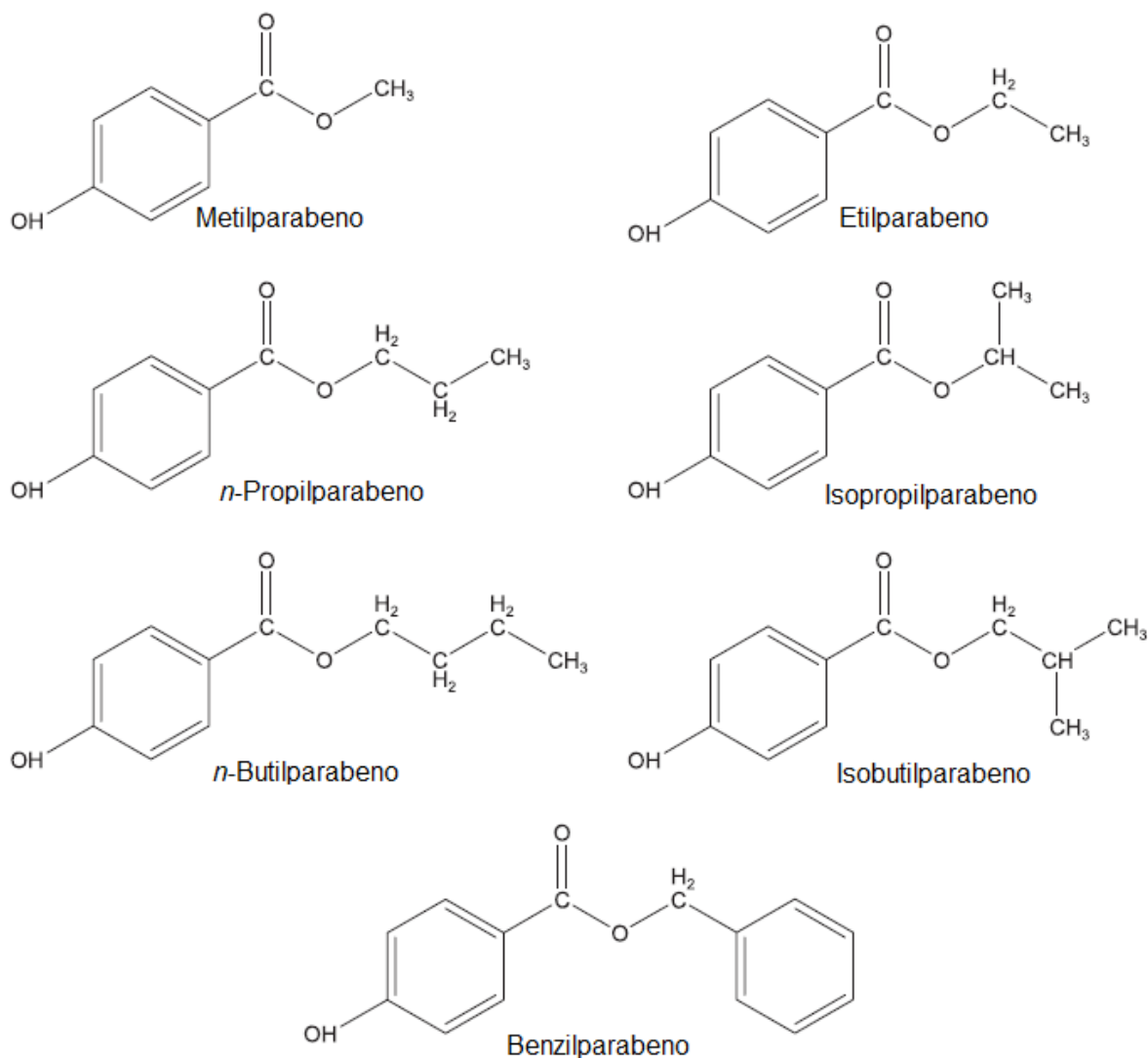
benzilparabeno e pentilparabeno). As indústrias de alimentos, farmacêuticos e cosméticos estão sob pressão das campanhas feitas pela mídia e estão respondendo substituindo os parabenos por outros conservantes que causam múltiplos casos e mesmo epidemias mundiais de dermatite de contato^{1,30}.

A maior exposição dos seres humanos aos parabenos é através de produtos cosméticos e quase 100% é dérmica. Estudos anteriores indicam possíveis efeitos colaterais associados ao uso de cosméticos contendo parabenos, dada a sua rápida absorção e sua incompleta hidrólise através das estearases da pele. A ANVISA, através da RDC nº 29/2012, regulamenta a utilização dos parabenos, indicando que as concentrações máximas permitem 0,4% (p/p) para um parabeno e 0,8% (p/p) para uma mistura de parabenos em produtos comerciais. Já o Japão permite no máximo 1% (p/p) de parabenos totais em todos os produtos cosméticos^{23, 31}.

O metilparabeno e o propilparabeno 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 pH³².

Os produtos cosméticos são aplicados diariamente e, alguns deles, muitas vezes ao longo do dia, como maquiagem, fotoprotetores e desodorante. Embora o contato humano externo, com uma substância, raramente resulte em sua penetração através da pele e exposição sistêmica significativa, há exposição local. Quando um produto é utilizado na cavidade oral como, por exemplo o batom, a exposição sistêmica aos seus ingredientes não pode ser completamente excluída³². Na figura 1 estão listadas as estruturas químicas de sete parabenos.

Figura 1. Estruturas químicas de sete ésteres alquílicos do ácido p-hidroxibenzóico (parabenos).



Fonte: Adaptado de Darbre e Harvey³³.

Em experimentos realizados com os parabenos, foi possível notar que exercem uma atividade estrogênica fraca, determinada por ensaio *in vitro* de receptor de estrogénio e ensaio *in vivo* uterotrófico. Esses compostos têm sido encontrados em amostras de células humanas de câncer de mama; entretanto, não há evidências que os cosméticos contendo estes conservantes sejam sinônimos de risco à saúde, uma vez que a penetração e acúmulo destes agentes antimicrobianos

nos tecidos é pouco provável e a sua concentração, nos produtos em questão, está abaixo da concentração máxima permitida^{27, 29}.

A atividade estrogênica dos parabenos aumenta com o aumento do comprimento da cadeia lateral com ramificações no grupo alquil ester e a ordem de atividade no receptor estrogênico é a seguinte: benzil > butil > propil = etil > metil. O aumento da cadeia lateral diminui a solubilidade dos parabenos em água e, por isso, alguns destes conservantes podem ser acumulados nos tecidos do corpo de maneira similar a outros contaminantes lipofílicos que são considerados bioacumulativos. Aos conservantes etilparabeno, propilparabeno, butilparabeno foi atribuída atividade estrogênica 150.000, 30.000 e 10.000 vezes, respectivamente, inferior ao composto 17 β -estradiol (potente composto estrogênico)^{27, 29, 34}.

Aubert et al.¹ realizaram uma pesquisa em ratos para avaliar o uso de propil, metil e butilparabeno, através da via oral (gavagem), subcutânea e tópica. Foram analisados os aspectos farmacocinéticos, distribuição, excreção e metabólitos presentes no plasma. Através dos resultados obtidos os autores puderam concluir que o uso dessa classe de conservantes é seguro, pois os resultados observados não apresentaram alterações significativas. Oishi²⁷ analisou diferentes concentrações de propilparabeno (0 a 1%) foram testadas em ratos machos e apresentaram alterações em sua função reprodutiva, incluindo redução da quantidade de esperma, diminuição da cauda do espermatozóide e dos níveis de testosterona e que a sua atividade estrogênica é semelhante à do composto 4-nonilfenol.

Em experimentos realizados por Kodani et al.³⁵ os parabenos apresentaram a capacidade de estimular a diferenciação dos adipócitos. Os adipócitos são formados no início da vida e o número de adipócitos geralmente não aumenta nos adultos

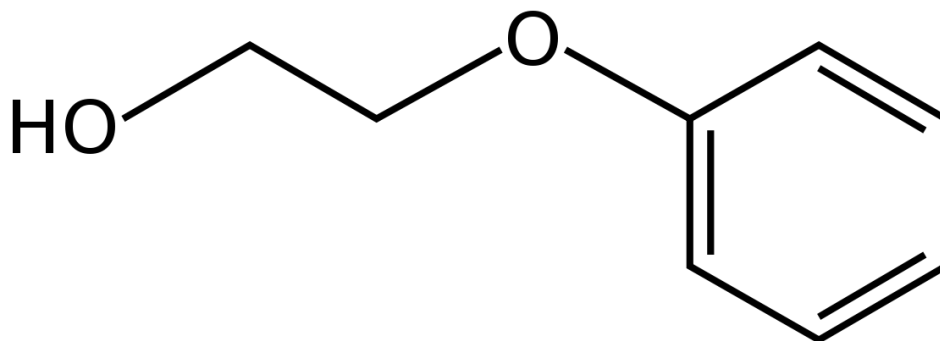
saudáveis. No entanto, é possível que as células precursoras se diferenciem em adipócitos quando a demanda por armazenamento de energia aumenta. Os parabenos aumentam essa diferenciação, elevando, conseqüentemente, a prevalência de obesidade.

Mesmo com as controvérsias do uso ou não de parabenos, vem crescendo o uso da expressão *parabens free* como apelo de venda para aumentar a aceitação dos produtos e o lucro das empresas. Porém, a mudança de um sistema conservante envolve muitas pesquisas científicas a fim de garantir a eficácia do novo conservante. Além de tempo, grandes investimentos são feitos para a realização de registros nos órgãos de fiscalização competentes, testes de estabilidade físico químicos e testes microbiológicos de desafio. Algumas indústrias adeptas ao uso de parabenos e, até mesmo empresas fornecedoras, questionam a sua substituição por outros conservantes, alegando a falta de fundamento científico e informação plausível para essa troca⁶.

2.2.2. Fenoxietanol

O fenoxietanol é utilizado como conservante em cosméticos e produtos de higiene pessoal. Possui aplicações farmacêuticas como antisséptico tópico e como anestésico para peixes. Pode ser usado, também, como agente de coalescência em tintas de látex e como solvente/conservante em corantes e tintas. É um bom bactericida geral (mais ativo contra bactérias Gram negativas), mas um fungicida fraco e geralmente é usado em combinação com outros conservantes. Os produtos cosméticos contendo fenoxietanol podem ser aplicados em qualquer parte do corpo e, muitas vezes, utilizados repetidamente ao longo do dia^{25, 36}.

Figura 2. Estrutura química do Fenoxietanol.



Fonte: Shabir et al.²⁵

Em um estudo realizado por Anselmi et al.³⁷ no qual foi avaliado o potencial de causar apoptose e necrose, de alguns conservantes, em linhagem celular de leucemia promielocítica humana (HL60), foram testados o fenoxietanol, nas concentrações de 0,01 a 1% e a mistura de metilcloroisotiazolinona e metilisotiazolinona, nas concentrações de 0,001 a 0,1%. Ambos demonstraram, nas concentrações mais altas testadas, uma diminuição drástica da viabilidade celular no tempo zero, sugerindo morte súbita das células. Foram encontradas, também, alterações características de morte por apoptose e necrose, iniciadas pelos conservantes.

O fenoxietanol é produto da reação de um mol de óxido de etileno com um mol de fenol. Ocorre na natureza, com as maiores quantidades observadas em abacate, endívia e espécies de mangifera. Seu uso é aprovado no Brasil, União Européia e Japão em concentração máxima de 1%, sem restrições para todas as aplicações em produtos de higiene pessoal e cosméticos. O fenoxietanol é amplamente usado na indústria de fragrâncias como solvente e, também, pelo seu

aroma floral. Um ponto crítico para o setor cosmético é o teor de fenol livre normalmente inferior a 0,1%, por ser irritante^{25, 38-39}.

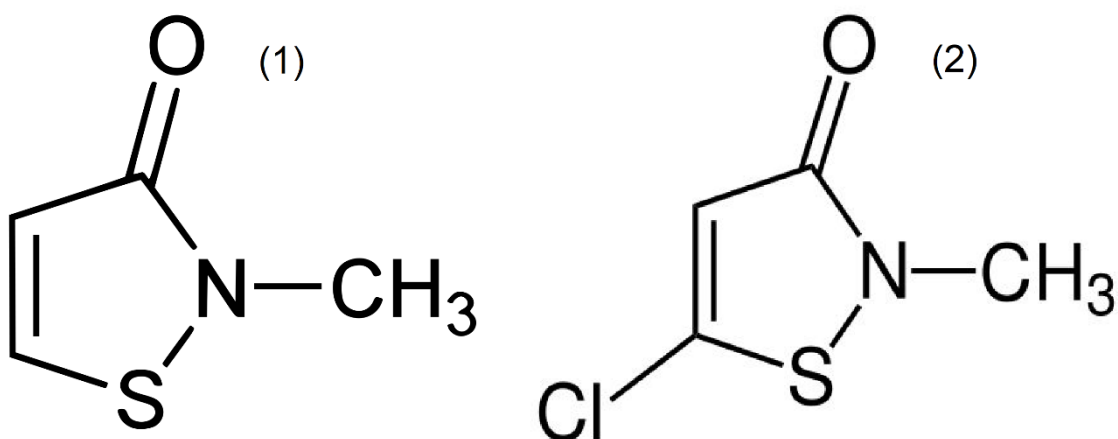
2.2.3. Isotiazolinonas

A metilisotiazolinona (Mit) é um conservante utilizado em produtos cosméticos, domésticos e industriais. Está no mercado desde a década de 1980 em uma combinação de 1:3 com metilcloroisotiazolinona (CMit). Esta combinação é uma das causas mais frequentes de alergia de contato com conservantes. Em 2005, o uso da metilisotiazolinona sozinha foi autorizado em produtos cosméticos com uma concentração máxima de 100 ppm. Antes de ser aprovado para produtos cosméticos, a metilisotiazolinona já havia sido usada em produtos industriais e, em 2004, os primeiros casos de alergia de contato ocupacional causados pela exposição à cola de papel de parede e uma queimadura química foram publicados. Em 2010, foram publicados os primeiros casos de alergia de contato relacionadas ao uso de cosméticos⁴⁰.

Os conservantes metilcloroisotiazolinona e metilisotiazolinona são considerados alérgenos de contato de alto potencial e são uma das causas mais comuns de alergia de contato e dermatite induzida por conservantes. Utilizados em produtos industriais como tintas, óleos, colas, adesivos, detergentes, tintas, entre outros, além de produtos cosméticos com e sem enxague e, também, em produtos domésticos a base de água. As concentrações usadas desses conservantes são muito maiores em produtos industriais (1,5-13,5%) do que em cosméticos (7,5 ppm ou µg/mL) ou produtos domésticos (15 ppm ou µg/mL). Cabeleireiros, esteticistas, mecânicos, reparadores, maquinistas, pintores, fabricantes de tintas e trabalhadores

de restaurantes são constantemente expostos a esses conservantes, o que leva a um grave risco ocupacional²⁴.

Figura 3. Estrutura química de Metilisotiazolinona (1) e Metilcloroisotiazolinona (2).



Fonte: <http://www.worldofchemicals.com/chemicals/chemical-properties/methylisothiazolinone.html>

Groot et al.⁴¹ realizaram um estudo em 119 pacientes para determinar quais eram os componentes presentes em cosméticos responsáveis por dermatite de contato. Durante o experimento, os autores aplicaram topicamente nos voluntários substâncias relatadas como alérgenos, por 2 dias. Eles observaram que o mais importante alérgeno cosmético foi o sistema conservante composto por metilisotiazolinona e metilcloroisotiazolinona, que provocou reação em 33 pacientes (27,7%), seguido por resina de toluenosulfonamida/formaldeído presentes em laquês (15 pacientes, 12,6%) e pelo emulsificante oleamidopropildimetilamina, presentes em loções infantis para o corpo (13 pacientes, 10,9%).

Em um estudo observacional realizado por Laguna et al.⁴², foram pesquisados todos os casos de dermatite alérgica de contato por cosméticos que ocorreram entre

os anos 2000 a 2007, no Hospital General Universitario de Valencia, na Espanha. Foram observados o sexo dos pacientes, os alérgenos encontrados, origem da sensibilização, entre outros. Foram detectados 315 *patches* positivos a 46 alérgenos diferentes, sendo que 54 *patches* positivos foram relacionados à mistura de conservantes metilcloroisotiazolinona e metilisotiazolinona. Dentre os principais alérgenos cosméticos estavam os conservantes antimicrobianos parabenos e formaldeído, utilizados há muito tempo. Nos últimos anos, segundo os autores, os novos conservantes têm apresentado uma menor toxicidade, embora possuam uma capacidade sensibilizante maior que os anteriores, como foi o caso da mistura de metilcloroisotiazolinona e metilisotiazolinona, um conservante antimicrobiano com alto potencial sensibilizante.

Berthet et al.²⁴ realizam ensaios de permeação *ex vivo* com a mistura de conservantes CMit/Mit em um creme e em solução aquosa. A metilisotiazolinona permeou a pele humana em menos de quinze minutos e com uma taxa de permeação relativamente alta. A metilcloroisotiazolinona, como constituinte do creme, não permeou a pele; entretanto, em solução aquosa, após várias horas (> 8 h), foi verificada a permeação. Alguns sinais de irritação foram observados por histologia, especialmente em concentrações mais elevadas (CMit 750 µg/mL e Mit 250 µg/mL), em solução aquosa.

2.3. Proibição do uso de animais

No meio científico, tem sido objeto de pesquisa o desenvolvimento de métodos alternativos de avaliação de produtos cosméticos, devido a uma conscientização sobre a necessidade da utilização da política dos 3 Rs (*replace, reduce, refine*) introduzida por Russel & Burch em 1959, que trata da substituição, redução e refinamento dos ensaios com utilização de animais⁷.

Com o controle cada vez mais rigoroso em relação ao uso de animais de laboratório, há a necessidade de desenvolver e padronizar ensaios *in vitro* que possam detectar a toxicidade de produtos para uso humano. De acordo com o Órgão Internacional de Padronização, ISO 10993, o ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade de qualquer substância. Estes testes de citotoxicidade consistem em colocar o material direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células de mamíferos, verificando as alterações celulares por diferentes mecanismos, entre os quais, a incorporação de corantes vitais ou a inibição da formação de colônias celulares⁴³.

A proibição total do uso de animais para testes de produtos cosméticos, higiene pessoal e perfumes, em 2013, pela União Europeia, teve início em 2009, quando foram banidos os ensaios de toxicidade *in vivo* para matérias primas cosméticas e, a partir disso, houve uma enorme repercussão pelo mundo todo, alertando sobre um tema já discutido há algum tempo⁴⁴.

No Brasil, o 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, foi aprovado pela Comissão de Ciência, Tecnologia, Inovação,

Comunicação e Informática (CCT), em 22 de março de 2017 e segue para aprovação da Comissão de Meio Ambiente, Defesa do Consumidor e Fiscalização e Controle (CMA) e, posteriormente, deliberação final pelo Plenário do Senado, onde aguarda, desde 24 de maio de 2017, inclusão na ordem do dia de requerimento⁴⁵.

O estado de São Paulo, mais adiantado, proibiu o uso de animais para testes em cosméticos. O governador do Estado, Geraldo Alckmin, sancionou no dia 23 de janeiro de 2014, o Projeto de lei 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.

No Brasil, em 2008, foi idealizada a criação de um organismo para métodos alternativos, tendo recebido total apoio da comunidade científica, da academia, dos órgãos internacionais e dos setores produtivos⁴⁶⁻⁴⁸.

Três anos depois, foi assinado um Acordo de Cooperação Técnica, entre a Fundação Oswaldo Cruz e a ANVISA, para subsidiar trabalhos e ações conjuntas de estudos, pesquisas, intercâmbio de informações, planejamento e estruturação, visando a não utilização de animais em pesquisas científicas, que viabilizassem a criação do Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos⁴⁹.

A partir desses trabalhos, foi publicada, em 3 de julho de 2012, a Portaria número 491, instituindo a RENAMA, a Rede Nacional de Métodos Alternativos, subordinada ao Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovação e Comunicações – MCTIC⁵⁰. A Portaria SEPED/MCTIC N° 3586, de 30 de junho de 2017, renovou, por mais três anos, a Rede Nacional de Métodos Alternativos. Esta iniciativa vem ao encontro do panorama internacional que fomenta e privilegia o princípio dos 3Rs. Nesta Portaria, está especificado que o processo de validação dos métodos alternativos propostos e/ou desenvolvidos pela Rede, vai ocorrer no âmbito do

Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos (BraCVAM), criado, oficialmente, pela Portaria da direção do INCQS, em 2013⁵¹.

A interlocução do BraCVAM e do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, CONCEA, é fundamental para que a legislação seja obedecida, uma vez que existe a Resolução Normativa número 17, de 3 de julho de 2014, que dispõe sobre o reconhecimento de métodos alternativos ao uso de animais, em atividades de pesquisa no Brasil e dá outras providências⁵².

Os fatos relatados confirmam a tendência da exclusão dos testes *in vivo* e enfatizam a necessidade de desenvolvimento, melhoria e validação dos ensaios *in vitro*.

2.4. Ensaios para avaliação da segurança de produtos cosméticos e matérias primas

As matérias primas, dentre elas os conservantes antimicrobianos e os produtos finais devem ser avaliados quanto à segurança, geralmente por métodos alternativos *in vitro*, aprovados pelos comitês internacionais, como o Comitê Europeu de Validação de Métodos Alternativos (ECVAM) e o Comitê de Coordenação Interagencial sobre Validação de Métodos Alternativos (ICCVAM). Uma variedade de conservantes antimicrobianos diferentes está comercialmente disponíveis, mas apenas poucos são efetivamente utilizados, quais sejam: parabenos, liberadores de formaldeído, metilcloroisotiazolinona e metilisotiazolinona²².

2.4.1. Ensaios biológicos *in vivo*

Embora os ensaios *in vivo* sejam pouco utilizados para cosméticos atualmente, alguns países ainda permitem que sejam realizados, mesmo sendo tendência mundial a substituição total por técnicas *in vitro*.

A avaliação do potencial de irritação ocular, baseado no estudo de Draize et al. (53), é realizado em coelhos albinos. O material a ser testado (0,1 mL) é aplicado diretamente no olho direito do coelho, sendo o olho esquerdo mantido como controle. Os resultados são avaliados após 24, 48, 72 horas e, ao final do sétimo dia após a aplicação. As reações oculares observadas devem ser classificadas com base na escala de Draize.

Realizado com diversas espécies de animais de experimentação, a avaliação da permeação cutânea permite quantificar a concentração da substância de interesse que é capaz de permear a pele e ser absorvida. A substância em análise, contida em uma formulação e marcada radioativamente, é aplicada na pele depilada dos animais. A substância é mantida em contato com a pele dos animais, por um determinado período e protegida, de forma a evitar a ingestão do produto pelo animal. Em seguida, a pele deve ser limpa e cada grupo de animais sacrificado, em diferentes tempos, para a análise do sangue e do local onde a substância foi aplicada, permitindo a análise do perfil de absorção da substância ativa⁵⁴.

A avaliação da atividade fototóxica é realizada em cobaias albinas (Dunkin-Hartley). O animal deve ter seu pelo raspado e depilado. Após 18 a 20 h, quando não houver mais sinais de irritação na pele do animal, seu dorso é dividido em 4 áreas: em duas deve ser aplicada a amostra; as outras duas áreas devem ser utilizadas como controle positivo. Uma das áreas contendo a amostra e o controle

positivo deve ser coberta com papel alumínio. Posteriormente, os animais são irradiados por duas horas a uma distância de 10 cm, de uma fonte de luz UV de 15 Watts. Após 24 e 48 h da exposição, os animais devem ser observados e, a intensidade dos eritemas, avaliada⁷.

A avaliação do potencial de irritação cutânea é realizada no dorso depilado de coelhos. O produto em teste deve ser aplicado, em dose única, e a aplicação deve ser protegida com um *patch* oclusivo, por 4 horas. Após 24 e 72 horas da aplicação, as lesões, na forma de eritema e edema, são avaliadas, de acordo com a escala de Draize¹².

2.4.2. Ensaaios *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. A dificuldade no emprego de métodos alternativos *in vitro* reside na avaliação da reatividade de sistemas mais complexos o que é, na prática, o caso da avaliação de risco toxicológico. 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 regulatórios¹².

O ensaio HET-CAM (*Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane*/membrana cório-alantóide) tem por objetivo avaliar, semiquantitativamente, o potencial irritante

de uma matéria prima ou, até mesmo, de produtos acabados, sobre a membrana cório-alantóide de ovo embrionado de galinha, no décimo dia de incubação. É um dos testes utilizados para a avaliação do potencial de irritação ocular. O ensaio é baseado na observação dos efeitos irritantes (hiperemia, hemorragia e coagulação), após 30 segundos, 2 e 5 minutos da aplicação do produto, puro ou diluído, sobre a membrana cório-alantóide. Uma escala, obtida com o ensaio, considera os fenômenos observados⁵⁵.

Outro teste também utilizado para a avaliação do potencial de irritação ocular é BCOP (*Bovine Corneal Opacity and Permeability*/Permeabilidade e opacidade de córnea bovina). É realizado para avaliar quantitativamente o potencial irritante de um ingrediente após aplicação sobre a córnea isolada de bovino, através da medida da opacidade e da permeabilidade após o contato com o produto teste. A medida da opacidade da córnea é realizada com o auxílio de um opacitômetro. A medida da permeabilidade da córnea é realizada conforme o tempo de contato, adicionando fluoresceína e a densidade óptica é medida em 490 nm. Uma escala, obtida com o ensaio, considera os fenômenos observados⁵⁶.

A citotoxicidade pelo método do vermelho neutro (NRU - *Neutral Red Uptake*) é avaliada usando uma cultura de células SIRC CCL 60 ou outras, adicionadas do corante vital vermelho neutro. A captação do corante pelas células viáveis é quantificada por espectrofotometria, através de um leitor automático de microplacas¹². A citotoxicidade também pode ser avaliada através do método que utiliza o corante vital MTT ou 3-(4,5 dimethyl thiazole-2yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide. Os parâmetros de avaliação observados são a porcentagem de morte celular e a concentração do produto que inibe 50% do crescimento celular (IC₅₀). Este ensaio é mais indicado para substâncias solúveis em água; porém, podem ser

utilizados agentes solubilizantes para substâncias com baixa solubilidade, desde que sua citotoxicidade seja avaliada e descontada da citotoxicidade obtida pela solução da amostra com o agente solubilizante^{12, 57}.

O teste de fototoxicidade tem por finalidade avaliar o potencial fototóxico de uma substância, realizado através da metodologia 3T3 NRU-UV. É definido como uma resposta tóxica clara, depois da primeira exposição da célula a agentes químicos e posterior exposição à irradiação. No que se refere à avaliação do risco alergênico e fotoalergênico, ainda não existem testes *in vitro*. O objetivo do ensaio é a comparação da citotoxicidade de um agente químico testado com ou sem exposição adicional a doses não tóxicas de luz UVA. A citotoxicidade é expressa na determinação da dose dependente que reduz o crescimento celular (linhagem 3T3) usando um corante vital (vermelho neutro). A concentração de um agente químico testado reflete a inibição da viabilidade celular em 50% (IC₅₀), calculada com o uso de um modelo adequado de curva, que expressa a porcentagem de células mortas em relação à concentração da substância testada⁵⁸.

O ensaio de permeação cutânea utiliza membranas biológicas ou sintéticas. Este método mede a difusão de substâncias químicas, através de uma membrana, coletadas em um sistema reservatório, que posteriormente é quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência. Atualmente, o ensaio de permeação *in vitro* tem sido realizado utilizando células de Franz modificadas^{7, 59}.

3. Objetivos

3.1. *Objetivo geral*

O presente trabalho teve por objetivo analisar *in vitro* a citotoxicidade e o potencial de irritação dos conservantes antimicrobianos fenoxietanol, mistura de fenoxietanol com metilisotiazolinona, mistura de metilcloroisotiazolinona e metilisotiazolinona, metilparabeno e propilparabeno, que são utilizados em cosméticos.

3.2. *Objetivos específicos*

- Avaliar e comparar a citotoxicidade, através da metodologia que utiliza o corante vital MTT, utilizando três linhagens celulares (HaCaT, HDFa e HepG2);
- Avaliar o potencial de irritação, através do ensaio HET-CAM;
- Trazer conhecimento técnico científico sobre o tema, pois embora seja um assunto muito debatido atualmente, não existe literatura ampla disponível.

4. Material e Métodos

4.1. Material

4.1.1. Reagentes e matérias primas

- *Human immortalized keratinocytes* – HaCaT;
- *Human Dermal Fibroblasts, adult* – HDFa;
- *Liver Hepatocellular Carcinoma* – HepG2
- Metilparabeno, grau cosmético;
- Propilparabeno, grau cosmético;
- Fenoxietanol, grau cosmético;
- Mistura de metilcloroisotiazolinona e metilisotiazolinona, grau cosmético;
- Mistura de fenoxietanol e metilisotiazolinona, grau cosmético;
- Soro fetal bovino (Cultilab®);
- *Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose* (DMEM) (Cultilab®);
- Solução de antibiótico (penicilina 10.000 U/mL, estreptomicina 10 mg/mL e anfotericina B 25 mg/mL) (Sigma®);
- Tripsina (Sigma®);
- Corante MTT;
- *Phosphate buffered saline* (PBS);
- Dimetilsulfóxido – DMSO;
- Etanol anidro 99,8% (Synth®);
- Álcool isopropílico (Synth®);
- Ovos galados (Leghorne branca);

- Solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,9% m/v;
- Solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 N;

4.2. Acessórios

- Béckeres;
- Bastões de vidro;
- Espátulas;
- Seringas de 5 mL;
- Filtro de seringa (porosidade 0,22 μm);
- Tubo de centrífuga tipo Falcon 15 mL;
- Tubo de centrífuga tipo Falcon 50 mL;
- Microtubo 2 MI (Kasvi®);
- Ponteiras de 5000, 1000 e 200 μL ;
- Micropipeta monocal de 5000, 1000 e 200 μL (Eppendorf®);
- Micropipeta multicanal (Kasvi®);
- Raspador de células (Kasvi®);
- Garrafa para cultivo celular (TPP®);
- Microplaca fundo chato 96 poços (TPP®);
- Lâmpada incandescente;
- Pinça;
- Tesoura ponta reta;
- Tesoura ponta curvada;
- Cronometro.

4.2.1. 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 Germany).
- Estufa de circulação de ar (Fanem 315 SE)

4.3. Métodos

4.3.1. Avaliação da citotoxicidade dos conservantes em linhagem celular HaCaT, HDFa e HepG2 através do método que utiliza o corante vital MTT

As células foram cultivadas em meio de cultura DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% da solução de antibiótico, em uma atmosfera

umidificada a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$, na presença de 5% de CO_2 , em garrafas próprias para o cultivo de células.

Após atingir a quantidade necessária de células, foi realizado o ensaio do MTT (methyl-thiazol-tetrazolium) para avaliar a viabilidade celular.

As garrafas contendo as células foram tripsinizadas, o seu conteúdo foi colocado em tubos estéreis e centrifugado por três minutos a 1500 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células foram suspendidas em meio de cultura. Em seguida, foi realizada a contagem das células em câmara de Neubauer, sendo que a concentração padronizada para os experimentos foi de 5×10^5 células/mL.

A suspensão de células foi plaqueada em microplaca de 96 poços com fundo chato, para onde foram transferidos 100 μL da suspensão de células para cada poço. 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.

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 sem soro, filtrada no fluxo laminar, em filtro de estéril, com porosidade 0,22 μm . As concentrações utilizadas foram obtidas através de diluição seriada, em microtubos estéreis e estão descritas na tabela 1.

Foi retirado o meio de cultura das microplacas e adicionados os tratamentos, sendo 100 μL de cada tratamento, nos poços correspondentes. Os controles utilizados foram: controle negativo (meio sem soro) e o controle positivo (DMSO a 10%, diluído em meio sem soro). As microplacas foram encubadas, novamente, em estufa a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$, na presença de 5% de CO_2 , por 24 horas. Para os conservantes metilparabeno e propilparabeno, foi necessário utilizar 5% de etanol 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. Os valores obtidos foram descontados da citotoxicidade obtida pelo metilparabeno e propilparabeno.

Após as 24 horas de tratamento, o meio foi retirado das microplacas, que foram lavadas com 100 µL de PBS. Foram adicionados 100 µL da solução de MTT em PBS (1 mg/mL) em cada poço. As placas foram encubadas por 3 horas em estufa na presença de 5% de CO₂, a 37±2°C. Posteriormente, foi retirada a solução de MTT das microplacas e foram adicionados 100 µL de álcool isopropílico em cada poço. Em seguida, foi realizada uma leve agitação e verificação da solubilização dos cristais de formazana. As absorbâncias foram avaliadas em leitor de placas (λ = 595 nm).

Tabela 1. Conservantes e concentrações utilizadas nos ensaios.

Conservantes	Concentrações utilizadas % (m/v)	Concentração máxima %¹	Concentração usual %
Fenoxietanol	0,09 a 3,00.	1,0	0,10 – 0,70
Fenox/Mit	0,056 a 1,80.	0,60 ²	0,40 – 0,60 ²
CMit/Mit	0,00014 a 0,00450.	0,00150	0,00080 – 0,00150
Propilparabeno	0,006 a 0,200.	0,80 - 0,40 ³	0,020 – 0,10
Metilparabeno	0,012 a 0,400.	0,80 - 0,40 ³	0,050 – 0,250

¹Concentração máxima estabelecida pela ANVISA (RDC 29/2012);

²Concentrações recomendadas pelo fabricante;

³0,4% (expresso como ácido) individual ou 0,8%(expresso como ácido) para misturas dos sais ou ésteres.

Os resultados foram avaliados através do programa Excel 2016 e os gráficos foram plotados no software OriginPro 2016 9,3.

A porcentagem de células mortas foi calculada em relação ao controle negativo, representando a citotoxicidade de cada tratamento, segundo proposto por Zhang et al.⁶⁰ e, em seguida, foi determinada também a porcentagem de células vivas e o IC₅₀, conforme as fórmulas descritas a seguir.

Através das absorbâncias obtidas pode ser calculada a % de células mortas e a % de células vivas, onde:

$$\% \text{ células mortas} = \frac{(Abs_{Cn} - Abs_{Am})}{Abs_{Cn}} \times 100 \quad (1)$$

Abs_{Cn}: absorbância do controle negativo;

Abs_{Am}: absorbância da amostra.

$$\% \text{ células vivas} = 100 - \% \text{ células mortas} \quad (2)$$

Para os conservantes metilparabeno e propilparabeno, a porcentagem de células mortas obtidas com o tratamento com etanol foi descontada da porcentagem de células mortas obtidas com estes conservantes, para que o resultado final refletisse apenas a citotoxicidade real⁶¹.

Os ensaios foram realizados em, no mínimo, 3 experimentos independentes.

4.3.2. Ensaio de irritação em modelo organotípico – HET - CAM (Hen's Egg Test on the Choriallantoic Membrane)

Os ovos férteis de galinha da raça Leghorn branca foram obtidos do criatório Mário Salviato Ovos Férteis, localizado em Porto Ferreira, SP.

O método utilizado corresponde a uma modificação do método descrito por Luepke⁶² para o ensaio do potencial irritante e corrosivo, permitindo o estudo dos

efeitos imediatos das substâncias sólidas ou líquidas na membrana do ovo de galinha embrionado. Foi seguida a metodologia proposta pela ICCVAM⁵⁵, com adaptações.

Os ovos estavam frescos (postos a não mais que sete dias), limpos e pesando entre 50 e 60 gramas. Os ovos que apresentavam qualquer variação na casca foram descartados. Os que foram utilizados no ensaio foram incubados na posição vertical sobre um suporte para ovos, de forma que a parte mais larga e plana ficasse voltada para cima, em estufa de circulação de ar a $37,8 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$ e $70 \pm 2\%$ de umidade relativa, por 10 dias.

No décimo dia de incubação, foi realizado o ensaio. Os ovos foram iluminados com a ajuda de uma lâmpada incandescente. Ao iluminar os ovos, foi possível identificar os que estavam galados e marcar a câmara de ar do ovo (local onde foi feito o corte da casca).

Após, foi realizado o corte na casca do ovo, evidenciando, assim, a membrana da casca, que foi removida cuidadosamente, expondo a membrana cório-alantoide. Em seguida, as membranas foram analisadas com a finalidade de encontrar possíveis danos, o que poderia implicar na exclusão do ovo no experimento. Também foram descartados os ovos nos quais não havia embrião ou em caso de morte (ausência de respiração e mobilidade)⁶³.

Como controle positivo, os ovos foram tratados com solução de NaOH 0,1 N como modelo de produto altamente irritante e no qual foram observados sempre os três parâmetros a serem considerados (hiperemia, hemorragia e/ou coagulação). Como controle negativo, os ovos foram testados com a solução de NaCl 0,9% m/v como modelo não irritante, para o qual não são esperados sinais de irritação na membrana⁵⁵.

As amostras testadas foram aplicadas na membrana cório-alantoide. Foram utilizados 300 µL dos conservantes líquidos (fenoxietanol, mistura de Fenox/Mit e mistura de CMit/Mit) e 100 µg para os conservantes sólidos (propilparabeno e metilparabeno).

Após a aplicação das amostras, as alterações na membrana cório-alantoide foram avaliadas por um período de 5 minutos⁶⁴, e foi anotado o momento (tempo em segundos) em que ocorreu o aparecimento dos sinais de irritação, sendo que, nos tempos 0,5, 2 e 5 minutos foram tiradas fotos para auxiliar a avaliação dos resultados. Foram avaliados os seguintes critérios⁶³:

- Hiperemia: aparecimento de capilares sanguíneos que antes não eram visíveis ou os que já eram visíveis e ficaram mais vermelhos e intensos;
- Hemorragia: difusão nítida de sangue no meio;
- Coagulação: mancha rosada (agregação de plaquetas) ou grumos esbranquiçados (coagulação de proteínas). É possível, também, observar um fenômeno de opacidade total ou parcial da membrana.

No Quadro 2, estão dispostos os valores utilizados para calcular o valor da Pontuação de Irritação (PI). Os valores numéricos dependentes do tempo para hiperemia, hemorragia e coagulação foram somados para dar um único valor numérico, indicando o potencial de irritação da substância de teste em uma escala que varia de 0 a 21. Foram consideradas irritantes as substâncias que obtiveram um PI igual ou superior a 9.

O teste foi considerado aceitável se os controles negativos e positivos induzissem uma resposta que se enquadrasse na classificação de não irritante e irritante. A solução de NaCl 0,9% m/v foi considerada não irritante se o valor da

Pontuação de Irritação (PI) fosse 0,0 e a solução de NaOH 0,1 N foi considerada irritante se o valor de PI fosse 19,0.

Após o ensaio, todos os ovos foram descartados em lixo branco para posterior incineração.

Quadro 2. Esquema de pontuação para Teste de Irritação (método HET-CAM).

Fenômenos	Pontuação		
	0,5 min	2 min	5 min
Hiperemia	5	3	1
Hemorragia	7	5	3
Coagulação	9	7	5

Fonte: Maruno⁶³.

No Quadro 3, consta o índice utilizado para avaliar os fenômenos obtidos no ensaio que vai de *praticamente não irritante* a *irritante*. Foram utilizados três ovos de galinha por amostra (controle positivo, controle negativo e conservantes), sendo que as pontuações de cada fenômeno, observadas para cada ovo, foram somadas para o cálculo da média aritmética. A partir desse valor, cada conservante testado foi classificado.

Quadro 3. Pontuação referente aos fenômenos em função do tempo.

Índice HET-CAM	Categorias
0,0 a 0,9	Praticamente não irritante
1,0 a 4,9	Ligeiramente irritante
5,0 a 8,9	Moderadamente irritante
9,0 a 21,0	Irritante

Fonte: Adaptado de Bernardi⁶⁴.

5. Resultados

5.1. Avaliação da citotoxicidade dos conservantes em linhagem celular HaCaT, HDFa e HepG2 através do método que utiliza o corante vital MTT

Este ensaio foi realizado para os conservantes propostos para este estudo (fenoxietanol, Fenox/Mit, CMit/Mit, propilparabeno e metilparabeno), utilizando as linhagens celulares HaCat, queratinócitos humanos metabolicamente incompetentes, HDFa, fibroblastos humanos de adultos, e HepG2, célula de carcinoma hepatocelular.

Na Tabela 2 estão listados os valores de IC_{50} para cada um dos conservantes e linhagens celulares utilizados.

Foram testadas diferentes concentrações dos conservantes (Tabela 1, item 4.3.1.) e construídos gráficos de concentração versus porcentagem células vivas, mostrados nas Figuras de 4 a 6. A partir destas curvas, foram obtidas as equações das retas, que fornecem informações suficientes para que sejam calculadas as concentrações de conservantes necessárias para provocar 50% de morte celular (IC_{50}).

Tabela 2. Valores de IC₅₀ obtidos nos ensaios de citotoxicidade em diferentes linhagens celulares.

Conservantes	IC ₅₀ % (m/v) HaCaT	IC ₅₀ % (m/v) HDFa	IC ₅₀ % (m/v) HepG2	Concentração	Concentração
				máxima % ¹	usual %
Fenoxietanol	0,237	0,200	0,248	1,0	0,1 – 0,7
Fenox/Mit	0,156	~0,056	0,119	0,6	0,4 – 0,6
CMit/Mit	NT ²	NT ²	>0,0045	0,0015	0,0008 – 0,0015
Propilparabeno	~0,200	>0,200	0,039	0,8/0,4	0,02 – 0,1
Metilparabeno	>0,400	>0,400	0,062	0,8/0,4	0,05 – 0,25

¹Concentração máxima estabelecida pela ANVISA (RDC 29/2012);

²NT: não tóxico.

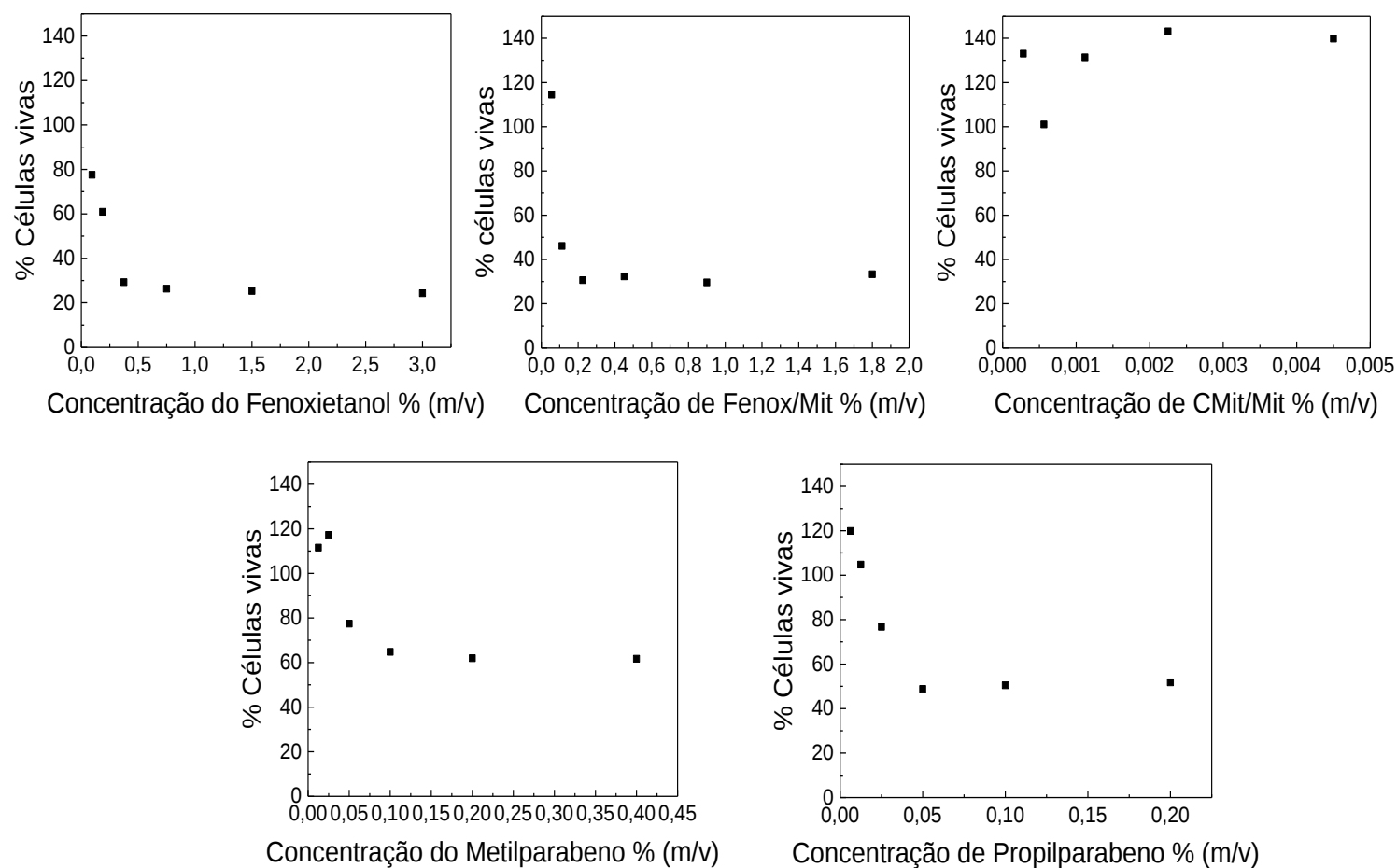


Figura 4. Curvas de viabilidade celular para linhagem HaCaT após 24h de tratamento com os conservantes Fenoxietanol, Fenox/Mit, CMit/Mit, Metilparabeno e Propilparabeno.

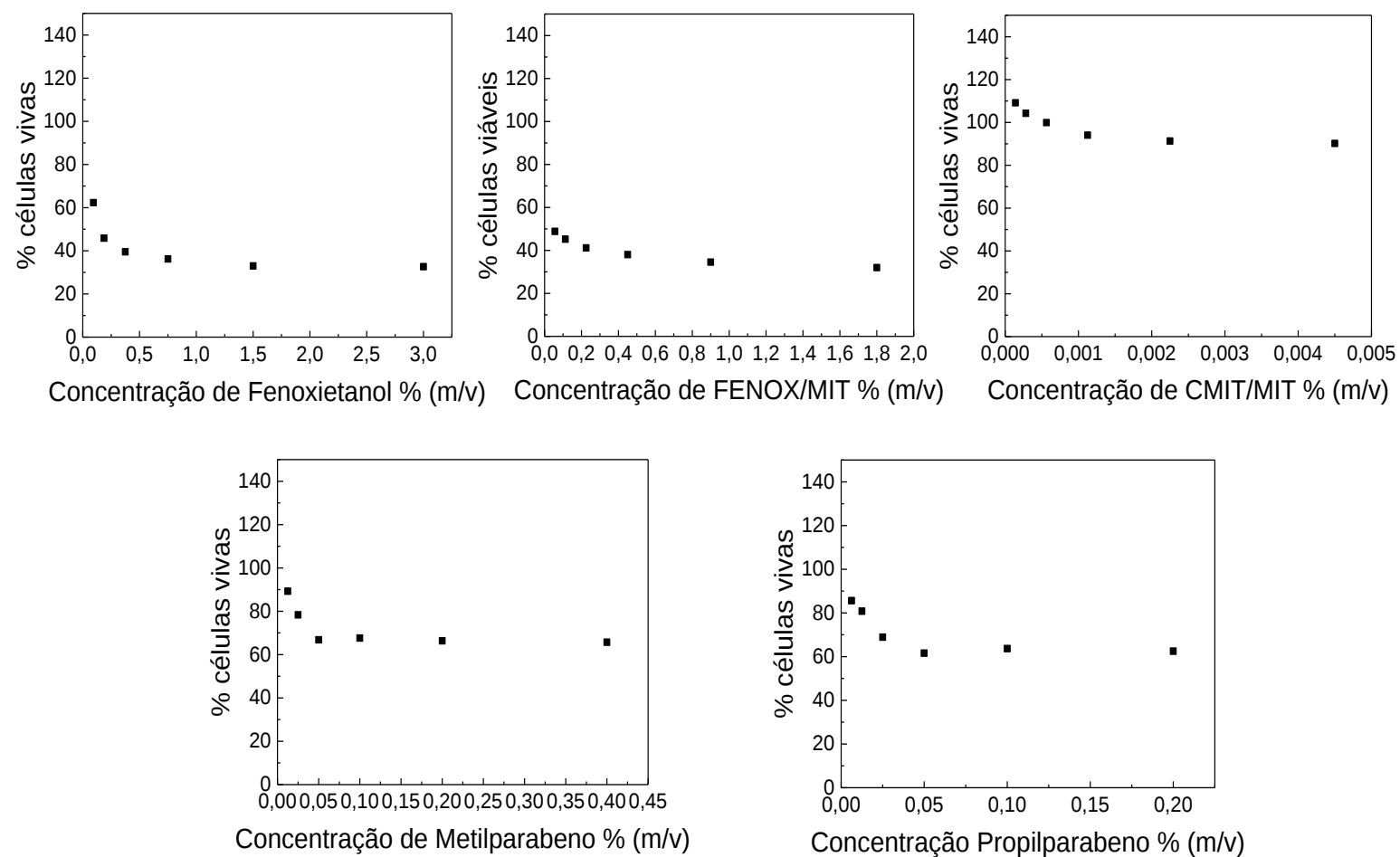


Figura 5. Curvas de viabilidade celular para linhagem HDFa após 24h de tratamento com os conservantes Fenoxietanol, Fenox/Mit, CMit/Mit, Metilparabeno e Propilparabeno.

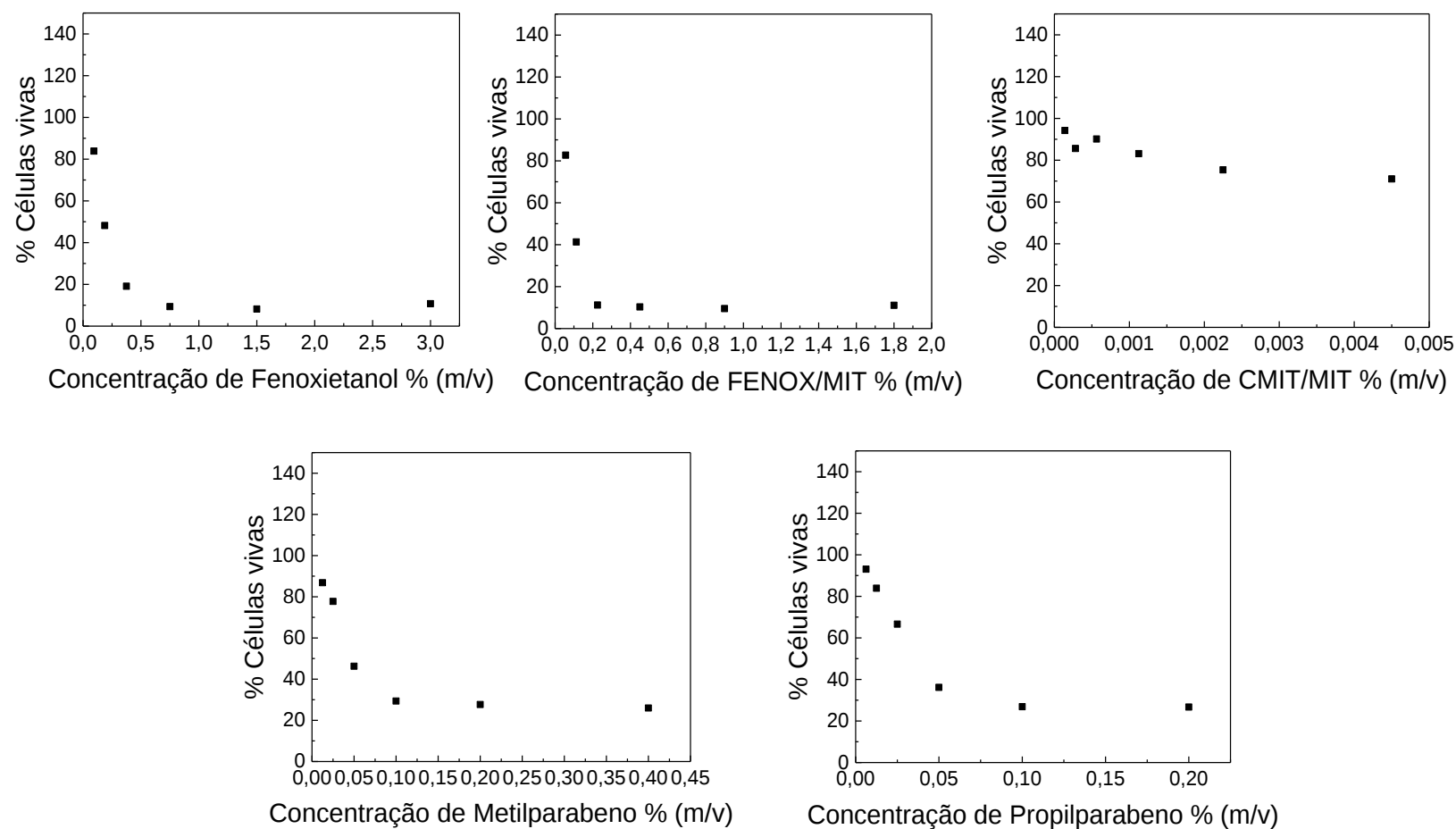


Figura 6. Curvas de viabilidade celular para linhagem HepG2 após 24h de tratamento com os conservantes Fenoxietanol, Fenox/Mit, CMit/Mit, Metilparabeno e Propilparabeno.

5.2. Ensaio de irritação em modelo organotípico – HET - CAM (Hen's Egg Test on the Choriallantoic Membrane)

A membrana cório-alantoide do ovo de galinha é altamente vascularizada e tem sido usada para avaliar o potencial irritante, expresso como pontuação de irritação (PI) de matérias primas e/ou produtos cosméticos.

Na Tabela 3 estão descritas as PIs e a respectiva classificação obtida por cada conservante. Os fenômenos observados foram avaliados a partir de uma escala proposta no método (Quadro 3 - Item 4.3.2.).

Tabela 3. Classificação dos conservantes submetidas ao teste HET-CAM.

Conservantes	Tempo¹ (s)	PI	Classificação
Fenoxietanol	21*	16	Irritante
Fenox/Mit	24*	10	Irritante
CMit/Mit	24*	5	Moderadamente irritante
Propilparabeno	300**	0	Praticamente não irritante
Metilparabeno	121*	6	Moderadamente irritante

¹Tempo, em segundos, em que ocorreu* ou não** a primeira alteração na membrana cório-alantoide.

Nas Figuras 7 a 13 é possível observar os fenômenos analisados na membrana cório-alantoide após o tratamento com os controles (negativo e positivo) e conservantes.

Figura 7. Avaliação do potencial de irritação na membrana cório-alantoide do controle negativo NaCl 0,9% m/v, após 0,5, 2, e 5 min. *ST: sem tratamento.

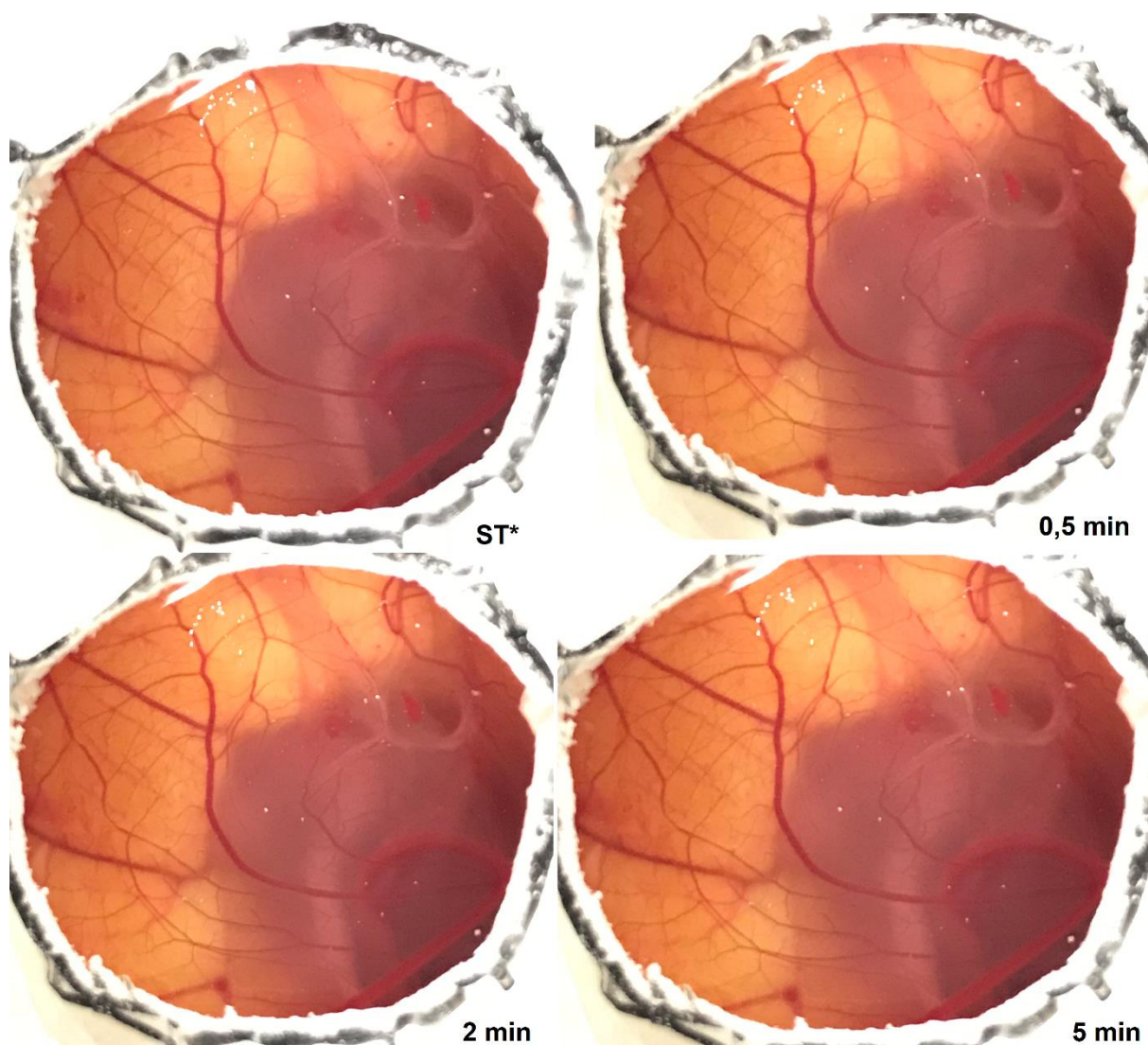


Figura 8. Avaliação do potencial de irritação na membrana cório-alantoide do controle positivo NaOH 0,1N, após 0,5, 2, e 5 min. *ST: sem tratamento.

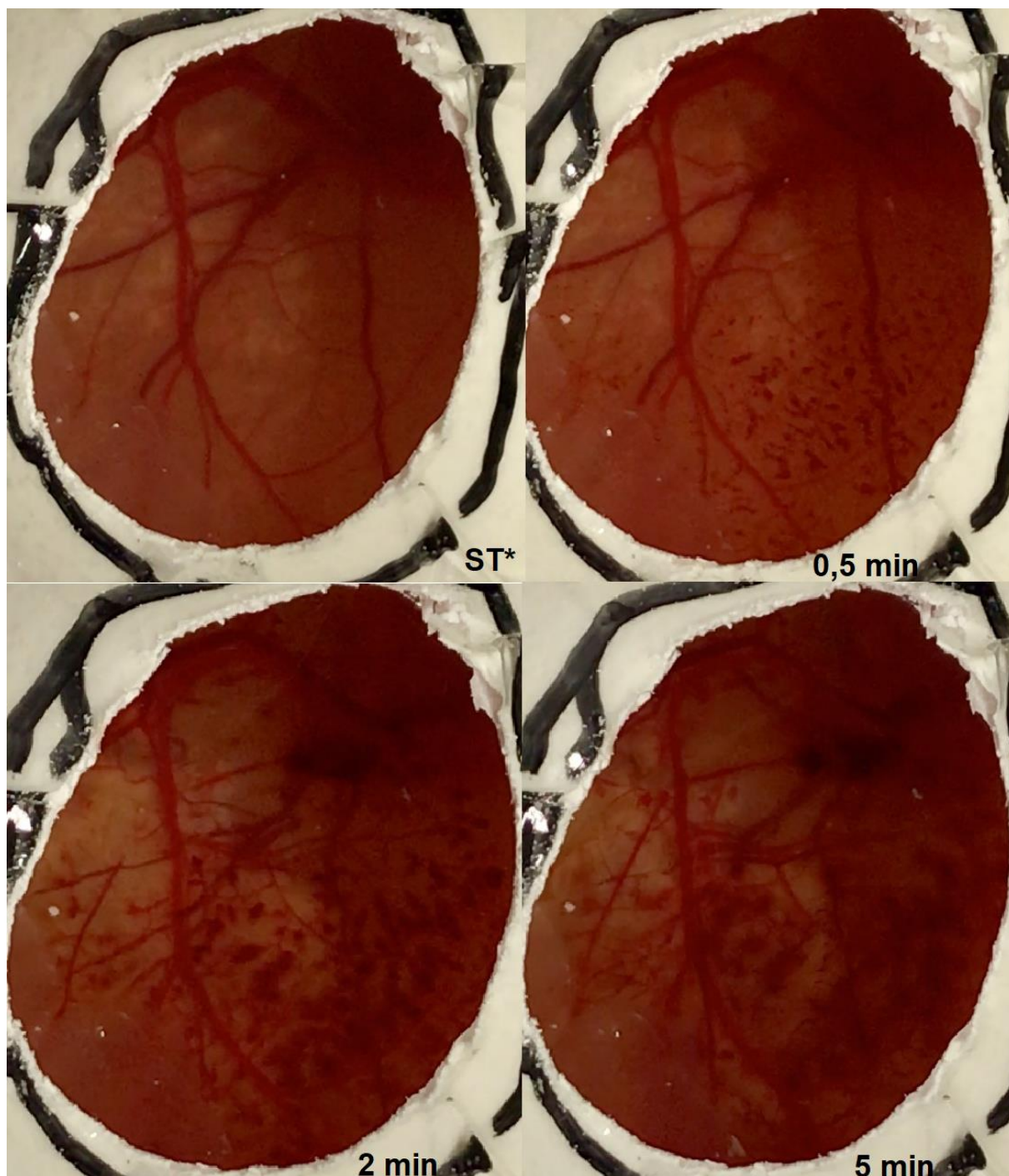


Figura 9. Avaliação do potencial de irritação na membrana cório-alantoide do conservante fenoxietanol, após 0,5, 2, e 5 min. *ST: sem tratamento.

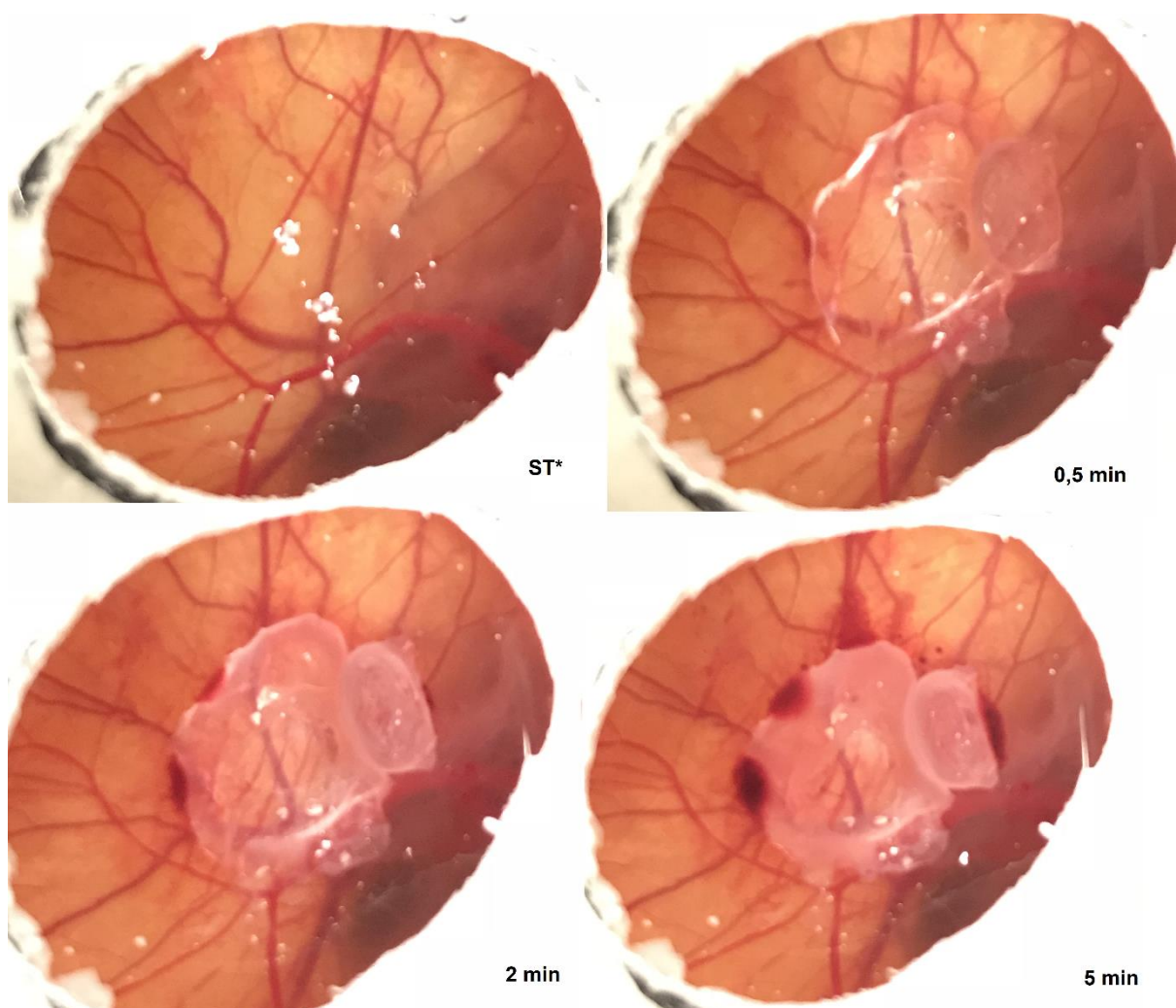


Figura 10. Avaliação do potencial de irritação na membrana cório-alantoide do conservante Fenox/Mit, após 0,5, 2, e 5 min. *ST: sem tratamento.

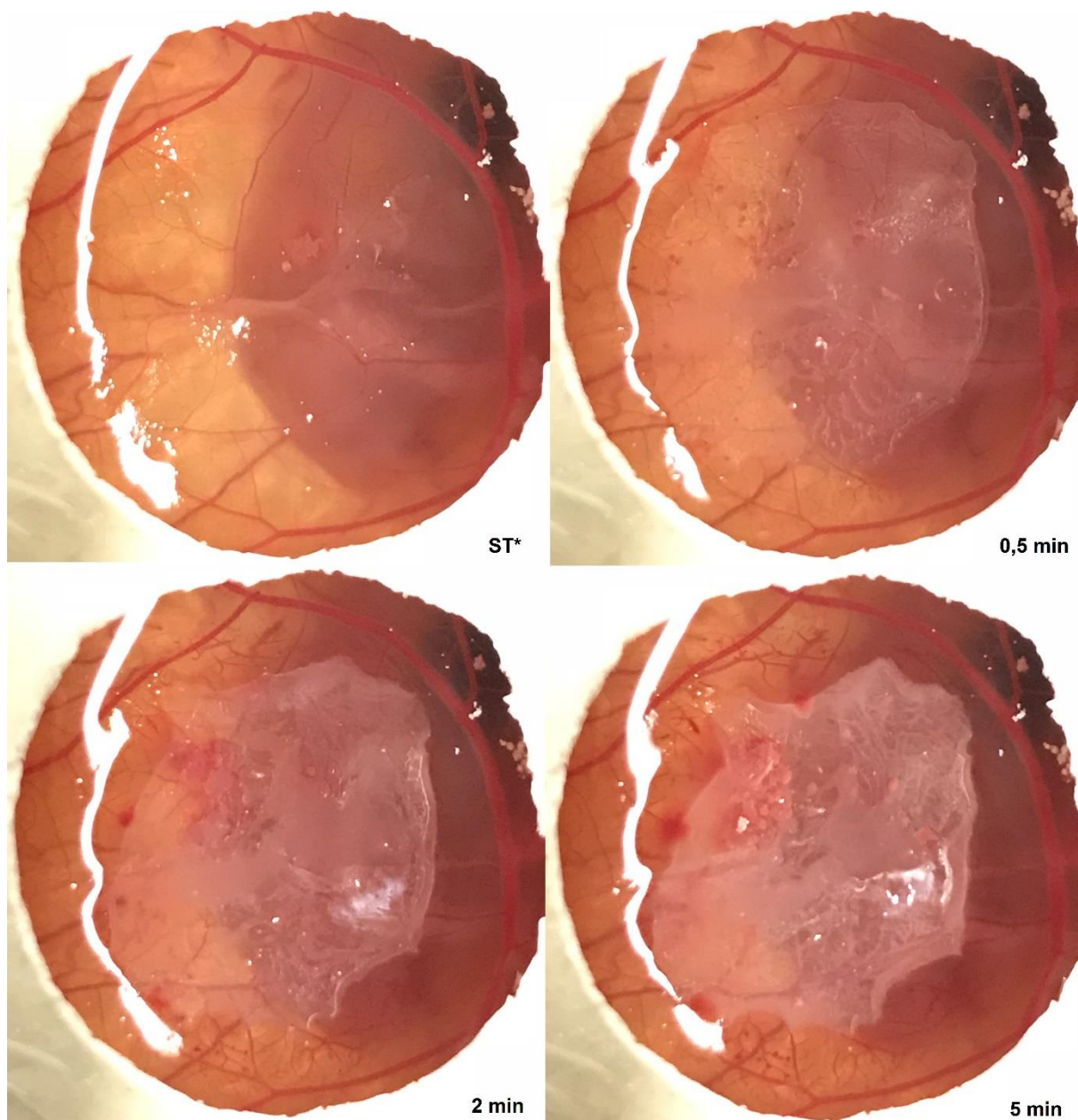


Figura 11. Avaliação do potencial de irritação na membrana cório-alantoide do conservante CMit/Mit, após 0,5, 2, e 5 min. *ST: sem tratamento.

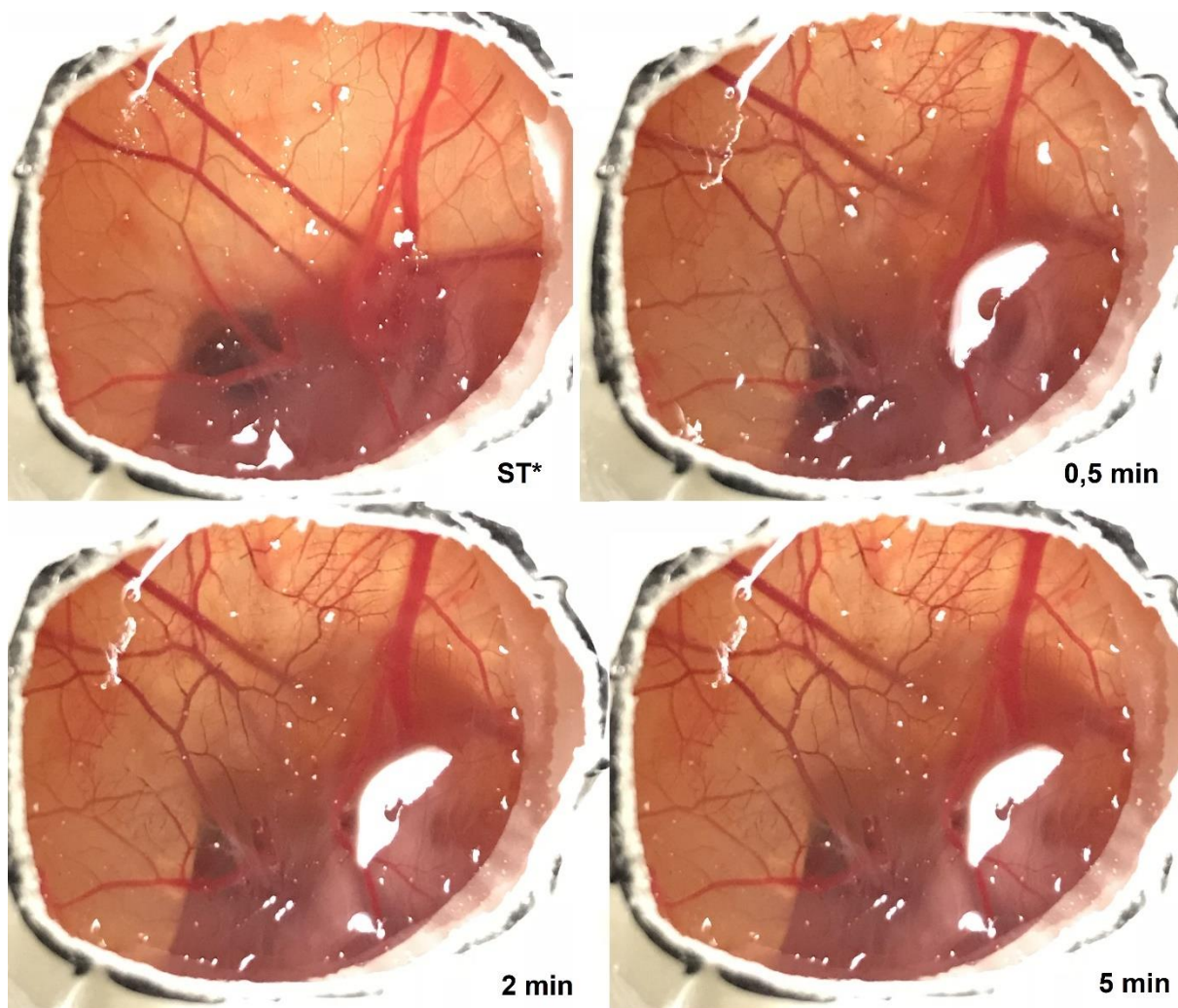


Figura 12. Avaliação do potencial de irritação na membrana cório-alantoide do conservante propilparabeno, após 0,5, 2, e 5 min. *ST: sem tratamento.

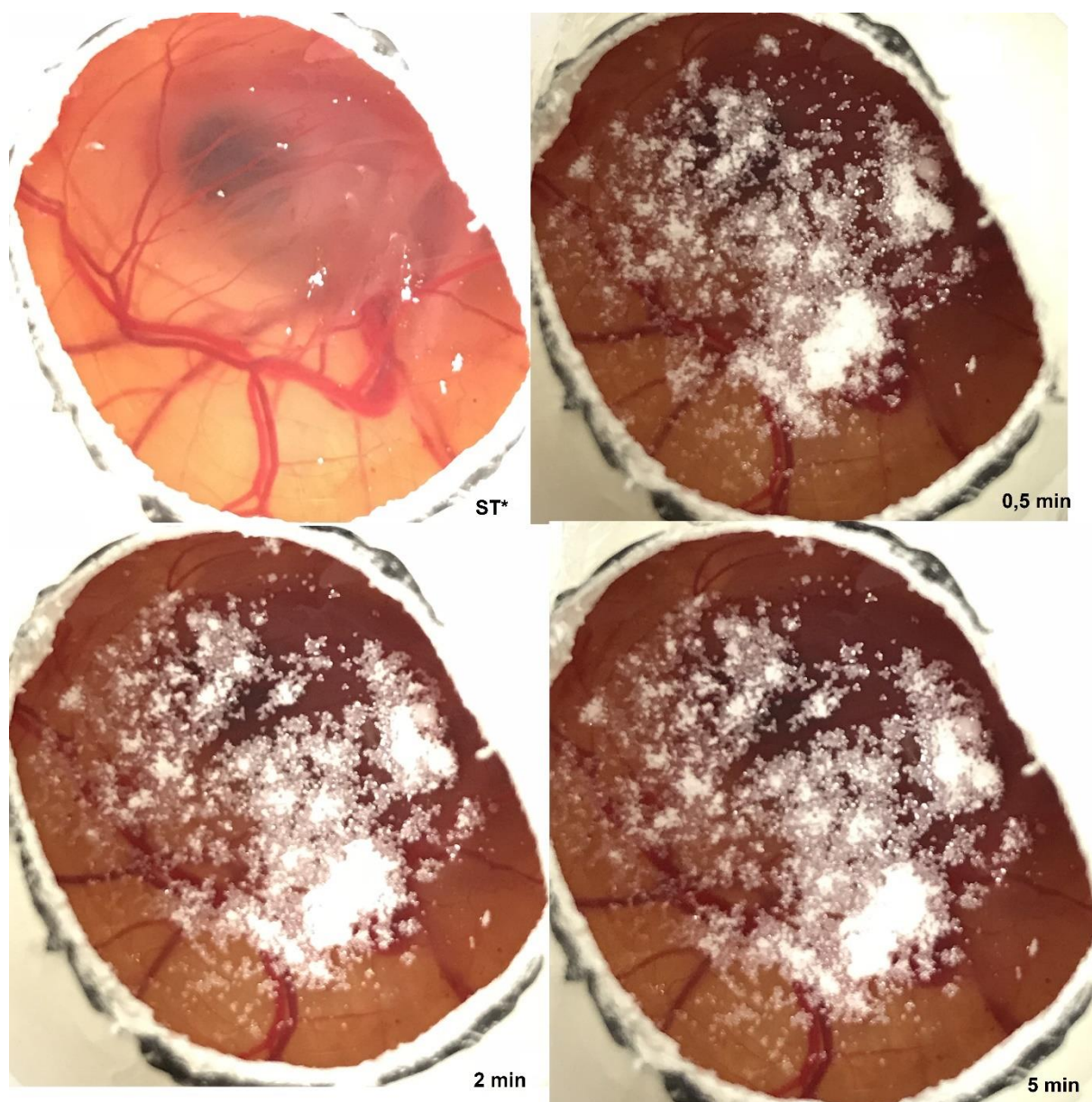
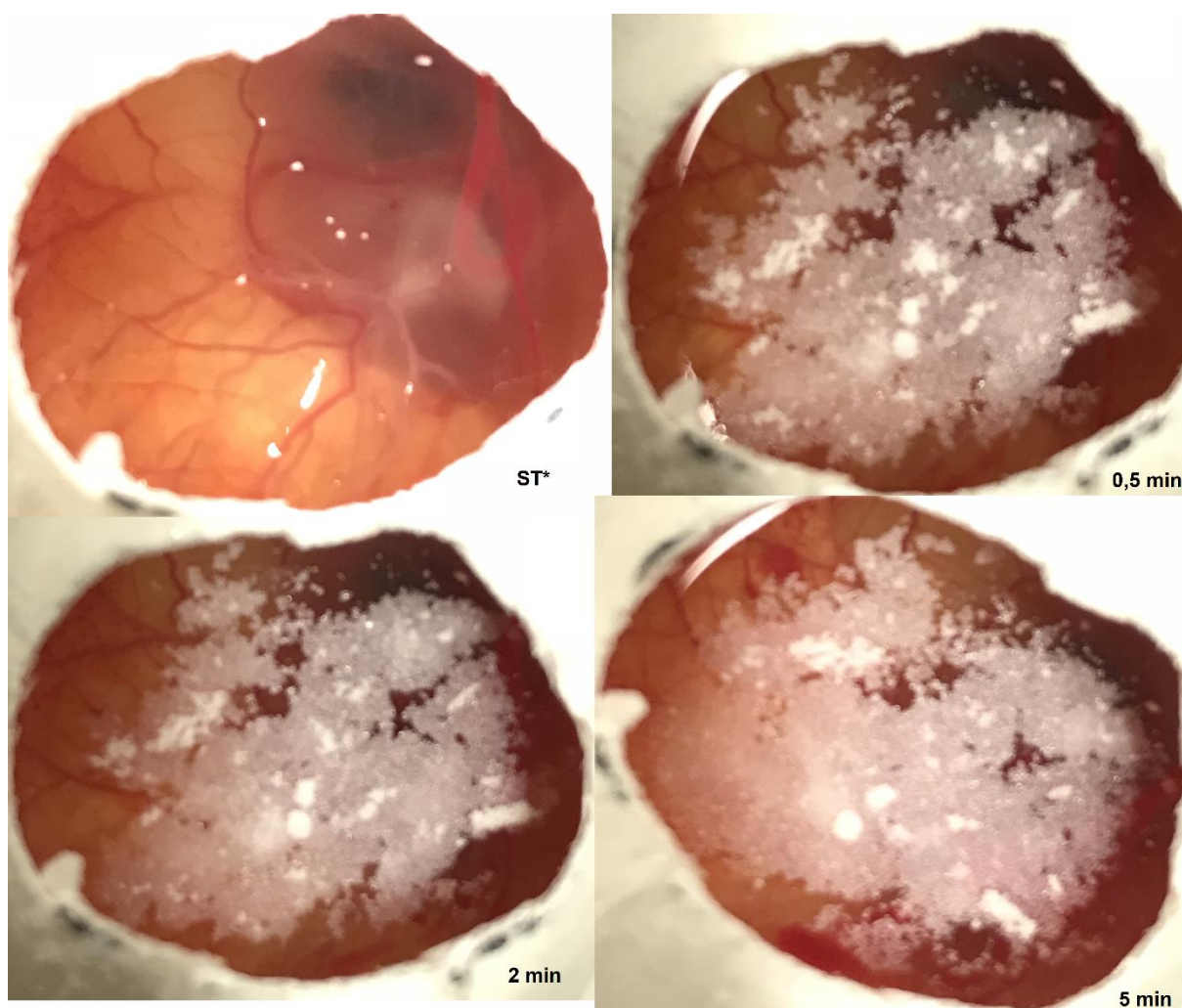


Figura 13. Avaliação do potencial de irritação na membrana cório-alantoide do conservante metilparabeno, após 0,5, 2, e 5 min. *ST: sem tratamento.



6. Discussão

6.1. Avaliação da citotoxicidade dos conservantes em linhagens celulares HaCaT, HDFa e HepG2 pelo método do MTT

A avaliação da citotoxicidade dos conservantes usados neste trabalho (propilparabeno, metilparabeno, fenoxietanol, mistura de metilcloroisotiazolinona e metilisotiazolinona, mistura de fenoxietanol e metilisotiazolinona) foi realizada pelo método que utiliza o corante vital MTT. Este corante, quando em contato com as células, sofre metabolização por suas mitocôndrias formando cristais insolúveis de violeta de formazana. Com isso, é possível verificar a viabilidade celular^{7, 57}.

As linhagens celulares HaCat e HDFa foram escolhidas por estarem presentes na epiderme e derme humana, já que os cosméticos são produtos de uso externo, aplicados topicamente sobre a pele⁶⁶.

A linhagem celular HepG2 foi utilizada para avaliar uma possível citotoxicidade hepática, caso esses conservantes possam permear através da pele, chegar à corrente sanguínea e apresentar uma atividade sistêmica. Estas células são caracterizadas pela alta capacidade de metabolização de xenobióticos, já que apresentam atividade de várias enzimas de fase I e fase II, que desenvolvem papéis importantes nos processos de ativação e detoxificação de pró-carcinógenos genotóxicos⁶⁸⁻⁶⁹.

Os conservantes que apresentaram as maiores citotoxicidades foram a mistura de fenoxietanol e metilisotiazolinona seguido pelo fenoxietanol, em todas as linhagens celulares testadas. Em um estudo realizado por Anselmi et al.³⁷ com esses mesmos conservantes, mas em linhagem celular diferente (HL60), apresentaram diminuição drástica da viabilidade celular no tempo zero, sugerindo morte súbita das células. Esse fato foi observado nas concentrações de 1% para o fenoxietanol, fato

preocupante, pois essa concentração é exatamente a máxima permitida pela ANVISA; ou seja, poderia ser utilizada em um produto cosmético.

A elevada citotoxicidade da mistura de conservantes (Fenox/Mit) pode ser atribuída a uma possível interação entre as duas substâncias levando a uma maior toxicidade, que, inclusive, foi mais acentuada na linhagem HDFa ($IC_{50} \sim 0,056$).

A mistura de conservantes metilcloroisotiazolinona e metilisotiazolinona não apresentou citotoxicidade nos ensaios realizados com HDFa e HaCaT, fato também observado por Anselmi et al.³⁷ na concentração de 0,001%, com a viabilidade celular em torno de 90%, efeitos citotóxicos para a metilisotiazolinona foram notados a uma concentração de 0,1%, valor muito acima do máximo permitido para uso no Brasil, que é de 0,0015% (RDC 29/2012)²³. Nos ensaios realizados com a HepG2, foi possível notar uma diminuição da viabilidade celular ($\sim 73\%$) na concentração mais alta testada (0,0045%), em comparação com as linhagens HaCaT ($\sim 100\%$) e HDFa ($\sim 95\%$), embora não tenha sido possível calcular o IC_{50} , pois as concentrações utilizadas não foram capazes de causar 50% de morte celular. Essa diminuição da viabilidade celular pode ter sido causada pelo metabólito formado através da metabolização desses conservantes. Essa mistura de conservantes tem sido relacionada a processos alérgicos, como no caso da dermatite de contato alérgica induzida por cosméticos, fato relatado no trabalho de Laguna et al.⁴² onde 54 *patches* positivos foram relacionados à mistura de CMit/Mit, de um total de 315 *patches* positivos a 46 alérgenos diferentes.

Groot et al.⁴¹ em seu estudo para determinar quais eram os componentes presentes em cosméticos responsáveis por dermatite de contato, observaram que o mais importante alérgeno cosmético foi o sistema conservante composto por metilisotiazolinona e metilclorosotiazolinona, que provocou reação em 33 pacientes

(27,7%). Processos alérgicos que envolvem o sistema imunológico não podem ser observados no tipo de experimento realizado neste trabalho, uma vez que seria necessária a realização de outros testes para verificar essa questão⁷⁰.

Nos ensaios realizados com as linhagens celulares HaCaT e HDFa, os parabenos apresentaram citotoxicidade; porém, os valores encontrados de IC₅₀ estão longe da concentração usual, o que garante uma faixa de segurança. Experimentos realizados por OISHI²⁷ com o propilparabeno em ratos machos, foram observadas alterações na função reprodutiva, incluindo redução da quantidade de esperma, diminuição da cauda do espermatozóide e dos níveis de testosterona. Esses resultados foram encontrados em concentrações muito elevadas (~1%), o que não reflete a concentração usualmente empregada em produtos cosméticos (0,02 – 0,1%).

Outros estudos⁷¹⁻⁷², também realizados pelo mesmo autor com os parabenos, analisando seus efeitos sobre o sistema reprodutor de ratos só apresentaram resultados significativos em altas concentrações, em torno de 1%. E, ainda, em outro estudo de Oishi⁷³ realizado com metil e etilparabeno, em ratos machos, para avaliar o sistema reprodutor, não foram encontradas alterações na secreção de hormônios sexuais ou na função reprodutiva masculina em todas as concentrações testadas.

Os conservantes metilparabeno e propilparabeno apresentaram efeitos citotóxicos na linhagem celular HepG2. Os IC₅₀ obtidos foram, respectivamente, 0,062 e 0,039 mg/mL, valores que se encontram dentro da faixa da concentração usual, o que não é desejável, pois poderiam causar alguma reação adversa. A elevada citotoxicidade pode ter sido causada por um metabólito ativo comum dessa classe de conservantes.

Em estudo realizado por Aubert et. al.¹ usando propil, metil e butilparabeno por via oral, subcutânea e tópica, os resultados não foram preocupantes o que permitiu, aos autores, concluir que o uso dessa classe de conservantes é seguro, pois os resultados observados não apresentaram alterações significativas.

Outro estudo realizado por Janjua et al.⁷⁴ em humanos, sugeriu a presença de vestígios de parabenos intactos, em plasma humano, após aplicação tópica. Existe uma grande divergência de opiniões, quanto ao uso ou não dos parabenos e é importante assegurar que não ocorra a permeação evitando, assim, possíveis efeitos sistêmicos.

Foram divulgados diversos estudos sobre uma possível ação estrogênica dos parabenos relacionados a tumores de mama^{34, 75-78}, embora apenas três parabenos (butil, isobutil e benzilparabeno) demonstraram atividade estrogênica em um teste realizado *in vivo*. No entanto, a potência estrogênica desses parabenos é de uma ordem de magnitude menor do que o estrogênio. Uma relação causal entre a exposição a estes conservantes e um efeito adverso sobre a saúde humana não foi estabelecida, necessitando, assim, de estudos complementares que possam garantir o uso seguro desses conservantes, que são utilizados há tantos anos e possuem uma excelente atividade antimicrobiana.

Experimentos realizados por Roper et al.³⁶ em ratos e em célula de difusão com pele humana demonstraram que a permeação *in vivo* e em *in vitro* do fenoxietanol foi rápida e completa dentro de 24 horas. O fato encontrado é preocupante, pois no presente trabalho o fenoxietanol apresentou uma elevada citotoxicidade nas três linhagens celulares testadas, o que poderia gerar danos celulares nos usuários de cosméticos contendo esse conservante.

Não foram encontrados dados na literatura, avaliando a citotoxicidade dos conservantes cosméticos testados neste estudo, nas mesmas culturas celulares utilizadas (HaCaT, HDFa e HepG2), ressaltando a importância do trabalho realizado.

6.2. Ensaio de irritação em modelo organotípico – HET - CAM (Hen's Egg Test on the Choriallantoic Membrane)

A membrana cório-alantoide do ovo de galinha é uma estrutura muito vascularizada, utilizada pelo embrião para as trocas gasosas através da casca do ovo. Sua característica estrutural faz com que seja considerada similar aos tecidos altamente vascularizados, como a conjuntiva de coelhos, sendo capaz de responder frente a produtos irritantes. O objetivo do ensaio é avaliar semiquantitativamente o potencial irritante de um produto ou matéria prima sobre a membrana cório-alantoide de ovo embrionado de galinha, no décimo dia de incubação. Esse método é validado internacionalmente, aceito pela legislação francesa e indicado pela ANVISA na avaliação da segurança de produtos cosméticos e farmacêuticos^{63, 79-81}.

O ensaio HET-CAM foi escolhido por ser um método alternativo ao uso de animais, possuir baixo custo e tempo de resposta rápido. Este ensaio surgiu como alternativa viável ao ensaio de Draize⁵³, realizado em coelhos para mensurar a irritação ocular de produtos cosméticos. Com a proibição dos ensaios em animais em diversas partes do mundo e seguindo os princípios dos 3R's, é necessária a utilização dos modelos *in vitro*, e desenvolvimento e validação de novas metodologias que possuam resultados equivalentes aos obtidos *in vivo*.

A irritação pode ser definida como intolerância local podendo corresponder a reações de desconforto, variando sua intensidade desde ardor, coceira e pinicação,

podendo chegar até a corrosão e destruição do tecido. Todas estas reações estão restritas à área em contato direto com o produto¹².

Os conservantes considerados irritantes foram o fenoxietanol (PI: 16) e a mistura de fenoxietanol e metilisotiazolinona (PI: 10). Foram observados, na membrana cório-alantóide, os fenômenos hiperemia, hemorragia e coagulação, demonstrando, assim, o alto potencial de irritação desses conservantes. A mistura de metilcloroisotiazolinona e metilisotiazolinona (PI: 5) e o metilparabeno (PI: 6) foram considerados moderadamente irritantes, pois somente os fenômenos hiperemia e hemorragia foram observados. O propilparabeno (PI: 0) foi considerado praticamente não irritante, uma vez que foi possível visualizar os vasos sanguíneos da membrana corió-alantoide sem sinais de irritação, semelhante ao que ocorreu no controle negativo.

CMit/Mit e os parabenos, são utilizados em concentrações muito baixas, o que poderia diminuir os efeitos tóxicos quando solubilizados em um produto cosmético.

A importância do HET-CAM como instrumento de triagem de formulações/matérias primas pode ser demonstrada por meio do grande número de publicações que utilizam este teste com boa habilidade para diferenciar substâncias irritantes e não irritantes^{63, 82-86}.

Wilson e Steck⁸⁷ aplicaram o ensaio de HET-CAM modificando a pontuação do fenômeno de irritação para vários extratos de plantas (não divulgados) com a finalidade de obter uma lista de extratos vegetais não irritantes, com um teste de baixo custo e que pudesse servir como parâmetro classificatório para os testes clínicos subsequentes. Paralelamente ao teste do HET-CAM, realizaram estudos em

voluntários humanos e os resultados obtidos *in vivo* foram similares aos resultados obtidos do ensaio de HET-CAM.

Berthet et al.²⁴ realizam ensaios de permeação *ex vivo* com a mistura de conservantes CMit/Mit em um creme e em solução aquosa. Foram observados alguns sinais de irritação por histologia, especialmente em concentrações mais elevadas (CMit 750 µg/mL e Mit 250 µg/mL), em solução aquosa. CMit/Mit tem sido mais relacionados a processos alérgicos, como agente sensibilizante⁴⁰⁻⁴².

Derouichea e Abdenmour⁸² utilizaram o método HET-CAM para avaliar o potencial de irritação ocular de xampus, visando a utilização desse método em países em desenvolvimento, por ser um ensaio de baixo custo, rápido e alternativo ao uso de animais. Foram avaliados seis xampus, sendo quatro para uso adulto e dois para uso infantil. Foram realizadas diversas diluições com as amostras, para adequação do método. Com os resultados obtidos, foi verificado que todos os xampus (para adultos e de uso infantil) produziram irritação grave ou moderada em concentrações superiores ou iguais a 25% e, quando utilizada uma concentração de 10%, os valores obtidos foram semelhantes. Os autores puderam concluir que o teste HET-CAM foi uma maneira confiável e prática de avaliar o potencial de irritação, mas é necessário realizar mais testes para confirmar as condições de aplicação e os critérios de avaliação do ensaio.

Não foram encontrados estudos que analisaram o potencial de irritação através do método HET-CAM dos conservantes propostos neste trabalho, evidenciando, assim, a importância dos resultados obtidos com esse ensaio. Os produtos cosméticos são de livre acesso e utilizados por milhões de pessoas diariamente, portanto é necessária a avaliação da sua segurança e de suas

respectivas matérias primas, a fim de que os consumidores desses produtos possam usa-los com o menor risco possível de reações indesejadas.

7. Conclusão

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

O fenoxietanol apresentou elevada citotoxicidade nas linhagens celulares analisadas (HaCat IC₅₀: 0,237 mg/mL; HDFa IC₅₀: 0,200 mg/mL; HepG2 IC₅₀: 0,248 mg/mL). No ensaio HET-CAM, foi considerado irritante (PI: 16).

A mistura de fenoxietanol e metilisotiazolinona também apresentou elevada citotoxicidade nas linhagens celulares analisadas (HaCat IC₅₀: 0,156 mg/mL; HDFa IC₅₀: ~0,056 mg/mL; HepG2 IC₅₀: 0,119 mg/mL). No ensaio HET-CAM, foi considerado irritante (PI: 10).

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

Os parabenos, propilparabeno (HaCat IC₅₀: ~0,200 mg/mL; HDFa IC₅₀: >0,200 mg/mL) e metilparabeno (HaCat IC₅₀: >0,400 mg/mL; HDFa IC₅₀: >0,400 mg/mL), também apresentaram resultados satisfatórios nos ensaios de citotoxicidade, exceto na linhagem HepG2, na qual os valores de IC₅₀: 0,039 mg/mL para o propilparabeno e 0,062 mg/mL para o metilparabeno, ficaram dentro da concentração usual 0,02 – 0,1% e 0,05 – 0,25%, respectivamente. No ensaio HET-CAM o propilparabeno foi considerado praticamente não irritante (PI: 0) e o metilparabeno moderadamente irritante (PI: 6).

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

Referências

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- (26) Ma W, Zhao X, Lin ZY, Mohammed MO, Zhang ZF, Liu LY, Song WW, Li YF. A survey of parabens in commercial pharmaceuticals from China and its implications for human exposure. *Environ Int.* 2016 Oct; 95: 30-5.
- (27) Oishi S. Effects of propyl paraben on the male reproductive system. *Food Chem Toxicol.* 2002 Dec; 40(12): 1807-13.
- (28) Soni MG, Carabin IG, Burdock GA. Safety assessment of esters of hydroxybenzoic acid (parabens). *Food Chem Toxicol.* 2005 July; 43(7): 985-1015.
- (29) Darbre PD, Harvey PW. Parabens can enable hallmarks and characteristics of cancer in human breast epithelial cells: a review of the literature with reference to new exposure data and regulatory status. *J Appl Toxicol.* 2014 Sept; 34(9): 925-38.
- (30) Sasseville D, Alfalah M, Lacroix JP. "Parabenoia" Debunked, or "Who's Afraid of Parabens?". *Dermatitis.* 2015 Nov-Dec; 26(6): 254-9.
- (31) Rodas M, Portugal LA, Avivar J, Estela JM, Cerdà V. Parabens determination in cosmetic and personal care products exploiting a multi-syringe chromatographic (MSC) system and chemiluminescent detection. *Talanta.* 2015 Oct; 143: 254–62.
- (32) Tahan GP, Santos NKS, Martins ACAI. Determination of parabens in serum by liquid chromatography tandem mass spectrometry: Correlation with lipstick use. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2016 Aug; 79: 42-48.

- (33) Darbre PD, Harvey PW. Paraben esters: review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks. *J Appl Toxicol*. 2008 July; 28(5): 561-78.
- (34) Darbre PD, Aljarrah A, Miller WR, Goldham NG, Sauer MJ. Concentrations of parabens in human breast tumours. *J Appl Toxicol*. 2004 Jan-Feb; 24(1): 5-13.
- (35) Kodani SD, Overby HB, Morisseau C, Chen J, Zhao L, Hammock BD. Parabens inhibit fatty acid amide hydrolase: A potential role in paraben-enhanced 3T3-L1 adipocyte differentiation. *Toxicol Lett*. 2016 Nov; 262: 92-99.
- (36) Roper CS, Howes D, Blain PG, Williams FM. Percutaneous Penetration of 2-Phenoxyethanol through Rat and Human Skin. *Food Chem Toxicol*. 1997 Oct-Nov; 35(10-11): 1009-16.
- (37) Anselmi C, Ettorre A, Andreassi M, Centini M, Neri P, Di Stefano A. *In vitro* induction of apoptosis vs. necrosis by widely used preservatives: 2-phenoxyethanol, a mixture of isothiazolinones, imidazolidinyl urea and 1,2-pentanediol. *Biochem Pharmacol*. 2002 Feb 1; 63(3): 437-53.
- (38) Lilienblum W. Opinion of the Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS) e final version of the opinion on Phenoxyethanol in cosmetic products. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2016 Dec; 82: 156.

- (39) Scognamiglio J, Jones L, Letizia CS, Api AM. Fragrance material review on 2-phenoxyethanol. *Food Chem Toxicol*. 2012 Sept; 50 Suppl 2: S244-55
- (40) Lundov MD, Zachariae C, Johansen JD. Methylisothiazolinone contact allergy and dose–response relationships. *Contact Dermatitis*. 2011 June; 64(6): 330-6.
- (41) Groot AC, Bruynzeel DP, Bos JD, Van Der Meeren HL, Van Joost T, Jagtman BA, Weyland JW. The Allergens in Cosmetics. *Arch Dermatol*. 1988 Oct; 124(10): 1525-9.
- (42) Laguna C, Cuandra J, Martín-González B, Zaragoza V, Martízes-Casimiro L, Alegre V. Dermatitis alérgica de contacto por cosméticos. *Actas Dermosifiliogr*. 2009; 100(1): 53-60.
- (43) Rogero SO, Lugão AB, Ikeda TI, Cruz AS. Teste *in vitro* de Citotoxicidade: Estudo comparativo entre duas metodologias. *Mat. Res*. 2003 Abr-Jun; 6(3): 317-20.
- (44) Caldeira JP. A proibição de testes em animais para cosméticos na União Europeia. [Internet]. 2013. [acesso em 2017 nov 5]. Disponível em: <https://jornalggn.com.br/noticia/a-proibicao-de-testes-em-animais-para-cosmeticos-na-uniao-europeia>.
- (45) Izar R. Projeto de Lei da Câmara nº 70. [Internet]. 2014. [acesso em 2017 nov 5]. Disponível em: <https://www25.senado.leg.br/web/atividade/materias/-/materia/118217>.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(68) Baumann H, Richards C, Gauldie J. Interaction among hepatocyte-stimulating factors, interleukin 1, and glucocorticoids for regulation of acute phase plasma proteins in human hepatoma (HepG2) cells. *J Immunol.* 1987 Dec 15; 139(12): 4122-8.

- (69) Wilkening S, Stahl F, Bader A. Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2 with regard to their biotransformation properties. *Drug Metab Dispos.* 2003 Aug; 31(8): 1035-42.
- (70) Martins LEAM, Reis VMS. Imunopatologia da dermatite de contato alérgica. *An Bras Dermatol.* 2011 jun; 86(3): 419-33.
- (71) Oishi, S. Effects of butylparaben on the male reproductive system in mice. *Arch Toxicol.* 2002 July; 76(7): 423-9.
- (72) Oishi, S. Effects of butylparaben on the male reproductive system in rats. *Toxicol Ind Health.* 2001 Feb; 17(1): 31-9.
- (73) Oishi, S. Lack of spermatotoxic effects of methyl and ethyl esters of p-hydroxybenzoic acid in rats. *Food Chem Toxicol.* 2004 Nov;42(11):1845-9.
- (74) Janjua NR, Mortensen GK, Andersson AM, Kongshoj B, Skakkebaek NE, Wulf HC. Systemic uptake of diethyl phthalate, dibutyl phthalate and butyl paraben following whole-body topical application and reproductive and thyroid hormone levels in humans. *Environ Sci Technol.* 2007 Aug 1; 41(15): 5564-70.
- (75) Byford JR, Shaw LE, Drew MG, Pope GS, Sauer MJ, Darbre PD. Oestrogenic activity of parabens in MCF7 human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2002 Jan; 80(1):49-60.

- (76) Darbre PD, Byford JR, Shaw LE, Horton RA, Pope GS, Sauer MJ. Oestrogenic activity of isobutylparaben *in vitro* and *in vivo*. J Appl Toxicol. 2002 July-Aug; 22(4): 219-26.
- (77) Darbre PD, Byford JR, Shaw LE, Hall S, Coldham NG, Pope GS, Sauer MJ. Oestrogenic activity of benzylparaben. J Appl Toxicol. 2003 Jan-Feb; 23(1): 43-51.
- (78) Okubo T, Yokoyama Y, Kano K, Kano I. ER-dependent estrogenic activity of parabens assessed by proliferation of human breast cancer MCF-7 cells and expression of ER alpha and PR. Food Chem Toxicol. 2001 Dec; 39(12):1225-32.
- (79) Cazedey ECL., Carvalho FC, Fiorentino FAM, Gremião MPD, Salgado HRN. Corrositex®, BCOP and HET-CAM as alternative methods to animal experimentation. Braz. J. Pharm. Sci. 2009 Oct-Dec; 45(4): 759-66.
- (80) Murillo G, Perez U, Tur E, Vinardell MP, García G, Pascual JR. Estudio comparativo de três variantes Del ensayo de la membrana corioalantoidea Del huevo de La Galina para la evaluación de la irritación ocular. Rev. Toxicol. 2003; 20(3): 187-192.
- (81) Vinardell MP, García L. The quantitative chorioallantoic membrane test using trypan blue stain to predict the eye irritancy of liquid scintillation cocktails. Toxicol *In Vitro*. 2000 Dec; 14(6): 551-5.

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

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

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

(85) Scheel J, Kleber M, Kreutz J, Lehringer E, Mehling A, Reisinger K, Steiling W. Eye irritation potential: usefulness of the HET-CAM under the globally harmonized system of classification and labeling of chemicals (GHS). *Regul Toxicol Pharmacol*. 2011 Apr; 59(3): 471-92.

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

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