



Estudo da segurança de cosméticos: presente e futuro

Bruna Galdorfini Chiari¹; Caroline Magnani¹; Hérica Regina Nunes Salgado¹; Marcos Antonio Corrêa¹;
Vera Lucia Borges Isaac^{1*}

¹Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP - Universidade Estadual Paulista, Departamento de Fármacos e Medicamentos - Laboratório de Cosmetologia LaCos.

²Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP - Universidade Estadual Paulista, Laboratório de Controle Biológico de Qualidade de Fármacos e Medicamentos, Departamento de Fármacos e Medicamentos.

RESUMO

Cosméticos são usados pelo homem desde a antiguidade e, atualmente, o consumo tem aumentado muito, inclusive no Brasil, o terceiro maior mercado no mundo. Assim sendo, a preocupação com a segurança e eficácia destes produtos deve ser intensificada, mesmo sendo produtos raramente relacionados a reações adversas que causem danos à saúde. Para a avaliação das possíveis reações que podem ser apresentadas pelos produtos (irritação, sensibilização, efeitos sistêmicos), a Legislação Brasileira exige que os fabricantes avaliem a segurança e eficácia de seus produtos. Para este fim, em geral, são utilizados animais como modelo experimental o que está sendo cada vez mais evitado, acarretando a pesquisa por métodos alternativos para estas avaliações, que não necessitem de modelos experimentais *in vivo*. Desta forma, a presente revisão tem por objetivo apresentar os principais ensaios biológicos utilizados para avaliação da segurança de cosméticos, bem como ensaios *in vitro* que os substituam.

Palavras-chave: Segurança. Métodos alternativos. *In vitro*. Cosméticos.

INTRODUÇÃO

De acordo com a definição da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA - os cosméticos, produtos de higiene e perfumes são “preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano, como a pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membranas mucosas da cavidade oral, com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência e/ou corrigir odores corporais e/ou protegê-los ou mantê-los em bom estado” (Brasil, 2003).

Até há pouco tempo, os cosméticos não apresentavam riscos ou danos à saúde, ou se os apresentavam, simplesmente não eram considerados. Entretanto, os serviços de atendimento ao consumidor foram sendo criados nas empresas, impulsionando a cosmetovigilância, regulamentada no Brasil pela RDC 332/05 (Brasil, 2005) o que contribuiu com a eliminação de caráter “supérfluo” atribuído ao produto cosmético.

Em 2011, o Brasil foi classificado como o terceiro maior consumidor mundial de produtos cosméticos e, concomitantemente, houve aumento na variedade de matérias primas de diferentes origens e pureza disponíveis no mercado, originando maior possibilidade de aparecimento de reações adversas a algum produto. Portanto, os fabricantes devem garantir ao usuário segurança e eficácia sob as condições de uso orientadas, ou sob condições razoavelmente previsíveis de uso (Brasil, 2005). Assim, ensaios biológicos em cosméticos que garantam a segurança e a eficácia do produto, tem se tornado cada vez mais importantes, em virtude do aumento do consumo, principalmente no Brasil.

Importância dos ensaios biológicos

Da mesma forma que ocorre com outros produtos que promovem a saúde e o bem estar do consumidor, produtos cosméticos podem, ocasionalmente, apresentar reações adversas aos usuários, decorrentes de fatores individuais ou uso inadequado do produto (Rogiers et al., 1999; Santos, 2008). Sendo assim, os ensaios biológicos para avaliação de segurança devem preceder a disponibilidade do cosmético ao mercado (Brasil, 2003).

Os ensaios de toxicidade sempre foram realizados em animais, o melhor modelo experimental para avaliação dos riscos potenciais envolvidos com o uso destes produtos, seja irritação, alergia ou efeitos sistêmicos; todavia, atualmente, ensaios alternativos *in vitro* estão sendo adotados (Santos, 2008).

Outro fator importante a ser considerado é a utilização de extratos vegetais em produtos cosméticos, que tem se mostrado como tendência mundial que cresceu substancialmente nos últimos anos (Souza et al., 2005; Iha et al., 2008). No entanto, há ainda poucos relatos na literatura em relação à atividade mutagênica ou fototóxica

Autor correspondente: Vera Lucia Borges Isaac - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP - Univ Estadual Paulista - Departamento de Fármacos e Medicamentos - Laboratório de Cosmetologia - LaCos - Rod. Araraquara-Jaú, km-1 - CEP.14801-902 - Araraquara - SP - Brasil - e-mail: veraisaac@fcfar.unesp.br - tel: 55-16-3301-6979 - fax: 55-16-3322-0073

de extratos vegetais (Ramos et al., 2005). Isso evidencia a necessidade de ensaios de segurança destes produtos.

Considerando que o uso de cosméticos pode apresentar riscos ao consumidor e, dadas às dificuldades para estabelecer conceitos relativos a uma condição razoavelmente previsível de uso, segundo o Guia para avaliação da segurança de produtos cosméticos elaborado pela ANVISA (Brasil, 2003), o responsável por um produto cosmético deve empregar recursos técnicos e científicos suficientemente capazes de reduzir possíveis danos aos usuários, ou seja:

- a) formular o produto com ingredientes referenciados que sejam os mais seguros possíveis;
- b) especificar uma margem de segurança entre o nível de risco e o nível de uso do produto;
- c) informar ao consumidor, da maneira mais clara possível, facilitando o uso correto do produto;
- d) seguir as Boas Práticas de Fabricação e Controle (Brasil, 2003).

Em relação ao uso de cosméticos, alguns tipos de reações que podem ser observadas são:

•**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 mecanismos 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 (Brasil, 2003).

De maneira geral, os efeitos observados com o uso do produto acabado são devido aos seus componentes; sendo assim, o conhecimento das propriedades das matérias primas direciona o formulador ao perfil toxicológico do produto acabado, desde que respeitada a sua forma cosmética e, especialmente, a associação de ingredientes (Brasil, 2003).

Desta maneira, existem dados básicos úteis para quaisquer ingredientes cosméticos, tais como: estudos sobre a absorção cutânea, efeito sistêmico, potencial alergênico, potencial irritativo da pele, da mucosa ou dos olhos.

Substituição dos ensaios biológicos

O desenvolvimento de métodos alternativos de avaliação de produtos destinados à saúde tem sido objeto de estudos do meio científico, que está se conscientizando sobre a necessidade de utilização da política dos 3 Rs (*replace, reduce, refine*) introduzida por Russel & Burch (1959), a qual trata da substituição, redução e refinamento dos ensaios com utilização de animais buscando, assim, quando possível, a substituição de métodos de avaliação em animais por modelos *in vitro* ou, no mínimo, a utilização dos modelos animais de forma mais responsável, o que significa usar o menor número de animais possível e, ainda, quando pertinente, utilizar o mesmo animal para diferentes ensaios (Gad, 1990; Marona et al., 2003; Marona et al., 2004).

A necessidade de mudanças torna obrigatório que as metodologias alternativas criadas sejam comprovadas e, mesmo que, ainda, sejam incipientes na comunidade científica, isto representa uma preocupação de diversos grupos de pesquisa (Ponec, 1992; Augustin et al., 1997; Augustin et al., 1998; Balls et al., 1999; Barlow et al., 2001; Worth et al., 2002).

A validação de métodos alternativos vem sendo sugerida, por exemplo, pelo *European Center for the Validation of Alternative Methods* - ECVAM (Europa), fundado pelo Parlamento Europeu conforme a Diretiva 86/609/EEC, que diz respeito à proteção dos animais de laboratório; *The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods* - ICCVAM (USA); *Japanese Society of Alternatives to Animal Experiments* - JSAAE (Japão); *Canadian Council on Animal Care* - CCAC; *Korean Center for the Validation of Alternative Methods* - KoCVAM e o *International Corporation on Alternative Test Methods* - ICATM (que reúne organizações de diversos países com o mesmo objetivo) (Rogiers et al., 1999; Martinez-Hidalgo, 2007; ICCVAM; FDA, 2008).

Como mostra o Regulamento (CE) nº 1223/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho de 30 de novembro de 2009, relacionados aos produtos cosméticos, foram banidos os ensaios de toxicidade *in vivo* para ingredientes cosméticos a partir do ano de 2009, sendo que determinados ensaios, como para avaliação de dose tóxica (*Repeated Dose Toxicity* - RDT), serão banidos a partir de março de 2013. Esta medida adotada pela União Européia representa a tendência mundial (Pauwels & Rogiers, 2007; Adler et al., 2011).

Entre alguns métodos alternativos que já se encontram validados e são descritos por órgãos regulatórios, como a ANVISA, a COLIPA (*The European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association*) e a OECD (*Organization for Economic Co-operation and Development*), estão: o teste de fototoxicidade (*In vitro* 3T3 NRU *phototoxicity test*) (Spielmann et al., 1998; OECD, 432), e os ensaios para a avaliação do potencial de corrosividade da pele utilizando pele humana reconstituída, como o EPISKIN™ (Liebsch et al., 2002). Ambos de grande importância no setor cosmético para a garantia da segurança do usuário, uma vez que produtos fototóxicos ou corrosivos poderiam acarretar danos graves, reversíveis ou não, ao consumidor.

A fototoxicidade, segundo a OECD, é definida como uma resposta tóxica obtida a partir de uma substância aplicada no corpo ou administrada por via sistêmica após exposição à luz ou irradiação da pele (OECD, 432). A corrosão da pele é a produção de um dano irreversível ao tecido cutâneo devido à aplicação de determinada substância (OECD, 431).

De maneira simplificada, o ensaio de fototoxicidade consiste em avaliar a viabilidade de células tratadas com determinada substância ativa ou fármaco na presença e na ausência de luz (OECD, 432).

Ensaio biológicos aplicados a cosméticos

Avaliação do potencial de irritação ocular

O ensaio biológico para avaliação do potencial de irritação ocular é baseado no estudo de Draize et al. (1944).

São utilizados coelhos albinos, da raça Nova Zelândia, com peso corpóreo de 2 a 2,5 kg. O material a ser testado (0,1 ml) é aplicado no olho direito do coelho e o olho esquerdo é mantido como controle. Após a aplicação, as pálpebras são mantidas unidas por 30 segundos sendo o olho do animal massageado para permitir o contato com o produto (Staub et al., 2007).

Após 24, 48, 72 horas e, ao final do sétimo dia após aplicação, as reações oculares observadas devem ser classificadas com base na escala de Draize et al. (1944). Os efeitos da aplicação do produto devem ser verificados na região da córnea, como opacidade e área envolvida, na região da íris, irite, e na região da conjuntiva, como hiperemia (superabundância de sangue), quemose (edema) e secreção (Staub et al., 2007).

O ensaio de Draize para a irritação ocular é globalmente aceito como um método regulatório para testar o potencial de irritação ocular de diversos produtos químicos, incluindo os farmacêuticos e os cosméticos (Matsuda et al., 2009). Entretanto, o teste de Draize tem sido motivo de críticas crescentes no que diz respeito ao bem estar animal, mas apesar dos esforços em substituí-lo por alternativas *in vitro*, nenhum teste foi, ainda, aceito individualmente para esta finalidade (Staub et al., 2007). Como já mencionado, devido às mudanças regulatórias estabelecidas na Europa no *Regulamento CE 1223/2009*, há necessidade de validação científica dos métodos *in vitro*.

Na pesquisa de Staub et al. (2007), os resultados dos ensaios de citotoxicidade *in vivo* e *in vitro*, que avaliaram a toxicidade do xampu de cetoconazol, não apresentaram os mesmos resultados mostrando, por este estudo, que os testes de irritação *in vitro* ainda não são capazes de substituir completamente o ensaio *in vivo*, necessitando de estudos para sua validação.

Avaliação da atividade fototóxica

Um grupo de quatro cobaias albinas, Dunkin-Hartley (Buehler et al., 1985) de 300 a 450 gramas é utilizado para cada amostra de produto teste. O animal deve ter seu pelo raspado, com auxílio de um tosador e, em seguida, deve ser depilado. Após 18 a 20 h, quando a pele do dorso dos animais estiver visivelmente íntegra, sem sinais de irritação, deve ser dividida com uma fita adesiva em quatro áreas de cerca de 2,5 cm². Em duas destas áreas, devem ser aplicados 0,1 ml de amostra a ser testada e nas outras duas áreas 0,1 ml de solução 0,1% de 8-metoxipsoraleno (8-MOP) (controle positivo). Uma das áreas contendo a amostra e 8-MOP deve ser coberta com uma folha de alumínio e envolvida com fita adesiva. A cabeça dos animais deve ser coberta para que possam ser 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 avaliada segundo a escala: 0 = nenhuma reação, 1 = eritema fraco, 2 = eritema moderado e 3 = eritema severo (Ramos et al., 2005).

Avaliação do potencial de irritação cutânea

A avaliação da irritação dérmica *in vivo* pode ser efetuada de acordo com o Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos (Brasil, 2003). O produto a ser testado deve ser aplicado em dose única no dorso depilado

de coelhos 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 devem ser avaliadas seguindo a escala de Draize.

Também pode ser verificada a irritação cumulativa, sendo o produto aplicado nos animais por um período de 10 dias consecutivos e as avaliações feitas 24 e 72 horas após a última aplicação (Brasil, 2003).

Avaliação da absorção cutânea

O estudo da absorção cutânea *in vivo* pode ser desenvolvido de acordo com metodologia descrita pela OECD, 427 (2004). O método *in vivo* apresenta a vantagem de ser realizado com diversas espécies de animais de experimentação, utilizando, portanto, um modelo fisiológica e metabolicamente intacto. Por outro lado, é desvantajoso, por necessitar de animais vivos e marcação radioativa para o seu desenvolvimento (OECD, 427). Também, é sabido que a pele de animais como os ratos não apresentam o mesmo perfil de absorção que a pele humana (OECD, 427).

Para a realização do ensaio, a substância em análise, comumente contida em uma formulação e marcada radioativamente, deve ser aplicada na pele depilada dos animais. A substância deve ser mantida em contato com a pele dos animais por um determinado período, 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 ativa (OECD, 427).

Ensaios biológicos substituídos por ensaios *in vitro* para a avaliação de cosméticos

Avaliação do potencial de irritação ocular

Um conjunto de ensaios *in vitro* é sugerido pela ANVISA e pode ser utilizado para fornecer informações a respeito da segurança do produto em nível ocular. Dentre eles: *Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane* (HET-CAM), *Bovine Corneal Opacity and Permeability* (BCOP), Citotoxicidade pela difusão em gel de agarose, Citotoxicidade pelo método do Vermelho Neutro, Citotoxicidade pelo método do MTT e *Red Blood Cell* (RBC). Como há mais de um mecanismo de irritação ocular, apenas um ensaio *in vitro* não é suficiente para completa avaliação, sendo necessária a aplicação dos diferentes ensaios em conjunto, que avaliem a vascularização (HET-CAM), a opacidade/permeabilização (BCOP) e a citotoxicidade (MTT, RBC) (Brasil, 2003).

Muitas pesquisas (Balls et al., 1995; Brantom et al., 1997; Hartung et al., 2010) têm sido desenvolvidas buscando uma alternativa ao teste de Draize, sendo verificado que reações citotóxicas em células de córnea seria a melhor fonte para avaliar a irritação ocular (Balls et al., 1995; Spielmann et al., 1996). Uma correlação foi observada entre os resultados *in vitro* e o teste de Draize e, então, o método empregando células epiteliais de córnea de coelhos normais foi descrito como apresentando sensibilidade similar e correlação com o teste de Draize. As células epiteliais de córnea de coelhos normais podem ser empregadas por

manterem próximo o nível de bio substâncias e atividade farmacológica, como observado *in vivo* (Matsuda et al., 2009). Segundo Matsuda et al. (2009), a validação total deste teste proposto para substituir completamente o teste de Draize ainda não ocorreu devido à falta de entendimento dos mecanismos fisiológicos da irritação ocular.

Matsuda e colaboradores (2009) desenvolveram o modelo epitelial de córnea de coelho (*Rabbit Corneal Epithelial* - RCE) para avaliar o potencial de irritação *in vitro* de produtos químicos, incluindo produtos farmacêuticos, cosméticos e suas matérias primas. Neste modelo, uma cultura estratificada de células epiteliais da córnea de coelhos é cultivada na interface ar-líquido de um âmnion (camada mais interna da placenta), agindo como uma membrana parabasal. A condição alcalina é restaurada a cada dia na presença de não irritantes; no entanto, quando é adicionado lauril sulfato de sódio, irritante potencial, o déficit de restauração da condição alcalina é inibido de forma dose-dependente. Os resultados deste teste são comparáveis com os resultados do teste de Draize e, então, este método validado é sugerido como ferramenta útil e sensível para a avaliação da irritação ocular *in vitro* (Matsuda et al., 2009).

A utilização da membrana amniótica por Matsuda et al. (2009) é fundamentada em trabalhos anteriores, que demonstram o sucesso na aplicação do âmnion, obtido de placentas de cesáreas, em oftalmologia, e para o tratamento de afecções da superfície ocular (Tseng, 2001; Dua et al., 2004; Melo et al., 2007).

Avaliação da atividade fototóxica

A avaliação da fototoxicidade, por meio de ensaio microbiológico, é baseada no procedimento descrito por Daniels (1965), que é útil na identificação de produtos que podem causar toxicidade quando aplicados sobre a pele, que é exposta à luz solar. É um ensaio simples, similar àquele empregado para avaliar a sensibilidade de microorganismos a agentes antimicrobianos (Ramos et al., 2005).

São utilizadas cepas selvagens de *Saccharomyces cerevisiae* (D273-10B) e *Candida albicans* (ATCC 10231). Alíquotas da suspensão destes microorganismos são transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura. Amostras do produto a ser avaliado são aplicadas em filtros de papel estéreis, com 6 mm de diâmetro e fixados na superfície das placas. As placas teste devem ser colocadas a 22 cm de uma fonte de luz UV de 15 Watts de potência, de comprimento de onda de 300-390 nm (UVA) com dose de radiação de 10,36 kJ m⁻². As placas controle devem ser mantidas no escuro (Ramos et al., 2005). A zona clara em torno da substância, presente sob iluminação, mas ausente no escuro, fornece a evidência de fotossensibilização (Daniels, 1965).

A pesquisa desenvolvida por Ramos et al. (2005) visou avaliar se o ensaio *in vivo*, para avaliação da fototoxicidade, pode ser substituído pela metodologia *in vitro*. Os resultados obtidos, tanto nos ensaios microbiológicos como nos ensaios *in vivo*, demonstraram a ausência de atividade fototóxica para os produtos em análise, nas concentrações avaliadas. Segundo os autores, estes dados indicam que a metodologia *in vitro* empregada representa uma alternativa a ser utilizada na pré-avaliação de fototoxicidade de produtos cosméticos e farmacêuticos

e/ou matérias primas, sem a necessidade de emprego de animais.

Avaliação do potencial de irritação cutânea

Outro ensaio *in vitro*, que pode ser aplicado para a determinação do potencial de irritação cutânea, é baseado na desnaturação da albumina do ovo. Blohm (1957) estudou a desnaturação da ovalbumina verificando semelhança na solubilidade desta proteína quando comparada à solubilidade das proteínas encontradas na epiderme. Baseado neste ensaio simples, Lorca et al. (2008) avaliaram o efeito de tensoativos sobre a pele. Prepararam soluções a 5% de surfactantes derivados de aminoácidos (Amisoft CS-11R, Amisoft LS-11R, Amisoft MS-11R e Amilite GCS-11R) e de lauril sulfato de sódio. Posteriormente, foram adicionados 10 gramas de claras de ovos, previamente homogeneizadas em agitador magnético por 5 minutos, a 2,5 gramas de solução de cada um dos tensoativos. A mistura formada (ovalbumina + tensoativo) permaneceu sob agitação por 2 minutos e, em seguida, foi realizada leitura da transmitância a 660 nm em espectrofotômetro UV-Vis (BiospectroR SP-220). A solução controle empregada foi clara de ovo e água destilada, nas mesmas proporções das amostras testes (Lorca et al., 2008).

O teste *in vitro* permitiu avaliar quais são os tensoativos que não causam desnaturação de proteínas. Desta forma, aqueles que apresentaram valores maiores de transmitância, caracterizados pela não ocorrência de turvação, são os menos irritantes. Este dado foi confirmado pela avaliação do teste de irritação cutânea *in vivo*, demonstrando a aplicabilidade do teste *in vitro*, devido à semelhança de solubilidade das proteínas contidas na clara do ovo com a queratina da pele (Lorca et al., 2008).

Avaliação da absorção cutânea

O ensaio de absorção cutânea que pode ser realizado *in vitro* utiliza membranas biológicas ou sintéticas, assim como descrito pela OECD 428, em substituição ao uso de animais de laboratório. Este método mede a difusão de substâncias químicas, através de uma membrana, coletadas em um sistema reservatório (OECD, 428). Atualmente, o ensaio de permeação *in vitro* tem sido realizado utilizando células de Franz modificadas.

Técnicas *in vitro* utilizadas atualmente

Avaliação do potencial de citotoxicidade

Uma técnica comumente utilizada para avaliação da citotoxicidade é o ensaio do MTT, baseado na redução do sal tetrazólio, solúvel no meio em que as células são cultivadas, de coloração amarela (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-thiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio) ao cristal de formazana, insolúvel neste meio de cultura, de coloração azul, produzido pela enzima succinato desidrogenase das mitocôndrias. Para o desenvolvimento do método podem ser usados fibroblastos primários da derme humana ou outras linhagens celulares como, por exemplo queratinócitos, de acordo com a finalidade do estudo. Esta cultura deve ser tratada com a substância em análise e, após o período de tratamento, deve ser adicionada

uma solução de MTT, às células cultivadas em microplacas. Após incubação, o sobrenadante deve ser removido e a cada poço da microplaca deve ser adicionado dimetilsulfóxido (DMSO) ou álcool isopropílico para solubilizar os cristais de formazana. Poços sem tratamento, contendo apenas meio de cultura, são utilizados como branco e a leitura da absorbância deve ser realizada espectrofotometricamente, a 570 nm (Son et al., 2007).

Outro teste de citotoxicidade foi realizado por Iha e colaboradores (2008), utilizando diluições de amostras de extratos vegetais, macrófagos e o corante de oxido-redução Alamar Blue, em substituição ao MTT. Após a adição do corante nas células tratadas, foi realizada análise visual da mudança na cor do corante, onde a cor azul oxidada representa morte celular e o corante na cor rosa representa células viáveis.

Avaliação da atividade mutagênica

A mutagenicidade pode ser avaliada utilizando como base a metodologia de Maron & Ames (1983), como descrito por Ramos et al. (2005). São utilizadas as cepas TA97, TA98, TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium* (*spot test*), sem sistema de metabolização. Como controle positivo, pode ser empregada a 4-nitroquinolina. As células são inoculadas em meio LB (Miller, 1972) e incubadas a 37° C *overnight* para crescimento. Alíquotas de 100 µl de uma suspensão de 10⁹ células devem ser espalhadas em placas contendo meio E (Vogel & Boner, 1956), solidificado com 1,5% de ágar. Em seguida, alíquotas de 10 µl de cada amostra devem ser aplicadas em discos de papel estéreis, de 6 mm de diâmetro, que são fixados na superfície das placas. Após incubação a 37° C por 48 horas, colônias visíveis devem ser contadas (Ramos et al., 2005). As colônias são formadas pois, na presença de agentes mutagênicos, as linhagens utilizadas revertem o caráter de auxotrofia para síntese de histidina, ocorrendo formação de colônias em meio desprovido deste aminoácido (Zeiger, 2001; Varella et al., 2004).

Este ensaio de mutagenicidade, conhecido como teste de Ames, é mundialmente aceito como padrão para identificação de substâncias que podem produzir danos que gerem mutações gênicas. É empregado como um *screening* inicial para determinação do potencial mutagênico, permitindo a utilização de forma consciente de animais (Ramos et al., 2005). A utilização do teste de Ames vai de encontro ao conceito dos 3R's, uma vez que os resultados permitem avaliar o potencial mutagênico *in vivo*, como confirmação de um resultado promissor obtido *in vitro*; isto é, para substâncias não-mutagênicas, de acordo com a metodologia descrita por Maron & Ames (1983).

Células humanas, HepG2 (células de hepatoma humano), podem ser usadas como um método alternativo. Dauer et al. (2003) utilizando este modelo, mostrou que a catequina e os taninos do *Hamamelis virginiana* L. exibem um efeito protetor e sugeriu um efeito antimutagênico dos taninos.

Nosso grupo de pesquisa iniciou estudos propondo o uso de metodologias alternativas aos testes com animais. Essas pesquisas são baseadas em ensaios com culturas em monocamada de queratinócitos (HaCat), células de hepatoma humano (HepG2), fibroblastos de derme humana (HDFa) e melanócitos de epiderme humana (HEMa)

para determinação de citotoxicidade de ativos cosméticos orgânicos, sintéticos e de origem vegetal, que resultou em dissertações e artigos. O uso da linhagem de hepatoma humano (HepG2) foi proposto com embasamento no trabalho de Vinken et al. (2012), que demonstra que o fígado é o principal órgão atingido por cosméticos administrados oralmente em animais de experimentação (Chiari, 2012).

Paralelamente ao emprego das culturas em monocamada, também está sendo proposta a validação de metodologia para a utilização de culturas organotípicas para o estudo da eficácia e segurança de cosméticos. A implantação do uso de culturas celulares em um laboratório é um trabalho árduo, porém, tem sido considerado, por nosso grupo, como extremamente necessário, tendo em vista a tendência em substituir o uso de animais por metodologias alternativas.

Uso de pele artificial para ensaios *in vitro* em cosméticos

A pele de murinos tem sido, rotineiramente, utilizada em testes de comprovação de eficácia e segurança de produtos cosméticos, porém, as diferenças entre a arquitetura da pele humana e a de ratos limitam essa abordagem (Paulitschke et al., 2010; Youssef et al., 2010). O primeiro fator a ser considerado é que a pele de ratos é completamente coberta de pelos, ao contrário da humana, que possui folículos pilosos dispersamente distribuídos. Além disso, a derme de roedores adultos é fina e a epiderme compreende apenas 3 camadas, em oposição à humana, na qual a derme é espessa e a epiderme possui de 6 a 10 camadas. Outro ponto a ser observado é que os melanócitos da pele humana residem na camada basal da epiderme, enquanto em ratos estão localizados preferencialmente em folículos pilosos (Donahue et al., 1999).

A resposta e a funcionalidade da pele humana são muito diferentes da murina, por exemplo, ferimentos na pele de ratos causam efetiva regeneração dos tecidos, enquanto na humana provoca formação de cicatrizes e queloides (Khorshid, 2005). Além disso, a pele de ratos possui menor barreira à água e oferece maior absorção percutânea (Menon, 2002).

Peles reconstruídas têm sido atualmente propostas como uma alternativa aos métodos que utilizam animais para testar irritação, genotoxicidade e fototoxicidade a vários reagentes (Hu et al., 2009). Este tipo de pele equivalente oferece várias vantagens, quando comparada com culturas em monocamada de queratinócitos, uma vez que tem a habilidade de testar componentes com baixa solubilidade em água e, também, porque as concentrações que induzem irritação, na cultura em monocamada de queratinócitos, são muito diferentes das concentrações que induzem resposta *in vivo*, tornando difícil correlacionar resultados obtidos em cultura de células em monocamada com a situação *in vivo* (Macneil, 2007; Welss et al., 2004).

Os modelos de peles equivalentes aparecem como uma alternativa aos testes *in vivo* e, por esse motivo, muitos modelos de pele humana têm sido desenvolvidos *in vitro* e muitos tem sido disponibilizados comercialmente como Epiderme™ (MatTek, Ashland, MA, USA) e Episkin™ (antes produzida pela Episkin, Chaponost, France e agora por L'Oréal, SkinEthic, Nice, France) (Ponec, 1992; Welss et al., 2004). Além de fornecerem informações relevantes

em experimentação científica, as aplicações clínicas dessas peles são muitas, incluindo o reparo de ferimentos e queimaduras (Boyce & Warden, 2002).

Essa é uma alternativa que está de acordo com a tendência a ser adotada mundialmente, buscando a substituição ou redução do uso de animais por modelos *in vitro*, evitando, assim, a dor e o desconforto de animais experimentais, sem perder o compromisso com a segurança humana e com a proteção ambiental (Wells et al., 2004).

CONCLUSÃO

Os ensaios biológicos ainda são essenciais na avaliação da segurança de produtos cosméticos, usados de forma contínua e prolongada pelos consumidores, uma vez que novos cosméticos e produtos de higiene pessoal são lançados todos os anos no mercado. Por esse motivo e, devido à necessidade de substituição do uso de animais, como exposto neste artigo, é possível concluir que a comunidade científica pode contribuir com a validação de métodos alternativos cuja viabilidade já esteja comprovada.

ABSTRACT

Study of the safety of cosmetics: present and future

Cosmetics have been used since ancient times and, recently, their consumption has increased greatly in many countries, including Brazil, which is the third largest consumer market in the world. Thus, concern for the safety and efficacy of these products should be heightened, even though these products are rarely related to adverse reactions that damage the health. Brazilian law requires manufacturers to subject their products to safety testing, to assess the possible reactions that could be caused by them (irritation, sensitization, systemic effects). To this end, in general, animals have been used as the experimental model, but this practice is being increasingly controlled, so that the scientific community is looking for alternative tests that do not require experimental *in vivo* models. Thus, this review aims to describe the main biological assays used to assess the safety of cosmetics, as well as *in vitro* assays that can replace them.

Keywords: Safety. Alternative methods. *In vitro*. Cosmetics.

REFERÊNCIAS

Adler S, Basketter D, Creton S, Pelkonen O, van Benthem J, Zuang V, Andersen KE, Angers-Loustau A, Aptula A, Bal-Price A. Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects – 2010. *Arch Toxicol*. 2011;85(5): 367-485.

Augustin C, Collombel C, Damour O. Use of dermal equivalent and skin equivalent models for *in vitro* cutaneous irritation testing of cosmetic products: comparison with *in vivo* human data. *Cutan Ocul Toxicol*. 1998;17(1):5-17.

Augustin C, Collombel C, Damour O. Use of *in vitro* dermal equivalent and skin equivalent kits for evaluating cutaneous toxicity of cosmetic products. *Toxicol In Vitro*. 1997;10(1):23-31.

Balls M, Botham PA, Bruner LH, Spielmann H. The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicol In Vitro*. 1995;9(6):871-929.

Balls M, Fentem JH. The validation and acceptance of alternatives to animal testing. *Toxicol In Vitro*. 1999;13(4-5):837-46.

Barlow BD, Marshall L, Mcpherson J. Patch testing vs *in vitro* alternatives. *Cosmet Toilet*. 2001;116(5) 51-5.

Blohm SG. The connection between skin-irritating and protein-denaturing effects of some surface-active agents. *Acta Dermatol Venereol*. 1957;37(4):269-75.

Boyce ST, Warden GD. Principles and practices for treatment of cutaneous wounds with cultures skin substitutes. *Am J Surg*. 2002;183:445-56.

Brantom PG, Bruner LH, Chamberlain M, De Silva O, Dupuis J, Earl LK, Lovell DP, Pape WJW, Uttley M, Bagley DM, Baker FW, Bracher M, Courtellemont P, Declercq L, Freeman S, Steiling W, Walker AP, Carr GJ, Dami N, Thomas G, Harbell J, Jones PA, Pfannenbecker U, Southee JA, Tchong M, Argembeaux H, Castelli D, Clothier R, Esdaile DJ, Itigaki H, Jung K, Kasai Y, Kojima H, Kristen U, Larnicol M, Lewis RW, Marenus K, Moreno O, Peterson A, Rasmussen ES, Robles C, Stern M. A summary report of the COLIPA international validation study on alternatives to the draize rabbit eye irritation test. *Toxicol In Vitro*. 1997;11(1-2):141-79.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Guia para avaliação da segurança de produtos cosméticos, 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/guia/index.htm>

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 332/05, de 1 de dezembro de 2005.

Buehler EV, Newmann EA, Parker R. Use of the occlusive patch to evaluate the photosensitive properties of chemicals in guinea pigs. *Food Chem Toxicol*. 1985;23(7):689-94.

Chiari BG, Martini PC, Moraes JDD, Andréo R, Corrêa MA, Cicarelli RMB, Isaac VLB. Use of HEPG2 cells to assay the safety of cosmetic active substances. *Int J Res Cosmet Sci*. 2012;2(2):8-14.

Daniels FJR. A simple microbiological method for demonstrating phototoxic compounds. *J Invest Dermatol*. 1965;44:259-63.

Dauer A, Hensel A, Lhoste E, Knasmüller S, Mersch-Sundermann V. Genotoxic and antigenotoxic effects of catechin and tannins from bark of *Hamamelis virginiana* L. in metabolically competent, human hepatoma cells (HepG2) using single cell gel electrophoresis. *Phytochemistry*. 2003;63(2):199-207.

- Donahue BA, McArthur JG, Spratt SK. Selective uptake and sustained expression of AAV vectors following subcutaneous delivery. *J Gen Med.* 1999;1(1):31-42.
- Draize JH, Woodard 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.
- Dua HS, Gomes JAP, King AJ, Maharajan VS. The Amniotic Membrane in Ophthalmology. *Survey Ophthalmol.* 2004;49(1):51-77.
- FDA. 2008. Disponível em: <http://www.fda.gov/InternationalPrograms/HarmonizationInitiatives/ucm114518.htm>
- Gad CS. Recent developments in replacing, reducing, and refining animal use in toxicologic research and testing. *Fundam Appl Toxicol.* 1990;15(1):8-16.
- Hartung T, Bruner L, Curren R, Eskes C, Goldberg A, McNamee P, Scott L, Zuang V. First alternative method validated by a retrospective weight-of-evidence approach to replace the draize eye test for the identification of non-irritant substances for a defined applicability domain. *Altex.* 2010;27(1):43-51.
- Hu T, Kaluzhny Y, Mun GC, Barnett B, Karetsky V, Wilt N, Klausner M, Curren RD, Aardema MJ. Intralaboratory and interlaboratory evaluation of the epiderm 3D human reconstructed skin micronucleus (RSMN) assay. *Mutat Res.* 2009;673(2):100-8.
- ICCVAM. Disponível em: <http://iccvam.niehs.nih.gov/about/icatm.htm>
- Iha SM, Migliato KF, Velloso JCR, Sacramento LVS, Pietro RCLR, Isaac VLB, Brunetti IL, Corrêa MA, Salgado HRN. Estudo fitoquímico de goiaba (*Psidium guajava* L.) com potencial antioxidante para o desenvolvimento de formulação fitocosmética. *Rev Bras Farmacogn.* 2008;18(3):387-93.
- Khorshid FA. Comparative study of keloid formation in humans and laboratory animals. *Med Sci Monit.* 2005;11(7):212-9.
- Liebsch M, Spielmann H. Currently available *in vitro* methods used in the regulatory toxicology. *Toxicol Lett.* 2002;127(1-3):127-34.
- Lorca BSS, Volpato NM, Fonseca LB, Santos E. Análise “*in vitro*” e “*in vivo*” do potencial irritante de tensoativos derivados de aminoácidos. *Rev Anal. Dez.2007/Jan.2008*;32:80-3.
- Maron DM, Ames BN. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res.* 1983;113(3-4):173-215.
- Marona HRN, Lucchesi MBB. Protocol to refine intestinal motility test in mice. *Lab Anim.* 2004;38:257-60.
- 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.
- Martínez-Hidalgo MPV. Alternativas a la experimentación animal en toxicología: situación actual. *Acta Bioeth.* 2007;13(1):41-52.
- Macneil S. Progress and opportunities for tissue-engineered skin. *Nature.* 2007;445(7130):874-80.
- Matsuda S, Hisama M, Shibayama H, Itou N, Iwaki M. *In vitro* eye irritancy test of polyoxyethylene alkyl derivatives using a reconstructed rabbit corneal epithelium model. *Biol Pharm Bull.* 2009;32(5):807-12.
- Melo GB, Gomes JAP, Glória MA, Martins MC, Haapalainen EF. Avaliação morfológica de diferentes técnicas de desepitelização da membrana amniótica humana. *Arq Bras Oftalmol.* 2007;70(3):407-11.
- Menon GK. New insights into skin structure: scratching the surface. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002;54(1):3-7.
- Miller JH. Experiments in molecular genetics. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1972.
- OECD 427. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Skin absorption: *in vivo* method. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/fulltext/9742701e.pdf?expires=1337711861&id=id&acname=freeContent&checksum=250470A8BA2462F89790EFD8E0DCA68B>
- OECD 428. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Skin absorption: *in vitro* method. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/fulltext/9742801e.pdf?expires=1337880583&id=id&acname=freeContent&checksum=895A9D39E8F0D4B50E00B9E356732FE2>
- OECD 431. OECD Guideline for Testing of Chemicals. *In Vitro* skin corrosion: Human Skin Model test. Disponível em: http://www.mattek.com/pages/fileadmin/user_upload/files/OECD_TG-431-Corrosion-EpiDerm_1_.pdf
- OECD 432. OECD Guideline for Testing of Chemicals. *In Vitro* 3T3 NRU phototoxicity test. Disponível em: <http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECDtg432.pdf>
- Paulitsche V, Schicher N, Szekeres T. 3,3',4,4',5,5'-Hexahydroxystilbene impairs melanoma progression in a metastatic mouse model. *J Invest Dermatol.* 2010;130(6):1668-79.
- Pauwels M, Rogiers V. EU legislations affecting safety data availability of cosmetic ingredients. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2007;49(3):308-15.
- Ponoc M. *In vitro* cultured human skin cells as alternatives to animals for skin irritancy screening. *Int J Cosmet Sci.* 1992;14(6):245-64.
- Ramos MFS, Santos EP, Silva AB, Leitão AC, Dellamora-Ortiz GM. Avaliação fototóxica e *screening* mutagênico de extratos de própolis, *Aloe* spp. e *Hamamelis virginiana*. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.* 2005;26(2):105-11.
- Rogiers V, Balls M, Basketter D, Berardesca E, Edwards C, Elsner P, Ennen J, Lévêque J, Lóden M, Masson P, Parra J, Paye M, Piérard G, Rodrigues L, Schaefer H, Salter D, Zuang V. The potential use of non-invasive methods in

- the safety assessment of cosmetic products - The report and recommendations of an ECVAM/EEMCO Workshop (ECVAM Workshop 36). ATLA. 1999;27:515-537.
- Russel WMS, Burch RC. The principles of human experimental technique. London: Methuen; 1959.
- Santos H. Toxicologia: a garantia de cosméticos seguros. Cosmet Toilet. 2008;20(2):20-4.
- Son ED, Choi GH, Kim H, Lee B, Chang IS, Hwang JS. Alpha-ketoglutarate stimulates procollagen production in cultured human dermal fibroblasts, and decreases UVB-induced wrinkle formation following topical application on the dorsal skin of hairless mice. Biol Pharm Bull. 2007;30(8):1395-9.
- Souza TM; Santos LE; Moreira RRD; Isaac, VLB. Avaliação da atividade fotoprotetora de *Achillea millefolium* L. (Asteraceae). Rev Bras Farmacogn. 2005;15(1):36-8.
- Spielmann H, Balls M, Dupuis J, Pape WJ, Pechovitch G, De Silva O, Holzhütter HG, Clothier R, Desolle P, Gerberick F, Liebsch M, Lovell WW, Maurer T, Pfannenbecker U, Potthast JM, Csato M, Sladowski D, Steiling W, Brantom P. The international EU/COLIPA *in vitro* phototoxicity validation study: results of phase II (blind trial). Part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test. Toxicol In Vitro. 1998;13(3):305-27.
- Spielmann H, Liebsch M, Kalweit S, Moldenhauer F, Wrinsberger T, Holzhütter HG, Schneider B, Glaser S, Gerner I, Pape WJW, Kreiling R, Krauser K, Miltenburger HG, Steiling W, Luepke NP, Meuler N, Kreuzer H, Meurmann P, Spengler J, Bertram-Neis E, Siegemund B, Wiebel FJ. Results of a validation study in Germany on two *in vitro* alternatives to the Draize eye irritation test – The HET-CAM test and 3T3 NRU cytotoxicity test. ATLA. 1996;24:741-58.
- Staub I, Cruz AS, Pinto TJA, Schapoval EES, Bergold AM. Determinação da segurança biológica do xampu de cetoconazol: teste de irritação ocular e avaliação do potencial de citotoxicidade *in vitro*. Rev Bras Ciênc Farm. 2007;43(2):301-7.
- Tseng SCG. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. Biosci Rep. 2001;21(4):481-9.
- Varella SD, Pozetti GL, Vilegas W, Varanda EA. Mutagenic activity of sweepings and pigments a household-wax factory assayed with *Salmonella typhimurium*. Food Chem Toxicol. 2004;42(12):2029-35.
- Vinken M, Pauwels M, Ates G, Vivier M, Vanhecke T, Rogiers V. Screening of repeated dose toxicity data present in SCC(NF)P/SCCS safety evaluations of cosmetic ingredients. Arch Toxicol. 2012;86(3):405-412.
- Vogel HJ, Bonner DM. Acetylornithinase of *Escherichia coli*: partial purification and some properties. J Biol Chem. 1956;218:97-106.
- Weels T, Basketter DA, Schroder KR. *In vitro* skin irritation: facts and future. State of the art review of mechanisms and models. Toxicol In Vitro. 2004;18(3):231-43.
- Worth AP, Balls M. The principles and procedures of validation. In: Alternative (non-animal) methods for chemicals testing: current status end future prospects. ATLA. 2002;30(Suppl.1):13-9.
- Youssef KK, Van Keymeulen A, Lapouge G, Beck B, Michaux C, Achouri Y, Sotiropoulou PA, Blanpain C. Identification of the cell lineage at the origin of basal cell carcinoma. Nat Cell Biol. 2010;12:299-305.
- Zeiger E. Mutagens that are not carcinogens: faulty theory or fault tests? Mutat Res. 2001;492(1-2):9-38.

Recebido em 18 de janeiro de 2012.

Aceito para publicação em 12 de junho de 2012.