



Ensaio biológicos para avaliação de segurança de produtos cosméticos

Chorilli, M.¹; Tamascia, P.²; Rossim, C.²; Salgado, H.R.N.^{3*}

¹Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Vida, Pontifícia Universidade Católica de Campinas, PUCAMP, Campinas, SP, Brasil.

²Curso de Farmácia, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Metodista de Piracicaba, UNIMEP, Piracicaba, SP, Brasil.

³Departamento de Fármacos e Medicamentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Araraquara, SP, Brasil.

Recebido: 07/01/2009 - Aceito: 25/05/2009

RESUMO

Apesar de não ser desejável, alguns produtos cosméticos podem apresentar reações adversas aos usuários. Tais efeitos, muitas vezes, podem ser decorrentes de fatores individuais ou até mesmo pelo uso inadequado do produto. Logo, os ensaios biológicos para avaliação de segurança devem preceder a colocação do cosmético no mercado. Historicamente, estes ensaios sempre foram realizados *in vivo*, em animais, uma vez que podem ser utilizados para avaliar grande parte dos riscos potenciais envolvidos, seja irritação, alergia ou efeitos sistêmicos; todavia, atualmente alguns centros de pesquisa estão adotando alternativas *in vitro* aos ensaios com animais. Esta revisão enfatiza a necessidade de realização de ensaios biológicos para avaliação de segurança de produtos cosméticos, bem como apresenta os principais testes *in vivo* e *in vitro* empregados, abordando a necessidade de aplicar-se métodos alternativos aos ensaios *in vivo* na avaliação de segurança dos mesmos, de forma a oferecer aos consumidores o máximo de segurança com o menor risco, garantindo as melhores condições de uso do produto.

Palavras-chave: Ensaio biológicos. Avaliação de segurança. Produtos cosméticos.

INTRODUÇÃO

Os produtos cosméticos são usados pelo homem desde épocas remotas. Inicialmente, as fontes de seus ingredientes eram essencialmente plantas, animais e minerais. No entanto, o avanço da tecnologia resultou

na inclusão de muitas substâncias químicas sintéticas na formulação destes produtos. Atualmente, o uso, principalmente como produtos de higiene, é amplo e atinge um grupo populacional cada vez maior (Leonardi, 2004).

Na prática, os produtos cosméticos são raramente associados com sérios danos à saúde. Entretanto, isto não significa que produtos cosméticos sejam sempre seguros, especialmente considerando os efeitos a longo prazo. Partindo do pressuposto de que estes produtos podem ser usados extensivamente durante um amplo período de nossa vida, é extremamente necessário garantir a segurança e eficácia dos mesmos, através do controle da toxicidade do produto final e dos seus ingredientes conforme vários autores relatam na literatura (Romanowski & Schueller, 1996; Brasil, 2002), bem como outros dados de nosso grupo de pesquisa (Chorilli et al., 2007a).

A legislação brasileira de acordo com a Resolução nº 79, de 2000, estabeleceu normas e procedimentos para registro de Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes. Portanto, os produtos cosméticos devem passar por processos de avaliação de risco para que se faça valer o direito do consumidor e, principalmente, garantir a saúde da população (Brasil, 2000; 2005).

Todos os anos, milhares de novos cosméticos, produtos de limpeza e de higiene pessoal são lançados no mercado. Potencialmente, muitos deles são testados em animais em vários estágios do seu desenvolvimento com objetivo de oferecer segurança para que estas substâncias não causem danos aos seres humanos (Baker & Bruner, 1997; Drill & Lazar, 1997). Recentemente, dados sobre reações adversas a cosméticos foram publicados por nosso grupo (Chorilli et al., 2007b).

Os ensaios biológicos utilizados para avaliação de segurança de produtos cosméticos, entre eles o teste de sensibilidade de pele, irritação ocular, fototoxicidade, teste adjuvante de Freund e citotoxicidade geram discussão entre os pesquisadores, e cabe, portanto, ao profissional envolvido em questões técnico-científicas, o bom senso na utilização de ensaios toxicológicos e a busca de abordagens alternativas, evitando sempre que possível a morte e o

Autor correspondente: Hérica Regina Nunes Salgado - Departamento de Fármacos e Medicamentos - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - Universidade Estadual Paulista - UNESP - Rodovia Araraquara-Jaú, km 1 - CEP: 14801-902 - Araraquara, SP, Brasil - Telefone: (16) 3301-6967 - e-mail: salgadoh@fctfar.unesp.br

sofrimento desnecessários dos animais de experimentação (Goldberg, 1989; Alternatives to Animal Testing, 2003; Filipe & Gomes, 2006). Esta preocupação na comunidade científica também é discutida em publicações de nosso grupo de pesquisa (Marona, 2003; Chorilli et al., 2007c; Politi et al., 2008).

Diante das críticas que vem sofrendo, o meio científico tem demonstrado uma forte tendência em aplicar a política dos 3 Rs (*replace, reduce, refine*) introduzida por Russel & Burch (1959), ou seja, substituição, redução, refinamento, não visando impedir a utilização dos modelos animais nos experimentos, mas a sua utilização de forma adequada e humanitária, sem comprometer a qualidade do trabalho científico que está sendo executado, conforme descrito em nossos estudos (Marona & Lucchesi, 2003; 2004).

Para minimizar estes problemas, tenta-se validar metodologias *in vitro* para determinação do potencial tóxico de ingredientes presentes nos produtos cosméticos; todavia, os relatos de literatura mostram que tais metodologias não foram suficientemente validadas para uso, portanto a maioria dos métodos alternativos ainda não são 100% confiáveis (Balls & Fentem, 1999; Barlow et al., 2001; Worth & Balls, 2002).

Assim sendo, os animais ainda permanecem como recurso insubstituível. Todavia, há necessidade de realizar testes em seres humanos após o trabalho exploratório em animal para melhor validação e confiabilidade dos produtos (Jackson, 1990; Pinto et al., 2003).

O objetivo desta revisão foi descrever alguns ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo*, descritos em compêndios nacionais e internacionais, utilizados para avaliação de segurança de produtos cosméticos, destacando a necessidade de se aplicar métodos alternativos aos ensaios *in vivo* na avaliação de segurança dos mesmos.

ESPÉCIES ANIMAIS

Das espécies animais empregadas nos ensaios de segurança de cosméticos, o porco e o macaco são as que apresentam maior semelhança do ponto de vista fisiológico à espécie humana. Todavia, devido à dificuldade de manuseio e ao porte não estão entre as mais empregadas. Logo, as espécies mais utilizadas acabam sendo os clássicos animais de laboratório, como ratos, camundongos, hamsters, cobaias e coelhos (Aubin, 1994).

O macaco *Rhesus* e os outros animais primatas poderiam ser modelos interessantes. Os macacos apresentam, com efeito, uma pele cujas características fisiológicas, biofísicas e bioquímicas são muitos similares da pele humana. Entretanto, seu custo e sua relativa dificuldade de manipulação são sérios fatores limitantes (Pruniéras, 1994).

Outro modelo animal interessante é o porco doméstico. Certamente a pele do porco não é idêntica à pele humana, mas apresenta várias semelhanças; uma peculiaridade é que o porco é um dos raros animais que possui um sebo de natureza glicéridica como o homem (Aubin, 1994; Pruniéras, 1994). O porco tem sido empregado em alguns ensaios que visam observar a eficácia de princípios ativos lipolíticos na pele, dentre eles o tiratricol, a cafeína e a hialuronidase, alguns deles desenvolvidos por nosso grupo científico (Polacow et al., 2004; Chorilli et al., 2005; Chorilli et al., 2007d; Pires-de-Campos et al., 2008).

Os ratos, camundongos, coelhos e cobaias apresentam uma pele diferente da pele humana em alguns aspectos, como quantidade de pêlo, natureza do sebo, espessura, dentre outros. Apesar destas limitações, estes modelos animais são os mais utilizados para avaliação de segurança de produtos cosméticos por serem de custo baixo e de fácil acesso; logo, estão entre os animais de escolha para realização dos ensaios biológicos (Viglioglia & Rubin, 1991; Aubin, 1994; Chorilli et al., 2004; Chorilli, 2007).

ENSAIOS BIOLÓGICOS

Teste de irritação de pele

O teste padrão para avaliar o potencial de irritabilidade de um composto em animais foi publicado por Draize et al. (1944) e o protocolo do teste permanece inalterado em sua essência. Após a realização de estudos de irritação em várias espécies animais como coelhos, cobaias, camundongos, cachorro e outros animais, os coelhos foram os animais que apresentaram melhores resultados para verificação de irritação (Draize et al., 1944; Lachapelle, 1994).

Modificações nos procedimentos de Draize et al. (1944) foram propostos para aumentar a uniformidade de resultados, para testar compostos de forma menos rigorosa e mais semelhante às condições de uso e ir de encontro a uma necessidade específica do pesquisador. Um menor tempo de contato com a pele (quatro horas) foi proposto pela FDA (2003), porém estas alterações não foram oficializadas.

Estes testes são mencionados no *Code of Federal Regulations* (Código dos Regulamentos Federais – codificações gerais e permanentes publicadas anualmente pelos departamentos executivos e pelas agências do governo federal americano) para fabricação de produtos de higiene, cosméticos, perfumes e correlatos (CFR, 1986; Draelos, 1999; Pinto et al., 2003; Presgrave et al., 2004).

Modelo animal

A metodologia preconiza a utilização de coelhos albinos, com a pele tricotomizada; o teste é realizado na

pele intacta e na pele após abrasão. São utilizados, no mínimo, seis coelhos, com peso corpóreo acima de 2,0 kg, área utilizada de aproximadamente 6,0 cm², sendo a substância-teste aplicada em quantidade de 0,5 mL. As áreas de aplicação são recobertas com gaze fixada com fita adesiva durante 24 horas (Brasil, 2002).

Leituras são realizadas após 24 e 72 horas. Verifica-se se houve a formação de eritema e/ou edema sobre as áreas sadias e abrasadas, seguindo a escala de Draize et al. (1944) (Tabela 1).

Dispõe-se, portanto, de 24 resultados quando utilizados seis animais; o total destes resultados é dividido

por 24 para obter o índice de irritação cutânea, que é utilizado na apreciação do poder irritante do produto testado, o qual pode ser verificado na Tabela 1 (Lachapelle, 1994; Draelos, 1999; Pinto et al., 2003; Presgrave et al., 2004).

Modelo *in vitro*

Os seguintes testes *in vitro* são utilizados para avaliação de irritação da pele: teste em membrana, ensaio de citotoxicidade em células SIRC (linhagem celular derivada de córnea de coelho), ensaio de difusão em ágar,

Tabela 1 - Parâmetros para verificação do grau de irritação cutânea após aplicação do produto.

Parâmetros	Repostas da pele	Valor
Formação de Eritema e Escaras	Ausência de eritema	0
	Eritema muito leve	1
	Eritema bem definido	2
	Eritema moderado a severo	3
	Eritema grave com formação de escaras	4
Formação de edema	Ausência de edema	0
	Edema muito leve (apenas visível)	1
	Edema leve (contornos nítidos)	2
	Edema moderado (espessura = + 1 mm)	3
	Edema grave (superior a 1 mm)	4

Fonte: Lachapelle, 1994; Draelos, 1999; Pinto et al., 2003; Presgrave et al., 2004.

teste de hemólise e desnaturação protéica *Red Blood Cell* (RBC), teste de irritação elétrica transcutânea (TER) e teste de pele humana reconstruída (EPISKINTM) (Ponac, 1992; Loprieno et al., 1995; Indans, 2002; Liebsch & Spielmann, 2002; ICCVAM, 2003; Presgrave et al., 2004; Hoffmann et al., 2005a).

Eun & Suh (2000) afirmam que embora a maioria dos modelos *in vitro* para verificação de irritação cutânea apresente grande número de estruturas celulares da pele humana, como os fibroblastos da derme e os queratinócitos da epiderme, eles não contêm outros tipos de células que estão envolvidas no mecanismo de inflamação da pele *in vivo*, como vasos sanguíneos endoteliais e células inflamatórias, o que dificulta o emprego destes métodos em substituição ao teste de Draize et al. (1944).

Entre os métodos utilizados para verificação *in vitro* de irritação pele, tem-se o TER e o EPISKINTM. No TER, a substância ou produto a ser testado é aplicado durante 24 horas discos da epiderme de ratos. Tais discos são preparados a partir da pele dorsal de animais sacrificados. A pele é colocada sobre a extremidade de um tubo de

politetrafluoroetileno, com o cuidado de garantir que a superfície epidérmica esteja em contato com o tubo. A pele é fixada na extremidade do tubo com borracha e elimina-se o tecido em excesso. Para cada substância a ser testada, são utilizados três discos de pele da epiderme de ratos. A substância teste é então removida por lavagem com jato de água (até 30°C). Antes de medir a TER, adiciona-se etanol 70%, com posterior hidratação com solução de sulfato de magnésio (154 mM). Embora a concentração de álcool utilizada seja muito alta e com possibilidade de agredir a pele, ele é adicionado com o objetivo de reduzir a tensão superficial. A TER é então medida usando uma corrente alternativa de baixa voltagem, sendo os eletrodos colocados de cada lado do disco de pele para medida da resistência elétrica em KW/disco de pele. Identifica-se se um material é corrosivo pela sua capacidade em danificar a integridade do estrato córneo e da barreira funcional da pele. Se o valor de TER for ≤ 5 KW, a substância teste é corrosiva. Se TER for ≥ 5 KW, a substância não é corrosiva. Já no teste EPISKINTM, a substância ou produto acabado é aplicado topicamente por mais de 4 horas num modelo de

cultura de tecido, composto por epiderme e estrato córneo funcional. Identificam-se os materiais corrosivos pela capacidade de diminuição na viabilidade das células abaixo de níveis definidos em períodos de tempo específicos. A viabilidade das células é avaliada pela medida da atividade mitocondrial, através de corante MTT (3-(4,5 dimethyl thiazole-2yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) que forma um precipitado azul (formazan) sobre as células viáveis, o qual é quantificado por espectrofotometria em comprimento de onda entre 545 e 595 nm. O controle negativo do valor de densidade óptica representa 100% de viabilidade celular. Os valores obtidos para cada amostra podem ser usados para calcular uma porcentagem de viabilidade em relação ao controle negativo (Liebsch & Spielmann, 2002; ICCVAM, 2003).

Hoffmann et al. (2005b) afirmam que o modelo de pele reconstruída fornece vantagens fundamentais em relação à cultura de células levando à resultados promissores conforme evidenciado por diferentes estudos de validação.

Teste de irritação ocular

O teste de irritação ocular é importante para produtos cosméticos, uma vez que pode ocorrer a introdução acidental de cosméticos no olho. O teste descrito por Draize et al. (1944) visa avaliar os efeitos da irritação de substâncias na conjuntiva, na córnea e na íris de olhos de coelhos albinos. Todavia, Kay & Calandra (1962) incluíram parâmetros como eritema e espessura das pálpebras, abrangendo edema, lacrimejamento, opacidade, danos e neovascularização da córnea neste protocolo. Este teste é um dos mais criticados, particularmente no que diz respeito à avaliação do potencial de irritação ocular de produtos cosméticos. Apesar disto, ele ainda é aceito por algumas agências regulatórias mundiais (Yan et al., 2007; Vinardell & Mitians, 2008; Nigan, 2009).

Modelo Animal

Apesar de tentativa na redução do número de animais, o teste utiliza no mínimo 6 animais, sendo 0,1 mL da substância teste instilado no saco conjuntival inferior de um olho de cada animal, mantendo as pálpebras fechadas por um segundo e abrindo-as em seguida. Os olhos não são lavados, permitindo que o próprio lacrimejamento promova a remoção. Os olhos não tratados servem como controle, sendo ambos examinados nos tempos 1 hora, 24 horas (momento em que se lava os olhos tratados com solução salina a 0,9%), 48 e 72 horas após a instilação (Kay & Calandra, 1962; Brasil, 2002).

No caso de persistirem reações positivas, as avaliações poderão prosseguir, no geral até sete dias. As reações observadas em cada animal são quantificadas e podem ser observadas na Tabela 2 (Drill & Lazar, 1997; Pinto et al., 2003; Presgrave et al., 2004).

Várias modificações têm sido propostas à metodologia de Draize et al. (1944). Os detalhes do procedimento e interpretação são apresentados na Tabela 3 (Draize et al., 1944; Kay & Calandra, 1962; CFR, 1986; INCQS, 1997).

Modelo in vitro

Vários grupos de pesquisadores propõem a utilização de métodos alternativos para a determinação da irritabilidade oftálmica, tais como o teste de membrana córneo-alantóide do ovo de galinha (HET-CAM) e ensaio de permeabilidade e opacidade corneal bovina (BCOP) (Gordon & Kelly, 1989; Barlow et al., 2001; Brasil, 2002; Meyer, 2003).

O ensaio de HET-CAM tem como objetivo avaliar semi-quantitativamente o potencial irritante de um produto (produtos solúveis, emulsões, géis e óleos) sobre a membrana córneo-alantóide de ovo embrionado de galinha no décimo dia de incubação. O ensaio baseia-se na observação dos efeitos irritantes (hiperemia, hemorragia e coagulação), após cinco minutos de aplicação do produto, puro ou diluído, sobre a membrana córneo-alantóide. Obtém-se uma escala que considera os fenômenos observados. O ensaio de BCOP tem como objetivo avaliar quantitativamente o potencial irritante de um produto ou de uma substância química após aplicação sobre a córnea isolada de bezerro. O ensaio baseia-se na medida da opacidade e da permeabilidade da córnea de bezerro após o contato com o produto teste. A medida da opacificação córnea é realizada com o auxílio de um opacitômetro, aparelho que determina a diferença de transmissão do fluxo luminoso entre a córnea a ser avaliada, fixando um valor numérico da opacidade. A medida da permeabilidade córnea é realizada conforme o tempo de contato, adicionando fluoresceína e medindo a densidade óptica em 490 nm, obtendo-se uma escala que considera os fenômenos observados (Gordon & Kelly, 1989; Sparacio, 1996).

Fototoxicidade

Segundo Liebsch & Spielmann (2002), a fototoxicidade é uma reação aguda, que pode ser induzida por um simples tratamento com uma substância química e concomitante exposição à radiação ultravioleta ou visível.

As dermatites fototóxicas são limitadas à área de exposição à luz. Reações fototóxicas são decorrentes de mecanismos imunológicos e geralmente são acompanhadas de hiperpigmentação e descamação. As moléculas que produzem fototoxicidade geralmente vêm prontamente da radiação UVA (Lachapelle, 1994).

Por outro lado, a dermatite fotoalérgica é menos comum e geralmente necessita de exposições repetidas, caracterizando-se por eritema e edema (Lachapelle, 1994; Montalvo, 2005).

Tabela 2 - Teste de irritação ocular em coelhos: valores de graduação para lesões oculares.

DESCRIÇÃO DAS LESÕES	GRAU
Córnea (opacidade)	
Não ulceração ou opacidade	0
Área dispersa de opacidade, íris totalmente visível.	1
Áreas transluzentes facilmente discerníveis, detalhes da íris pouco obscuros.	2
Áreas necroticas, detalhes da íris não visíveis, tamanho da pupila pouco discernível	3
Completa opacidade da córnea, íris não discernível.	4
Íris (irite)	
Normal	0
Dobras marcadamente profundas, congestão, inchaço, íris ainda reativa a luz.	1
Não reação à luz, hemorragia, destruição grosseira.	2
Conjuntiva	
Hiperemia	
Vasos normais	0
Alguns vasos definidamente injetados	1
Vermelho carmim difuso, vasos individuais não facilmente discerníveis.	2
Vermelho-carne difuso	3
Quemose	
Não inchaço	0
Algum inchaço acima do normal	1
Obvio inchaço com parcial aversão das pálpebras	2
Inchaço com pálpebras pouco fechadas	3
Inchaço com pálpebras mais que metade fechadas	4

Fonte: Drill & Lazar, 1997; Pinto et al., 2003; Presgrave et al., 2004.

Modelo animal

Pode-se empregar neste estudo camundongos *hairless*, coelhos, porcos e cobaias, sendo a cobaia o animal de escolha. Como os produtos químicos fototóxicos exercem atividade em comprimento de onda igual ou superior a 310 nm (comprimentos de onda pouco ou não eritrógenos), a utilização de fonte de raios ultravioleta (UV) que não produz reação eritematosa parece adequada. Utiliza-se em geral, um aparelho de tipo UPVA (PUVA 180 Waldmann) e dispõe-se de dosímetro para exprimir a dose recebida na pele em joules/cm² (Romanowski & Schueller, 1996).

Substâncias presentes em cosméticos e que podem causar fototoxicidade são: algumas fragrâncias, como metilcoumarina, musk, ambrette, substâncias antibacterianas e ésteres ácidos p-aminobenzóico (Groot et al., 1988; Jackson, 1993; Soni et al., 2001; 2002; 2005).

Cada experimento deve ser planejado individualmente, em particular quando se tratar de substâncias novas. Pode-se recorrer a duas espécies animais diferentes e a vários períodos de exposição (cálculos da dose recebida expressos em joules/cm²) modificando a irradiação (Brasil, 2002). Após o trabalho exploratório em animal, é necessário que seja realizado também o teste em peles humanas para melhor validação dos produtos (Pinto et al., 2003).

Tabela 3 - Parâmetros dos métodos propostos para o teste de irritação ocular em coelhos

PARÂMETROS	MÉTODOS			
	Draize et al. (1944)	CFR (1986)	Kay et al. (1962)	INCQS (1997)
Espécie de animal	Coelho albino	Coelho albino	Coelho albino	Coelho albino
Numero de animal	9	6	5	5
Irrigação	2 s após Aplicação	Depois da leitura de 24h	Depois da leitura de 24h	Depois da leitura de 24h
Lavagem	20 mL com água destilada	NaCl 0,9% por 5 minutos	NaCl 0,9% por 5 Minutos	NaCl 0,9% por 5 Minutos
Leituras de testes	24, 48, 72 h 4 e 7 dias	24, 48, 72 h.	24, 48, 72 h 4 e 7 dias	24, 48, 72 h 4 e 7 dias
Lesões observadas	Opacidade, irite, hiperemia, quemose	Opacidade, hiperemia, irite, quemose	Opacidade, irite, hiperemia, quemose, secreção	Opacidade, irite, hiperemia, quemose
Classificação do produto testado	Irritante ou não Irritante	Irritante ou não irritante	7 classes de irritação	5 classes de irritação
Critério de Classificação	Nº de animais com reação positiva	Nº de animais com reação	Colocação das médias em tabela classificatória	Nº de animais com reação positiva igual a Kay

Fonte: Pinto et al., 2003.

Modelo in vitro

É empregado principalmente o teste de captação do vermelho neutro. Neste teste, células chamadas 3T3 são mantidas em cultura durante 24 horas para a formação de monocamadas. Duas placas por substância teste são pré-incubadas com oito concentrações diferentes da substância durante uma hora. Em seguida, uma das placas é exposta a uma dose de luz UV não citotóxica, enquanto a outra é mantida no escuro, para ser usada como controle. Em ambas as placas, o meio de tratamento é depois substituído por meio de cultura e após 24 horas de incubação, a viabilidade celular é determinada pela aquisição do vermelho neutro durante três horas. Um resultado positivo neste teste indica que a substância teste tem potencial fototóxico (Barlow et al., 2001; Brasil, 2002; Guideline for Testing of Chemicals, 2002).

Acneigênese (Comedogênese)

Óleos minerais têm propriedades comedogênicas intensas; vale dizer que, posto em contato com a pele durante um período suficientemente longo, eles favorecem o desenvolvimento de acnes (Lachapelle, 1994).

Numerosos produtos cosméticos têm propriedades comedogênicas fracas, nitidamente inferior às dos óleos minerais. Eles provocam em certos usuários o aparecimento de acne cosmética (Katoulis et al., 1996).

Esta propriedade de acneigênese também depende

do tipo de pele do usuário, por isso os testes não revelam resultados totalmente confiáveis (Lachapelle, 1994; Drill & Lazar, 1997).

Modelo Animal

Os primeiros a descreverem este teste foram Adams et al. (1941). Os autores constaram que pincelando o conduto auditivo externo do coelho com diferente óleo, obtinham uma hiperqueratose folicular cuja intensidade era reflexo exato de efeito comedogênico no homem.

Mills & Klingmam (1975) modificaram o teste inicial de Adams et al. (1941) adaptando-o ao estudo de agentes comedogênicos fracos e em particular de produtos cosméticos. Segundo este método, cada produto a ser testado deve ser aplicado sobre um dos condutos auditivos externos de dois coelhos por cinco dias consecutivos por duas semanas, enquanto o outro conduto serve de controle. No 14º dia, a região controle e as áreas tratadas são retiradas com auxílio de bisturi, fixadas com formol e cortadas horizontalmente para confecção de lâminas e posterior análise microscópica.

Em 1979 este modelo foi modificado. Em vez da preparação de seções histológicas, Klingman & Kwong (1979) efetuaram montagens para exames ao estereomicroscópio. As áreas tratadas como no método inicial devem ser coletadas e depois imersas em água quente a 60°C durante 2 minutos. Com pinças finas, a epiderme deve ser destacada e sua face interior examinada por

estereomicroscopia. As amostras podem ser conservadas indefinidamente e os resultados devem ser comparáveis aos do método convencional (Lachapelle, 1994).

Modelo in vitro

Chiba et al. (2000; 2001) utilizaram culturas de fibroblastos primários derivados da orelha de coelho para verificar a comedogenicidade do esqualeno. Neste protocolo, irradiou-se o esqualeno com radiação UVA de forma a obter monohidroperóxido de esqualeno, o qual pode ser extraído da cultura de fibroblastos com solução de metanol e isolado por cromatografia líquida de alta eficiência usando metanol como fase móvel. Os autores verificaram que o grau de comedogenicidade induzida pelo monohidroperóxido de esqualeno foi maior do que o de substâncias reconhecidamente comedogênicas, como miristato de isopropila

Teste adjuvante completo de Freund

O teste adjuvante completo de Freund (TACF) é um teste modificado do ensaio de sensibilização em cobaias, com a finalidade de detectar substâncias com características alergênicas (Lachapelle, 1994; Pinto et al., 2003). São realizados em duas etapas chamadas de indução e de desafio. O mecanismo ainda não foi totalmente determinado.

Modelo Animal

A indução é feita com um grupo teste e um grupo controle, com 10 a 20 cobaias utilizando 6 x 2 cm da região supraescapular tricotomizada e injeção intradérmica de 0,1 mL de solução ou emulsão a 1:1 da formulação teste para 5% de ACF (emulsão água em óleo com antígeno) que são aplicados nos tempos 0, 4 e 8 dias após a tricotomização (Brasil, 2002).

O desafio também é feito com um grupo teste e um grupo controle, com 10 a 20 cobaias, no 21° e 35° dia. A tricotomização do dorso é realizada para a aplicação de seis concentrações diferentes com 0,025 mL no total de amostra líquida ou de 0,01 mL da amostra semi-sólida. ACF é utilizada igualmente no teste de indução. As regiões do desafio são examinadas após 24, 48 e 72 horas, recebendo graduações (Brasil, 2002; Pinto et al., 2003).

Modelo in vitro

Gospos et al. (2001) descreveram um modelo *in vitro* para verificação de sensibilização a substâncias potencialmente alergênicas baseado no isolamento de mastócitos primários de pacientes não alérgicos. Para estabelecer a especificidade do método, os autores utilizaram mastócitos primários estimulados com

imunoglobulina E (IgE), fator celular humano recombinante e anticorpos anti-IgE de modo a liberar significativamente a quantidade de histamina, indicando dessa forma a capacidade dos mastócitos primários de causar uma reação de hipersensibilidade do tipo imediata.

Teste de sensibilização da pele

Existem situações em que a primeira exposição a uma substância química promove pequena reação, que se torna severa e persistente na segunda exposição. Contatos subsequentes, mesmo que após semanas ou anos produzem reações alérgicas de duração longa (Brasil, 2002).

Modelo Animal

A substância-teste é injetada intradermicamente como emulsão a 0,1% em solução aquosa de cloreto de sódio a 0,9%. Dois grupos de 20 cobaias são utilizados para cada substância-teste, sendo um deles como controle. A injeção intradérmica de 0,05 mL da amostra é aplicada na região dorsal tricotomizada, repetindo-se a mesma dose, na mesma região da primeira aplicação, a cada 2 dias até completar 10 injeções, ao longo de três semanas (Lachapelle, 1994; Brasil, 2002).

No 35° dia o desafio final é feito no sítio de pele correspondente ao da primeira injeção. Animais-controle são simultaneamente tratados somente com diluente, sendo este injetado intradermicamente (0,05 mL), para comparação dos resultados dos animais tratados com a substância-teste. Se houver diferença significativa entre as reações dos animais dentro do mesmo grupo, os valores médios para a indução (10 injeções) e a fase de teste (injeção do 35° dia) no grupo experimental são comparados. A incidência de resposta eritematosa é calculada, sendo que qualquer valor positivo indica sensibilização. A via de administração é freqüentemente irreal comparada à condição de uso e a concentração de indução (0,1%) é fixada sem considerar a concentração de uso. Leituras quantitativas do teste intradérmico envolvem dificuldades significantes, pois o estado atípico da pele provavelmente conduz a um número significativo de falso-positivos (Lachapelle, 1994; Brasil, 2002).

Modelo in vitro

Para ensaios de sensibilização da pele, pode-se empregar o teste chamado RBC (*Red Blood Cell System*). Este ensaio permite quantificar e avaliar os efeitos adversos dos tensoativos empregados em xampus, sabonetes líquidos e produtos de higiene sobre a membrana plasmática de hemácias e a conseqüente liberação da hemoglobina (hemólise) e ainda, o índice de desnaturação da hemoglobina, avaliado através de sua forma oxidada, ambos quantificados por espectrofotometria. A relação

entre a hemólise e oxidação da hemoglobina fornece parâmetros de caracterização dos efeitos destas substâncias *in vitro* (Romanowski & Schueller, 1996; Hostynek, 1998).

Citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade define o potencial de degeneração ou morte celular provocado pelo material constituinte nos cosméticos. Assim, resultados positivos no ensaio de citotoxicidade descaracterizam a condição de inocuidade do cosmético, sendo possível causar processos de irritabilidade nos usuários (Demarco et al., 1998).

Modelo Animal

Determinadas quantidades de matérias-primas no organismo podem provocar vômitos, danos aos órgãos internos e até a morte. Os testes destinados a medir a citotoxicidade são úteis para avaliar esses perigos de forma a ter controles de toxicidade. O teste de DL50 é o método básico utilizado para determinar qual dosagem oral do produto a ser testado é letal para 50% da população testada. Neste teste, ratos recebem dose única da substância teste por meio de entubação gástrica (gavage). Já no teste de toxicidade percutânea a substância é aplicada na pele de coelhos, onde permanece por 24 horas. Tanto no teste de citotoxicidade oral quanto percutânea registram-se os dados relativos de toxicidade e mortalidade por 14 dias. Após os testes, pesquisadores examinam os danos causados aos órgãos internos dos coelhos (ICCVAM, 2001; Stitzel et al., 2002; Gazda et al., 2006; Qin et al., 2006).

Modelo in vitro

O estudo comparativo do ensaio de citotoxicidade pode ser realizado através de duas metodologias: ensaio de difusão em ágar e ensaio de incorporação do vermelho neutro (Demarco et al., 1998; Regerol et al., 2003). Hecker et al. (2002) analisaram *in vitro* o potencial citotóxico de alquilfenóis de *Ginkgo biloba* L. pelo ensaio de incorporação do vermelho neutro e observaram que a ação citotóxica destas substâncias nestas células é mediada pela transformação da mitocôndria induzida pela fosforilação oxidativa.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A avaliação da segurança de produtos cosméticos envolve o conhecimento de muitas áreas, incluindo o uso (e o mau uso) do produto pelo consumidor, os métodos empregados nos testes de segurança e as concentrações máximas permitidas das matérias-primas nos produtos.

Tais medidas são imprescindíveis como forma de evitar tanto reações adversas relativamente simples

como irritação da pele, vermelhidão, queimaduras, lacrimação, visão embaçada, hipersensibilidade e queda de cabelo, quanto reações mais complexas, como risco de aparecimento de câncer na boca, nas narinas, no pulmão, no sangue e na cabeça, que podem ser decorrentes da inalação e exposição prolongada a produtos sensibilizantes.

Logo, a implementação de uma política de Cosmetovigilância na área de produtos cosméticos, que tem sido preconizada no Mercosul através das resoluções MERCOSUR/GMC/RES. n° 26/04 e MERCOSUR/GMC/RES n° 19/05, é de extrema importância como forma de garantir ao usuário a segurança e eficácia dos produtos, bem como facilitar a este o acesso a relatos sobre problemas de uso, defeitos de qualidade, efeitos indesejáveis, além de ser uma maneira de proibir e/ou coibir o uso indiscriminado de substâncias que podem se apresentar tóxicas.

Devido às questões políticas e sociais, os ensaios para avaliação de segurança de produtos cosméticos em animais estão, aos poucos, deixando de existir, sendo inclusive uma recomendação da 7ª Ementa Diretiva 76/768/ECC constante no Boletín GTEMA 33/34 de 2006, da Comunidade Européia, que define o ano de 2009 como prazo máximo para não mais utilização de animais em testes de segurança de cosméticos.

Neste sentido, a Associação Européia de Cosméticos (Colipa) lançou uma diretriz orientadora abolindo os testes com animais. Tal diretriz proíbe os testes de produtos cosméticos acabados ou de matérias-primas em animais, além de proibir a entrada em países da Comunidade Européia de cosméticos testados em animais a partir de 2004, permitindo um prazo de seis anos para adequação das empresas, independentemente de haver ou não métodos alternativos validados (Asociación Española de Toxicología, 2006).

Para os países do Mercosul, dentre eles o Brasil, os ensaios biológicos para avaliação de segurança de produtos cosméticos ainda podem ser realizados em animais, sempre levando em consideração princípios éticos, a redução do número de animais nos experimentos e a não existência de métodos alternativos válidos (Brasil, 2002).

Os testes *in vitro* surgem como uma promissora e importante tentativa de substituição dos modelos animais nos ensaios biológicos para cosméticos. Todavia, apesar do desenvolvimento de grande variedade de métodos alternativos experimentais, estes ainda não substituem a experimentação animal em sua totalidade. Mesmo diante destes fatos, tendências futuras à curto prazo são a completa substituição dos testes envolvendo animais pelos testes *in vitro*.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq (Brasília, Brasil), à FAPESP (São Paulo, Brasil) e ao PADC-FCF-UNESP (Araraquara, Brasil), pelo apoio financeiro aos nossos projetos.

ABSTRACT

Biological assays for evaluate the safety of cosmetic products

Despite efforts to the contrary, some cosmetic products can cause undesirable side effects in the users. These may often be due to individual factors or inappropriate use of the product. Thus, biological assays to assess the safety of a new cosmetic must precede its being placed on the market. Historically, these tests have always been carried out *in vivo*, in animals, since such tests can be used to evaluate many of the potential risks, such as irritation, allergy or systemic effects; but, recently, some research centers have been adopting *in vitro* alternatives, in order to replace the animal tests. This review emphasizes the need to employ biological assays to test the safety of cosmetic products, and reviews the main *in vivo* and *in vitro* tests used, focusing on the need to develop and use alternatives to the *in vivo* assays of product safety, so as to offer the consumers the maximum safety with the least possible risk, while ensuring the best conditions of use of the product.

Keywords: Biological assays. Safety evaluation. Cosmetic products.

REFERÊNCIAS

- Adams EM, Irish DD, Spencer HC, Rowe VK. The response of rabbit skin to compounds reported to have caused acneform dermatitis. *Ind Med Ind Hyg Sect.* 2 1941; 10:1-4.
- Alternatives to animal testing. Testing – a regulatory requirement. 2003. [cited 2008 sept 22]. Available from: <http://www.colipa.com/alternatives.html#n>.
- Asociación Española de Toxicología. Grupo de Trabajo Especializado en Metodos Alternativos (GTEMA). Boletín GTEMA 33/34, 2006. [citado 2009 mar 06]. Disponible en: <http://www.uv.es/aetoxweb/grupos/gtema/gtema.Documentos.Html>.
- Aubin G. Experimentação biológica dos produtos cosméticos. In: Pruniéras M. Manual de cosmetologia dermatológica. 2. ed. São Paulo: Andrei; 1994.
- Baker FW, Bruner LH. In-house strategies for the safety evaluation of cosmetic products: the contribution of alternative methods in animal alternatives, welfare and ethics. Amsterdam (Netherlands): Elsevier; 1997. P.567-73.
- Balls M, Fentem JH. The validation and acceptance of alternatives to animal testing. *Toxicol In Vitro* 1999; 13:837-46.
- Barlow BD, Marshall L, McPherson J. Patch testing vs *in vitro* alternatives. *Cosmet Toilet.* 2001; 116(5):51-5.
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Resolução - RDC 215, de 25 de julho de 2005. Aprova o regulamento técnico listas de substâncias que os produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes não devem conter exceto nas condições e com as restrições estabelecidas, que consta como anexo e faz parte da presente Resolução. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 26 jul. 2005. Seção 1, p.42-5.
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos. 2002. [citado 2008 set 23]. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>.
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Resolução - RDC 79, de 31 de agosto de 2000. Estabelece normas e procedimentos para registro de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes e adota a definição de produto cosmético. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 31 ago. 2000. Seção 1, p.34.
- Chiba K, Yoshizawa K, Makino I, Kawakami K, Onoue M. Changes in the levels of glutathione after cellular and cutaneous damage induced by squalene monohydroperoxide. *J Biochem Mol Toxicol.* 2001; 15(3):150-8.
- Chiba K, Yoshizawa K, Makino I, Kawakami K, Onoue M. Comedogenicity of squalene monohydroperoxide in the skin after topical application. *J Toxicol Sci.* 2000; 25(2):77-83.
- Chorilli M, Scarpa MV, Leonardi GR, Franco YO. Toxicologia dos cosméticos. *Acta Farm Bonaerense* 2007a; 26(1):144-54.
- Chorilli M, Scarpa MV, Corrêa MA. Reações adversas a cosméticos. *Infarma* 2007b; 19:17-22.
- Chorilli M, Michelin DC, Salgado HRN. Animais de laboratório: o camundongo. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.* 2007c; 28:11-23.
- Chorilli M. Desenvolvimento e caracterização físico-química de sistemas nanoestruturados contendo palmitato de retinol: controle microbiológico, avaliação da segurança e eficácia no tratamento do envelhecimento cutâneo. [Tese] Araraquara: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP; 2007.
- Chorilli M, Zague V, Ribeiro MCAP, Leonardi GR, Pires-de-Campos MSM, Polacow MLO. Avaliação histológica da pele após exposição à gel acrescido de hialuronidase associado ou não a ultra-som. *Acta Farm Bonaerense* 2007d; 26(1):26-30.

- Chorilli M, Carvalho LS, Pires-de-Campos MSM, Leonardi GR, Ribeiro MCAP, Polacow MLO. Avaliação histológica da hipoderme de suínos submetida à tratamento mesoterápico com tiratricol, cafeína e hialuronidase. *Acta Farm Bonaerense* 2005; 24(1):14-8.
- Chorilli M, Ribeiro MCAP, Pires-de-Campos MSM, Leonardi GR, Polacow MLO. Efeito de emulsão contendo extrato seco de guaraná sobre os vasos sanguíneos da derme papilar de ratos. *Saúde Rev.* 2004; 6(14):7-12.
- CRF. Code of Federal Regulation: Title 16. Office of federal register. Washington: US Government Printing Office, 1986. Pt. 1500.42.
- Demarco FF, Tarquinio SBCc, Jaeger MMM, Matson E. Evaluation of the cytotoxicity of two dentin-bonding systems. *Rev Odontol Univ São Paulo* 1998; 12(4):375-82.
- Draelos ZD. *Cosméticos em dermatologia*. 2.ed. Rio de Janeiro: Revinter; 1999.
- Draize JH, Woodward DG, Calvery HO. Methods for study of irritation and toxicity substances applied to the skin and mucous membranes. *J Pharmacol Exp Ther.* 1944; 82:377-90.
- Drill VA, Lazar P. *Cutaneous Toxicity*. New York: Academic Press; 1997.
- Eun HC, Suh DH. Comprehensive outlook of *in vitro* tests for assessing skin irritancy as alternatives to draize tests. *J Dermatol Sci.* 2000; 24:77-91.
- Filipe A, Gomes N. Alternativo à experimentação animal. Faculdade de Medicina Veterinária. Lisboa. 2006. [citado 2008 set 22]. Disponível em: <http://www.fmv.utl.pt/democ/sft/sem9798/g005/g005.htm>.
- FDA. Food and Drug Administration. *Cosmetic handbook: cosmetic safety*. 2003. [cited 2008 sept 23]. Available from: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/cos-hdb1.html>.
- Gazda VE, Gomes-Carneiro MR, Barbi NS, Paumgartten FJR. Toxicological evaluation of an ethanolic extract from *Chiococca alba* roots. *J Ethnopharmacol.* 2006; 105:187-95.
- Goldberg AM. Alternatives in toxicology: *in vitro* Toxicology is developing rapidly because of advances in cell, tissue and organ culture techniques. *Cosmet Toilet.* 1989; 104(11):53-9.
- Gordon VC, Kelly CP. An *in vitro* method for determining ocular irritation. *Cosmet Toilet.* 1989; 69(10):69-74.
- Gospos A, Dreikhausen U, Dartsch DC, Szamel M, Hockertz S. Development of an allergy test model: activation of human mast cells with potentially allergenic substances. *Toxicology* 2001; 166:91-6.
- Groot AC, Bruynzeel DP, Bos JD, Van Der Meeren LM, Van Joost T, Jagtman BA, Weyland JW. The allergens in cosmetics. *Arch Dermatol.* 1988; 124:1525-9.
- Guideline for Testing of Chemicals. Draft Proposal for a new guideline: 432. *In vitro* 3T3 NRU phototoxicity test, 2002.
- Hecker H, Johannisson R, Koch E, Siegers CP. *In vitro* evaluation of the cytotoxic potential of alkylphenols from *Ginkgo biloba* L. *Toxicology* 2002; 177:167-77.
- Hernandez M, Mercier-Fresnel MM. *Manual de cosmetologia*. 3.ed. Rio de Janeiro: Revinter; 1999. p.133-7.
- Hete Groene Hart Van Internettend Nederland. 2006. [cited 2008 Sept 23]. Available from: <http://www.denatuur.nl/dossiers/dierproeven/vivi48.jpg>.
- Hoffmann S, Cole T, Hartung T. Skin irritation: prevalence, variability, and regulatory classification of existing *in vivo* data from industrial chemicals. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2005a; 41:159-66.
- Hoffmann S, Heisler E, Karpinsik S, Losse J, Thomas D, Siefken W, Ahr HJ, Vohr HW, Fuchs HW. Epidermal-skin-test 1000 (EST-1000). A new reconstructed epidermis for *in vitro* skin corrosivity testing. *Toxicol In Vitro* 2005b; 19(7):925-9.
- Hostynek JJ. Alternatives to animal testing for contact allergy. *Cosmet Toilet.* 1998; 113(5):33-7.
- Indans I. The use and interpretation of *in vitro* data in regulatory toxicology: cosmetics, toiletries and household products. *Toxicol Lett.* 2002; 127:177-82.
- ICCVAM. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods. ICCVAM minimum performance standards: *in vitro* skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) tests for skin corrosion. The ICCVAM Dermal Corrosivity and Irritation Working Group Proposed, 2003.
- ICCVAM. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods. Guidance document on using *in vitro* data to estimate *in vivo* starting doses for acute toxicity. National Toxicology Program (NTP). Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM), 2001.
- INCQS. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Metodologia oficial vigente para irritação ocular, 1997.

- Jackson EM. Substantiating the safety of fragrances and fragranced products. *Cosmet Toilet*. 1993; 108(6):43-6.
- Jackson EM. Toxicological aspects of percutaneous absorption. *Cosmet Toilet*. 1990; 105(9):135-47.
- Katoulis AC, Kakepis EM, Kintziou H, Kakepis ME, Stavrianeas NG. Comedogenicity of cosmetics: a review. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 1996; 7(2):115-9.
- Kay JH, Calandra JC. Interpretation of eye irritation test. *J Soc Cosmet Chem*. 1962; 13:289.
- Kligman AM, Kwong T. An improved rabbit ear model for assessing comedogenic substances. *Br J Dermatol*. 1979; 100:699-702.
- Lachapelle JM. Toxicidade orgânica e geral. In: Pruniéras M. *Manual de cosmetologia dermatológica*. 2.ed. São Paulo: Andrei; 1994.
- Leonardi GR. *Cosmetologia aplicada*. São Paulo: Medfarma; 2004.
- Loprieno N, Bruner LH, Carr GJ, Chamberlain M, Cottin M, Silva O, Kato S. Alternatives in cosmetics testing. *Toxicol In Vitro* 1995; 9(6):827-38.
- Liebsch M, Spielmann H. Currently available *in vitro* methods used in the regulatory toxicology. *Toxicol Lett*. 2002; 127:127-34.
- 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.
- Marona HRN, Lucchesi MBB. Protocol to refine intestinal motility test in mice. *Lab Anim*. 2004; 38:257-60.
- MERCOSUR. Mercado Común del Sur. Resoluciones del Grupo Mercado Común. MERCOSUR/GMC/RES n° 19/05. Programa de cosmetovigilancia en el área de productos de higiene personal, cosméticos y perfumes. LVIII GMC – Asunción, 09/VI/05. [citado 2009 mar 06]. Disponible en: <http://www.Mercosur.Int/msweb/portal%20intermediario/pt/publica/bo.html>.
- MERCOSUR. Mercado Común del Sur. Resoluciones del Grupo Mercado Común. MERCOSUR/GMC/RES n° 26/04. Requisitos técnicos específicos para productos de higiene personal, cosméticos y perfumes. LV GMC – Brasilia, 08/x/04. [citado 2009 mar 06]. Disponible en: <http://www.mercosur.int/msweb/portal%20intermediario/pt/publica/bo.html>.
- Meyer O. Testing and assessment strategies, including alternative and new approaches. *Toxicol Lett*. 2003; 140/141:21-30.
- Mills OH, Klingman AM. Acne detergicans. *Arch Dermatol*. 1975; 111(1):65-8.
- Montalvo RV, Melchor G, Viviana BP, Sardiñas IG, Hurtado YV. Potencial fototóxico de una preparación obtenida del mangle rojo. 2005. [citado 2008 set 23]. Disponible en: http://www.bvs.sld.cu/revistas/pla/vol8_2_03/pla06203.htm.
- Nigan PK. Adverse reactions to cosmetics and methods of testing. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2009; 75(1):10-18.
- Pinto TJA, Kaneko TM, Ohara MT. Controle biológico de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos. São Paulo: Ateneu; 2003.
- Pires-de-Campos MSM, Leonardi GR, Chorilli M, Spadari-Bratfisch RC, Polacow MLO, Grassi-Kassisse DM. The effect of topical caffeine on the morphology of swine hypodermis as measured by ultrasound. *J Cosmet Dermatol*. 2008; 7:232-7.
- Polacow MLO, Pires-de-Campos MSM, Leonardi GR, Carvalho LS, Ribeiro MCAP, Montebelo MIL. Efeito do ultra-som na permeação cutânea do tiratricol: análise histológica. *Rev Bras Fisioter*. 2004; 8(1):53-60.
- Politi FAS, Pietro RCLR, Salgado HRN. Caracterização de biotérios, legislação e padrões de biossegurança. *Rev Ciênc Farm Básica Apl*. 2008; 29(1):17-28.
- Ponec M. *In vitro* cultured human skin cells as alternatives to animals for skin irritancy screening. *Int J Cosmet Sci*. 1992; 14:245-64.
- Presgrave OAF, Alves EN, Presgrave RF, Ferreira TCG, Delgado IF. Uso da membrana corioalantóide de ovo embrionado (HET-CAM) em substituição ao teste de irritação ocular em coelhos (Draize) na avaliação do potencial tóxico de produtos cosmético. In: *Anais do Congresso Brasileiro de Cosmetologia*, 2004, São Paulo – SP. São Paulo: ABC, 2004. p.1-5.
- Pruniéras M. *Manual de cosmetologia dermatológica*. 2.ed. São Paulo: Andrei; 1994. 397p.
- Qin C, Gao J, Wang L, Zeng L, Liu Y. Safety evaluation of short-term exposure to chitoooligomers from enzymic preparation. *Food Chem Toxicol*. 2006; 44:855-61.
- Regerol SO, Lugão AB, Ikeda TI, Cruz AS. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. *Mat Res*. 2003; 6(3):317-20.
- Romanowski P, Schueller R. Fundamentals of cosmetic product safety testing. *Cosmet Toilet*. 1996; 111:79-86.

- Russel WMS, Burch RC. The principles of humane experimental technique. London: Methuen; 1959.
- Soni MG, Carabin IG, Burdock GA. Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens). Food Chem Toxicol. 2005; 43:985–1015.
- Soni MG, Taylor SL, Greenberg NA, Burdock GA. Evaluation of the health aspects of methyl paraben: a review of the published literature. Food Chem Toxicol. 2002; 40:1335-73.
- Soni MG, Burdock GA, Taylor SL, Greenberg NA. Safety assessment of propyl paraben: a review of the published literature. Food Chem Toxicol. 2001; 39:513-32.
- Sparacio RM. Noninvasive evaluations of cosmetic products. Cosmet Toilet. 1996; 111(11):47-51.
- Stitzel KA, Spielmann H, Griffin G. The international symposium on regulatory testing and animal welfare: recommendations on best scientific practices for acute systemic toxicity testing. ILAR J. 2002; 43:s108-11.
- Viglioglia PA, Rubin J. Cosmiatria II; ciencia que comprende la atenci3n cosm3tica de la piel sana o enferma. Buenos Aires: AP Americana de Publicaciones; 1991. 406p.
- Vinardell MP, Mitians M. Alternative methods for eye and skin irritation tests: an overview. J Pharm Sci. 2008; 97(1):46-59.
- Yan X, Piferski C, Nitka S. Evaluation of the hen's egg test-chorioallantonic membrane (CAM) method in prediction of the eye irritation potential formulated personal wash products. Cutan Ocul Toxicol. 2007; 26(1):25-36.
- Worth A, Balls M. The principles and procedures of validation. ATLA 2002; 30(Suppl.1):13-9.