

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE FORMIGA – UNIFOR-MG
CURSO DE ENGENHARIA QUÍMICA
POLIANY SILVA CAMPOS

METODOLOGIAS ALTERNATIVAS AO USO DE TESTES *IN VIVO* EM
AVALIAÇÕES DE PRODUTOS COSMÉTICOS

FORMIGA – MG
2019

POLIANY SILVA CAMPOS

METODOLOGIAS ALTERNATIVAS AO USO DE TESTES *IN VIVO* EM
AVALIAÇÕES DE PRODUTOS COSMÉTICOS

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao Curso de Engenharia
Química do UNIFOR-MG, como requisito
parcial para obtenção do título de bacharel
em Engenharia Química.
Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Duarte Silva.

FORMIGA – MG

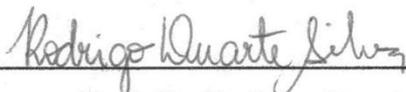
2019

Polianny Silva Campos

METODOLOGIAS ALTERNATIVAS AO USO DE TESTES *IN VIVO* EM
AVALIAÇÕES DE PRODUTOS COSMÉTICOS

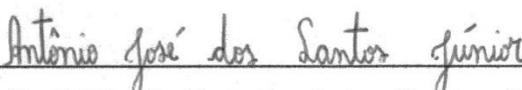
Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao Curso de Engenharia
Química do UNIFOR-MG, como requisito
parcial para obtenção do título de bacharel
em Engenharia Química.

BANCA EXAMINADORA



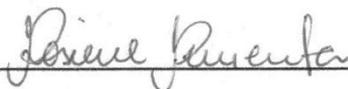
Prof. Dr. Rodrigo Duarte Silva

Orientador



Prof. Me. Antônio José dos Santos Júnior

UNIFOR-MG



Profa. Rosiene Gonzaga de Jesus Pimenta

UNIFOR-MG

Formiga, 05 de novembro de 2019

RESUMO

Cosméticos são produtos de uso externo, produzidos a partir de substâncias naturais ou sintéticas, com função de limpar, perfumar, melhorar a aparência e corrigir odores corporais. A eficácia de produtos cosméticos é dependente da penetração destes nas camadas da pele, sem causar irritação, sensibilidade, sensação de desconforto ou efeito sistêmico. Para que uma substância possa ser utilizada na fabricação de produtos cosméticos, é necessário provar que ela não será prejudicial. Baseada na legislação europeia, a ANVISA segue uma ampla lista de substâncias controladas. Entretanto, substâncias proibidas na Europa ainda são utilizadas no Brasil com determinadas restrições como os ftalatos, o formol, o triclosan e os parabenos. O produto cosmético deve ser seguro nas condições normais e previsíveis de uso, e, para isso, uma série de testes deve ser realizada. Mediante a vasta gama de metodologias para os testes de segurança dos produtos cosméticos, ensaios biológicos vêm sendo muito utilizados atualmente. Com o intuito de minimizar o sofrimento causado aos animais de laboratório, têm-se buscado a validação de metodologias alternativas eficazes na determinação da toxicidade e na garantia de segurança dos cosméticos e produtos correspondentes, baseando-se no princípio dos 3 R's. Dos animais que mais se assemelham biologicamente com o ser humano o porco e o macaco se sobressaem, porém, os testes são feitos com animais comuns e de fácil manuseio, encontrados em laboratório, como ratos e coelhos. Métodos alternativos são aceitos desde que comprovem a segurança do produto cosmético, mas em situações específicas utilizam testes *in vivo* para demonstração real do efeito do produto em um organismo vivo. Nenhum método individual é capaz de substituir o uso completo de testes em animais, mas uma combinação estratégica de métodos como teste *in vitro*, modelos computacionais e estudos clínicos pode levar à completa substituição de testes *in vivo*. Nesse contexto, o presente trabalho apresenta uma revisão bibliográfica sobre a substituição de testes cosméticos *in vivo*, pela utilização de testes alternativos que comprovem a eficácia e a segurança dos produtos cosméticos.

Palavras-chave: Segurança dos produtos cosméticos. Metodologias *in vivo*. Testes alternativos.

ABSTRACT

Cosmetics are products for external use, made from natural or synthetic substances, with the function of cleaning, perfuming, improving the appearance and correcting body odors. The effectiveness of cosmetic products depends on their penetration into the skin layers without causing irritation, sensitivity, discomfort or systemic effect. In order for a substance to be used in the manufacture of cosmetic products it must be proved that it will not be harmful and, based on European legislation, ANVISA follows a broad list of controlled substances. Illegal substances include phthalates, formaldehyde, triclosan and parabens, allowed in Brazil under certain restrictions. The cosmetic product must be safe under normal and foreseeable conditions of use, and for this a series of tests must be performed. Through the wide range of methodologies for the safety testing of cosmetic products, biological assays have been widely used today, but in order to minimize the suffering caused to laboratory animals, the validation of alternative effective methodologies in determining toxicity and the safety assurance of cosmetics and related products, based on the principle of 3 R's. Of the animals that most resemble biologically with humans, the pig and the monkey stand out, but the tests are done with common and easy-to-handle animals found in the laboratory, such as mice and rabbits. Alternative methods are accepted as long as they prove the safety of the cosmetic product, but in specific situations they use in vivo testing to actually demonstrate the effect of the product on a living organism. No single method can replace the full use of animal testing, but a strategic combination of methods such as in vitro testing, computer models and clinical studies can lead to the complete replacement of in vivo testing. In this context, the present work presents a bibliographic review about the substitution of in vivo cosmetic tests, using alternative tests that prove the efficacy and safety of cosmetic products.

Keywords: Safety of cosmetic products. In vivo methodologies. Alternative tests.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - As maiores empresas globais de beleza	20
Gráfico 2 - Número de animais utilizados em pesquisa no Brasil no ano de 2016....	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Top 10 consumidores de HPPC	18
Tabela 2 - Consumo per capita 2018	18
Tabela 3 - Top 10 consumidores de HPPC – América Latina	19
Tabela 4 - Top 5 do setor de cosméticos no Brasil	19

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação dos cosméticos	17
Quadro 2 - Exemplos das classificações.....	17

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C	Antes de Cristo
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BCOP	Permeabilidade e Opacidade de Córnea Bovina
CATEC	Câmara Técnica de Cosméticos
CADD	<i>Computer-aided Drug Design</i>
CEUA	Comissão Ética no Uso de Animais
CIUCA	Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
HET-CAM	Membrana Corioalantóide
HPPC	Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos
IARC	Agência Internacional de Pesquisa em Câncer
ICE	Olho Isolado de Galinha
MS	Ministério da Saúde
MTT	<i>Diphenyl Tetrazolium Bromide</i>
nm	Nanômetro
NRU	<i>Neutral Red Uptake</i>
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
RBC	<i>Red Blood Cell</i>
QSAR	<i>Quantitative Structure-activity Relationship</i>
QSTR	<i>Quantitative Structure-toxicity Relationship</i>
SAR	<i>Structure-activity Relationship</i>
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	13
2.1	Objetivo geral.....	13
2.2	Objetivos específicos.....	13
3	METODOLOGIA.....	14
4	REFERENCIAL TEÓRICO	15
4.1	A história dos cosméticos	15
4.1.1	Definição	16
4.1.2	Classificação.....	16
4.1.3	Cosméticos no Brasil	17
4.1.4	Marcas de maior expressão no Brasil e no mundo	19
4.2	Substâncias químicas ilegais na formulação de produtos cosméticos	20
4.3	Regularização de produtos cosméticos	22
4.4	Risco cosmético	23
4.5	Segurança do produto cosmético.....	23
4.6	Experimentação <i>in vivo</i>	24
4.6.1	Teste de irritação cutânea	27
4.6.2	Teste de irritação ocular	27
4.6.3	Teste de fototoxicidade.....	28
4.6.4	Teste de sensibilidade cutânea.....	28
4.7	Legislação	29
4.8	Princípio dos 3 R's	30
4.9	Métodos alternativos.....	30
4.9.1	Experimentação <i>in vitro</i>	31
4.9.1.1	Teste de irritação cutânea	32
4.9.1.2	Teste de irritação ocular	33
4.9.1.3	Teste de fototoxicidade.....	33
4.9.1.4	Teste de permeação e retenção cutânea.....	34
4.9.2	Simulações computacionais	34
4.9.3	Ensaio clínicos.....	35
4.10	Substituição dos testes <i>in vivo</i> por metodologias alternativas	35

4.11	Teste de penetração cutânea <i>in vitro</i> através da utilização de um modelo de biomembrana alternativo	37
4.12	Desenvolvimento de uma epiderme equivalente para substituição de testes de cosméticos <i>in vivo</i>	37
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	39
	REFERÊNCIAS.....	40

1 INTRODUÇÃO

Os produtos cosméticos são usados pelo homem desde épocas remotas, com objetivo de atender aos conceitos culturais. Inicialmente, as fontes de seus ingredientes eram essencialmente plantas, animais e minerais. No entanto, o avanço tecnológico resultou na inclusão de muitas substâncias químicas sintéticas na formulação de tais produtos.

Para que uma substância possa ser utilizada na fabricação de produtos cosméticos, é necessário provar que ela não seja prejudicial e para isso, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) disponibiliza regularizações como as resoluções 47 e 48 de 2006, e as resoluções 03, 29 e 44 de 2012.

Baseada na legislação europeia, a ANVISA segue uma ampla lista de substâncias controladas, e dentre as substâncias ilegais em países como Europa e EUA, mas permitidas no Brasil, sob restrição, destacam-se os ftalatos, o formol, o triclosan e os parabenos.

Na prática os cosméticos são raramente associados com danos à saúde. Entretanto, é extremamente necessário garantir a segurança e eficácia dos mesmos, através do controle de toxicidade do produto final e de cada ingrediente individual. A experimentação animal tem sido utilizada como meio de determinação da eficácia e segurança de diversas substâncias e produtos.

Na área cosmética, animais como ratos e coelhos são utilizados para avaliar irritação, alergia ou efeitos sistêmicos a curto e longo prazo. Os animais de laboratório deverão ser utilizados sempre que não existirem métodos alternativos válidos que os substituam. Entretanto, desde que seja obrigatória a utilização destes, deve-se zelar para que os mesmos não sofram dores ou vivenciem angústias durante o período experimental. As regras para o uso de animais em pesquisa são definidas pela Lei 11.794 de 2008, e pelos comitês de éticas em pesquisa com animais.

Com base no princípio dos 3R's (refinamento, redução e substituição), diversos métodos alternativos para avaliação da segurança e eficácia de produtos cosméticos vêm sendo desenvolvidos e validados para que os produtos cheguem ao consumidor de forma segura, sem a necessidade de testes *in vivo*.

No Brasil, não há exigência expressa para o uso de animais em testes de cosméticos, mas exige-se a apresentação de dados que comprovem a segurança dos diversos produtos registrados na ANVISA. Métodos alternativos são aceitos

desde que sejam capazes de comprovar a segurança do produto, mas em determinadas situações os testes *in vivo* ainda são indispensáveis para demonstrar os efeitos do produto no organismo vivo como um todo.

Modelos computacionais, sistemas *in vitro*, ensaios clínicos, modelos *ex vivo* e modelos tridimensionais, são exemplos de métodos alternativos com grande potencial para substituição de testes em animais. Nenhum método alternativo individual é capaz de substituir o uso completo de testes em animais, mas uma combinação estratégica de diversos métodos pode levar à completa substituição de testes *in vivo*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral do trabalho foi realizar uma revisão bibliográfica sobre a utilização de testes alternativos em substituição aos testes *in vivo* usados para a certificação de produtos cosméticos.

2.2 Objetivos específicos

- Relatar a história e evolução dos cosméticos;
- Abordar conceitos gerais referentes ao tema, como a definição e a classificação dos cosméticos;
- Discutir sobre o risco cosmético e medidas de segurança;
- Expor os testes experimentais *in vivo* e a legislação pertinente ao uso de animais em testes de laboratório;
- Revisar bibliografias que explanem a utilização de testes alternativos em substituição a utilização de testes *in vivo*.

3 METODOLOGIA

Este trabalho caracteriza-se como uma revisão bibliográfica de caráter exploratório, descritivo e qualitativo, no qual adotou-se um levantamento bibliográfico fundamentado em livros, artigos, revistas, dissertações, teses e monografias, disponibilizadas pelo Scielo e Google Acadêmico, abordando a utilização de testes alternativos em substituição aos testes em animais para comprovação da eficácia e segurança de produtos cosméticos.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 A história dos cosméticos

A palavra cosméticos vem do grego “*kosmétikos*”, originada da palavra “*kosmos*” que significa algo organizado, harmonioso e em equilíbrio (SARTORI; LOPES; GUARATINI, 2011).

A intenção de ficar belo ou bem apresentável à sociedade vem desde a pré-história. Então pode-se dizer que os cosméticos participaram da evolução do homem. Existem registros da era pré-histórica onde as mulheres utilizavam pigmentos extraídos de frutas como a amora para se embelezar (SOUZA, 2005). No Egito foram encontrados recipientes com materiais utilizados como produtos de beleza, com cerca de 5000 anos. Para colorir as palmas das mãos, os pés e os cabelos, os egípcios extraíam o corante das folhas de henna (QUIROGA; GUILLOT, 1995).

Claudius Galen fez sua própria pesquisa científica por volta do ano 180 da era cristã. Ele manipulou produtos cosméticos criando a era galênica dos produtos químico-farmacêuticos. Ele desenvolveu um produto chamado *Unguentum Refrigerans*, o renomado *cold cream* feito com cera de abelha e bórax. Foram encontrados no sarcófago do rei Tutankanon em 1.400 a.C. cremes, incensos, óleos e potes de azeite, utensílios para pintura e tratamento do corpo. A rainha do Egito, Cleópatra se banhava com leite de cabra para manter sua pele macia e suave, e se tornou símbolo da cosmetologia, devido à sua vaidade (LEONARDI, 2008).

Na segunda metade do século XX, ocorreu uma mudança nos laboratórios, com exigências governamentais sobre a qualidade e segurança do uso dos produtos. Além de se provar a eficácia prometida, também se tornou necessário esclarecer ao consumidor os cuidados necessários para a pele conforme suas características biológicas (FAÇANHA, 2003).

O desenvolvimento da química cosmética aconteceu antes e depois da Segunda Guerra, onde a aplicabilidade de surfactantes gerou a fabricação de cremes com a mistura de componentes oleosos e aquosos de forma mais duradoura (SANTOS *et al.*, 2013).

4.1.1 Definição

Cosmético era o nome usado para substâncias naturais designadas a promover brilho e maciez ao cabelo. Após a Primeira Guerra, o nome cosmético passou a ter um significado extenso e o seu poder sobre os produtos de beleza se expandiu, sendo utilizado também na hidratação da pele, unhas e dedos (BARATA, 2003).

Atualmente, segundo a Câmara Técnica de Cosméticos (CATEC), na resolução de 14 de julho de 2005, define-se cosméticos como sendo produtos de higiene pessoal preparados com substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo em diversas partes do corpo, como a pele, o couro cabeludo, as unhas e os lábios. O seu objetivo principal é limpar, perfumar, melhorar a aparência e corrigir odores corporais (SEBRAE, 2008).

Cosméticos são produtos que, quando utilizados no corpo humano, transformam o seu aspecto sem danificar a sua estrutura ou função. Quando o cosmético afeta de maneira considerável a funcionalidade da pele, denomina-se cosmocêutico, ou seja, um cosmético com benefícios de um produto farmacêutico. Legalmente não existe a categoria de produtos cosmocêuticos (RIBEIRO, 2010).

Com a colaboração e o auxílio da farmacologia, dermatologia, histologia, anatomia, fisiologia, microbiologia, bioquímica, química e física, a ciência cosmética vem progredindo. Sua tecnologia tem sido extraída na maioria das vezes de outros segmentos industriais, especialmente o farmacêutico (LEONARDI, 2008).

4.1.2 Classificação

De acordo com a Anvisa (2012), a classificação dos produtos de beleza foi estabelecida de acordo com a sua finalidade de uso, os efeitos indesejáveis devido ao seu uso inadequado, sua formulação, áreas do corpo a que se destinam e cuidados a serem observados quanto à sua utilização (QUADRO 1).

Quadro 1 - Classificação dos cosméticos

GRAU 1	GRAU 2
São produtos de higiene pessoal cosméticos e perfumes cuja formulação cumpre com os requisitos estabelecidos pela legislação vigente, que possuem as propriedades básicas ou elementares, cuja comprovação não seja necessária assim como informações detalhadas quanto ao modo de uso e suas restrições, devido às características intrínsecas do produto.	São produtos de higiene pessoal cosméticos e perfumes cuja formulação cumpre com os requisitos estabelecidos pela legislação vigente, que possuem indicações específicas, cujos atributos exigem comprovação de segurança, modo e restrições de uso, informações e cuidados.

Fonte: ANVISA, 2012a.

No QUADRO 2 são apresentados exemplos de cosméticos de acordo com a sua classificação.

Quadro 2 - Exemplos de cosméticos de acordo com as classificações

GRAU 1	GRAU 2
Água de colônia, água perfumada, perfume, extrato aromático, amolecedor de cutícula, batom e brilho labial, <i>blush/rouge</i> , creme loção, gel e óleo para o corpo (com finalidade exclusiva de hidratação e/ou refrescância), esmalte verniz, brilho para unhas, produtos para barbear.	Bloqueador solar, clareador da pele, condicionador anticaspa/antiqueda, depilatório químico, produto para área dos olhos (exceto maquiagens, hidratantes ou demaquilantes), fixador de cabelo infantil, esfoliante <i>peeling</i> químico.

Fonte: ANVISA, 2012a.

4.1.3 Cosméticos no Brasil

No Brasil, cosméticos, produtos de higiene e perfumes são composições formadas por substâncias naturais ou sintéticas de uso externo ao corpo humano, como pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais, dentes e membranas mucosas da cavidade oral, com o objetivo de limpá-los, perfumá-los, mudar a aparência e reparar odores corporais (LEONARDI, 2008).

Atualmente o Brasil enfrenta crises políticas e econômicas e ainda assim o mercado de beleza continua em alta, com previsão de crescimento para 2019. Em

relação a 2017, o setor de beleza obteve um crescimento de 2,77% em 2018 (DINO, 2018).

De acordo com a Euromonitor International (2019), em 2018, o Brasil se manteve na quarta posição do ranking mundial no consumo de produtos de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (HPPC) (TAB. 1).

Tabela 1 - Top 10 consumidores de HPPC

POSIÇÃO	PAÍS	US \$ BILHÕES	% PARTICIPAÇÃO
1°	EUA	89,5	18,3
2°	China	62	12,7
3°	Japão	37,5	7,7
4°	Brasil	30,3	6,2
5°	Alemanha	20,2	4,1
6°	Reino Unido	18,3	3,6
7°	França	15,3	3,1
8°	Índia	14,1	2,9
9°	Coréia do Sul	13,5	2,9
10°	Itália	11,8	2,4

Fonte: EUROMONITOR INTERNATIONAL, 2019.

Com relação ao consumo per capita, o Brasil se encontra na 33ª posição (TAB. 2).

Tabela 2 - Consumo per capita 2018

POSIÇÃO	PAÍS
1°	Hong Kong, China
2°	Noruega
3°	Suíça
4°	Japão
5°	Austrália
6°	EUA
7°	Reino Unido
8°	Coréia do Sul
9°	Suécia
10°	Dinamarca
33°	Brasil

Fonte: EUROMONITOR INTERNATIONAL, 2019.

Dentre os 10 países da América Latina com maior número de consumidores de HPPC, o Brasil ocupa a 1ª posição, com participação de 18,3% (TAB. 3).

Tabela 3 - Top 10 consumidores de HPPC – América Latina

POSIÇÃO	PAÍS	US \$ BILHÕES	% PARTICIPAÇÃO
1°	Brasil	89,5	18,3
2°	México	62	12,7
3°	Argentina	37,5	7,7
4°	Chile	30,3	6,2
5°	Colômbia	20,2	4,1
6°	Peru	18,3	3,6
7°	Venezuela	15,3	3,1
8°	Equador	14,1	2,9
9°	Guatemala	13,5	2,9
10°	Porto Rico	11,8	2,4
-	Outros	5,7	3,5

Fonte: EUROMONITOR INTERNATIONAL, 2019.

4.1.4 Marcas de maior expressão no Brasil e no mundo

Segundo a Euromonitor International (2019), a Natura está há dois anos no topo do ranking do setor cosmético no Brasil. A Unilever, em 2016, perdeu a liderança e em 2018, caiu mais uma posição, perdendo o segundo lugar para o Grupo Boticário (TAB 4).

Tabela 4 - Top 5 do setor de cosméticos no Brasil

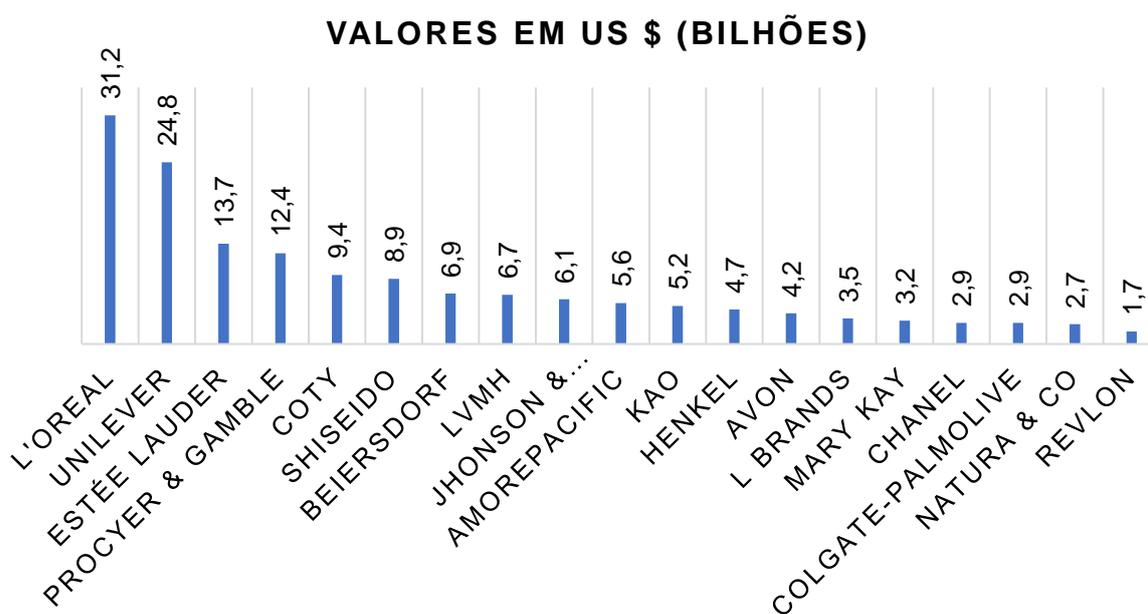
POSIÇÃO	NOMES
1°	Natura
2°	Grupo Boticário
3°	Unilever
4°	L’Oreal
5°	Colgate Palmolive

Fonte: EUROMONITOR INTERNATIONAL, 2019.

O mercado dos cosméticos no setor global está crescendo e poderá atingir US \$ 805,61 bilhões até 2023. O futuro da indústria dos cosméticos continuará sendo

promissor, e segundo a Euromonitor International (2019), um dos mercados mais auspiciosos é o da China, superando os EUA como o maior mercado do mundo para maquiagem e cuidados com a pele. Segundo a Orbis Research (2019), a Natura ocupa a 18° posição no ranking global, com um valor em vendas de US \$ 2,9 bilhões em 2017 (GRAF. 1).

Gráfico 1 - As maiores empresas globais de beleza



Fonte: COSMÉTICOSBR, 2018.

4.2 Substâncias químicas ilegais na formulação de produtos cosméticos

A fórmula dos cosméticos e produtos de higiene pessoal usados atualmente não é, ou não deveria ser, a mesma usada antigamente, pois muitos dos ingredientes usados livremente no passado hoje são proibidos, já que descobertas científicas relataram que tais ingredientes podem causar danos à saúde, como alergias e irritações (BBC, 2018).

A União Europeia tem uma lista rigorosa contendo mais de 1,3 mil substâncias proibidas, atualizada de acordo com as últimas análises referentes à segurança dos ingredientes. É preciso provar que uma substância não é prejudicial para que ela possa ser utilizada em produtos cosméticos. A ANVISA segue uma extensa lista de substâncias controladas, baseada na legislação europeia, mas nem sempre incorpora os avanços emergencialmente. Dentre as substâncias químicas consideradas ilegais

na formulação de produtos de higiene pessoal e cosméticos, destacam-se os ftalatos, o formol, o triclosan, e os parabenos (ÉPOCA NEGÓCIOS, 2018).

Os ftalatos são usados como agentes plastificantes em esmaltes, e como fixadores e estabilizantes em produtos desodorantes. Estudos internacionais concluíram que ambas as classes de ftalatos causam infertilidade masculina, asma e baixo desenvolvimento intelectual em crianças. No Brasil, embora existam vários ftalatos na lista de substâncias proibidas da ANVISA, nem todos são vetados. O ftalato de dibutila é autorizado em esmaltes em concentração de até 15%, porém é proibido em produtos infantis (BBC, 2018).

Em relação aos formaldeídos, a ANVISA tem uma regulação rígida que permite seu uso apenas como conservante, em uma concentração máxima de 0,2%. Em concentrações maiores que a permitida, o formol promove alisamento em cabelos, mas é considerado cancerígeno pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC). A exposição prolongada ao triclosan gera resistência bacteriana e alterações hormonais. No Brasil, a ANVISA permite uma concentração de até 0,3% de triclosan em produtos de higiene pessoal (ÉPOCA NEGÓCIOS, 2018).

Os parabenos são usados como conservantes, e a principal controvérsia sobre tal substância teve início com uma pesquisa que encontrou uma molécula de parabeno dentro de uma célula de câncer, mas o estudo nunca foi reproduzido e nunca se analisou se o parabeno veio de cosméticos ou de outras fontes. Apesar de não encontrar ligação direta entre parabenos e câncer, a União Europeia considera que também não há dados suficientes para garantir sua segurança, e proíbe uma série de substâncias dessa classe, como isopropilparabeno, isobutilparaben, fenilparabeno, benzilparabeno e pentilparabeno. Dos vetados na União Europeia, só o benzilparabeno e o pentilparabeno são proibidos como conservantes pela ANVISA (BBC, 2018).

A pele é o maior órgão do corpo humano e se encontra exposta a riscos de contaminação e infecção causadas por substâncias ou elementos existentes na composição química dos cosméticos, com ocorrência de reações alérgicas, irritações, eczemas e intoxicações. Por isso, a indústria cosmética tem o compromisso de expor produtos que prezem pela proteção da saúde populacional e que atendam as normas da ANVISA, apresentando dados comprobatórios que atestam a segurança e eficácia do produto, além de seguir as legislações de ingredientes atualmente existentes. Empresas que desrespeitem as regras deverão ser penalizadas (ÉPOCA NEGÓCIOS, 2018).

4.3 Regularização de produtos cosméticos

A Resolução RDC nº 47, de 16 de março de 2006, define a lista de filtros ultravioletas permitidos para produtos de higiene pessoais, cosméticos e perfumes.

Os filtros ultravioletas são substâncias que, quando adicionadas aos produtos para proteção solar, tem a finalidade de filtrar certos raios ultravioletas visando proteger a pele de certos efeitos danosos causados por estes raios. Estes filtros podem ser adicionados às formulações de produtos dentro dos limites e condições discriminadas (ANVISA, 2006a).

A Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2006, define a lista de substâncias que não podem ser utilizadas em produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. Segundo ANVISA (2006b), fica proibido o uso em produtos cosméticos das substâncias classificadas como cancerígenas, mutagênicas ou tóxicas para reprodução.

A Resolução RDC nº 03, de 18 de janeiro de 2012, aprova a lista de substâncias que os produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes não devem conter, exceto nas condições e com as restrições estabelecidas (ANVISA, 2012b).

A Resolução RDC nº 29, de 1 de junho de 2012, aprova a lista de substâncias de ação conservante permitidas para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes.

Conservantes são substâncias adicionadas como ingrediente aos Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes com a finalidade de inibir o crescimento de microorganismos durante sua fabricação e estocagem, ou para proteger os produtos da contaminação inadvertida durante o uso (ANVISA, 2012c).

A Resolução RDC nº 44, de 9 de agosto de 2012, aprova a lista de substâncias corantes permitidas para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. Segundo a ANVISA (2012d), os corantes deverão cumprir com as especificações de identidade e pureza estabelecidas pelos organismos internacionais de referência.

4.4 Risco cosmético

Segundo Sampaio e Rivitti (2007), o risco cosmético é a probabilidade de ocorrência de uma reação de irritação, sensibilização, sensação de desconforto ou efeito sistêmico.

A irritação é o processo inflamatório que ocorre na área de contato com o produto, podendo ocorrer após a primeira aplicação ou decorrer do uso contínuo. É definida por um dano tecidual agudo ou crônico de intensidade variável, dependendo da concentração dos ingredientes no produto final, da formulação geral, da quantidade aplicada, da frequência de uso e do modo de aplicação (SAMPAIO; RIVITTI, 2007).

Consoante Sampaio e Rivitti (2007), a sensibilização é o processo inflamatório que envolve o mecanismo imunológico, do tipo celular, com tempo de contato variável, até que o organismo reconheça os ingredientes alergênicos. Em geral não ocorre nas primeiras 12 horas, e pode ocorrer tanto em função dos ingredientes isolados, quanto da interação entre eles no produto final. Os sinais clínicos da irritação e da sensibilização são semelhantes, mas diferenciam-se pelo fato de a irritação ser dose dependente, e a sensibilização causar uma reação sempre que exposto aos ingredientes causadores.

As sensações de desconforto são caracterizadas por sintomas subclínicos que sinalizam uma irritação, ardência, coceira, dor, piqueteira. O efeito sistêmico é resultado da passagem de qualquer ingrediente do cosmético para a corrente sanguínea, independente da via de aplicação, e é avaliado a partir dos dados relativos aos ingredientes presentes (CASARETT; KLAASSEN; DOULL, 2008).

4.5 Segurança do produto cosmético

Independente do grau de risco que cada produto de beleza apresenta, este deve ser seguro. A segurança de um cosmético é, no entanto, a ausência razoável de risco de lesão ao uso, ou seja, entende-se que o produto não provoque danos significativos. Sabe-se que não existe 100% de segurança quanto a substâncias químicas, pois até mesmo a água, se administrada em quantidades inadequadas, pode ser prejudicial. Um consumidor pode utilizar vários produtos de beleza em um mesmo dia. Como essas substâncias entram em contato direto com o corpo, é de extrema importância garantir que o produto utilizado seja seguro. O responsável por

um produto de beleza deve empregar recursos técnicos e científicos capazes de diminuir possíveis danos aos usuários. Mediante a vasta gama de metodologias para os testes de segurança, cada empresa escolhe os métodos específicos a serem utilizados para determinados procedimentos (CHORILLI *et al.* 2006).

4.6 Experimentação *in vivo*

A experimentação animal tem servido, ao longo dos anos, como meio de determinação da eficácia e segurança de diversas substâncias e produtos, em diversas áreas (ANVISA, 2012a).

A experimentação animal auxilia na compreensão e estruturação de uma metodologia alternativa. As metodologias farmacológicas e toxicológicas baseiam-se nos efeitos nos organismos vivos, onde o experimento é feito a partir de técnicas bioquímicas para obtenção de dados qualitativos e quantitativos. Muitos animais podem ser utilizados nos experimentos, porém, para cada tipo de estudo, procura-se um animal específico. Esse tipo de experimento em animais já constava no *Corpus Hipocraticum* (350 a.C.), e nele havia dados de experimentação utilizando porcos. A padronização de antitoxina diftérica desenvolvida por Erlich, no fim do século XIX e a padronização da insulina da década de 20 contribuíram muito para o desenvolvimento dos estudos biológicos. Com o passar dos anos atribuiu-se métodos estatísticos os quais trouxeram junto de si níveis de significância de um resultado. Esses fatos estatísticos juntamente com outros métodos em estudo contribuem com a racionalização do uso de animais como cobaias em testes de cosméticos (PRESGRAVE, 2002).

Dos animais que mais se assemelham biologicamente com o ser humano o porco e o macaco se sobressaem. Porém, pelo tamanho e pela dificuldade de mantê-los em cativeiro e pelo espaço requerido para a criação e experimentação ser maior, os testes são feitos com animais comuns encontrados em laboratório, como ratos e coelhos (AUBIN, 1994).

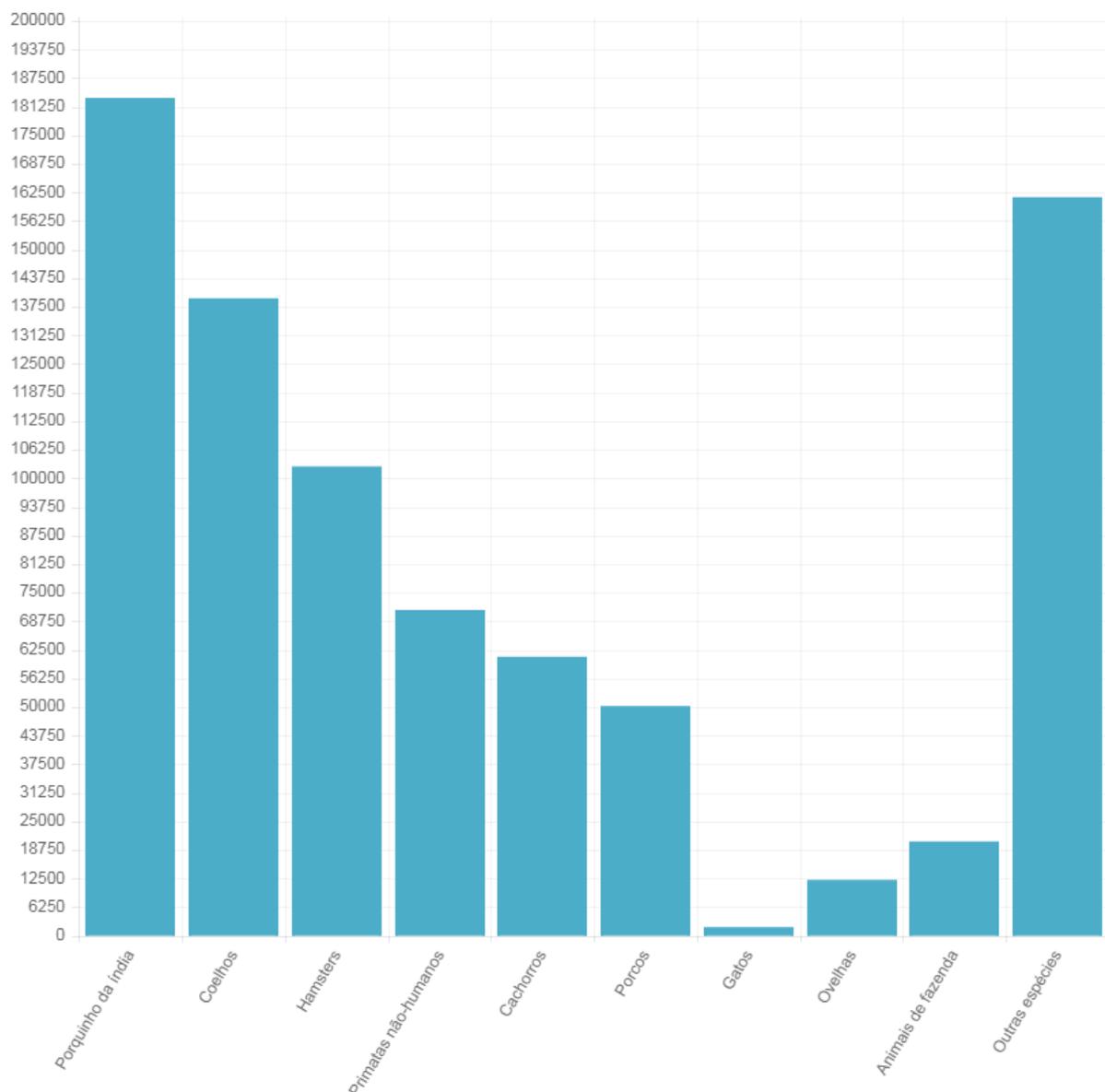
Os ratos e os coelhos apresentam uma pele diferente da pele humana em vários aspectos, mas apesar das diferenças, sua utilização é decorrente do baixo custo e da fácil obtenção dessas espécies (AUBIN, 1994; CHORILLI *et al.*, 2006; VIGLIOGLIA; RUBIN, 1991).

A princípio, qualquer animal pode servir à experimentação. Entretanto, tem-se procurado a utilização de um modelo que apresente melhor resposta a um determinado estímulo, seja por sua maior sensibilidade, facilidade de manejo e evidenciação do efeito ou por sua semelhança anatômica, fisiológica ou metabólica com o homem. Os animais de laboratório deverão ser utilizados sempre que não existam métodos alternativos validados que os substituam ou, em casos específicos, após *screening* com métodos *in vitro* e/ou matemáticos validados, precedendo, dessa forma, os estudos clínicos (PRESGRAVE, 2009).

Além de questionáveis do ponto de vista ético, os testes *in vivo* podem ser mais caros e menos eficientes, afinal, nem sempre os resultados observados em animais se aplicam ao ser humano (CERQUEIRA, 2008).

Estatísticas estimam que, em 2016, o número de animais utilizados em pesquisas, no Brasil, foi de 820.812. O GRAF. 2 mostra a divisão das diferentes espécies utilizadas. As estatísticas não incluem ratos, camundongos, pássaros ou peixes, já que esses animais não são protegidos por lei, embora sejam protegidos sob outros regulamentos (CONCEA, 2016).

Gráfico 2 - Número de animais utilizados em pesquisa no Brasil no ano de 2016



Fonte: Adaptado de CONCEA, 2016.

Apesar de contestadas, a experimentação animal ainda vem sendo amplamente utilizada em diversas áreas, incluindo pesquisa básica, avaliação de toxicidade para diferentes finalidades, controle de qualidade, entre outras. Entretanto, para que estes ensaios sejam realizados, diversos aspectos devem ser considerados, incluindo os que envolvem o uso ético destes animais. De acordo com a Lei 11.794/2008, os experimentos envolvendo animais devem ser aprovados por uma Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA (BRASIL, 2008; BRASIL, 2009). Na área cosmética, os animais podem ser utilizados para avaliar os riscos potenciais

envolvidos, seja irritação, alergia ou efeitos sistêmicos a curto e longo prazo (PAUWELS; ROGIERS, 2004).

4.6.1 Teste de irritação cutânea

O teste de irritação cutânea pode ser feito tanto em coelhos como em humanos. Para realização do teste é necessário medir a irritação com o auxílio de um teste epicutâneo realizado sobre a pele abrasada e sobre a pele intacta de no mínimo seis coelhos albinos com os pelos raspados na antevéspera do teste. Sobre a pele de cada coelho aplica-se três incisões paralelas de três cm de comprimento com uma agulha de injeção hipodérmica com a intenção de esquentar a camada córnea sem provocar sangramento. Para cada teste aplica-se 0,5 g das formulações a serem testadas, em seguida comprime-se a área com uma gaze. Após 24 e 72 horas é realizada uma análise de forma a se obter o sintoma de irritação cutânea, conforme a escala de Draize: discretamente irritado ≤ 2 , moderadamente irritado entre 2 e 5, e muito irritado ≥ 6 . Com cerca de 24 voluntários humanos, aplica-se a quantidade definida da amostra sobre qualquer superfície do copo cobrindo-a com gaze e seu efeito é analisado por 24 horas. O teste é repetido no mesmo local por 21 dias consecutivos, ileso de qualquer vermelhidão da pele. Se as irritações começarem no 10º dia o índice de irritação da substância é 10 (LACHAPELLE, 1994¹ *apud* CHORRILI *et al.* 2006).

4.6.2 Teste de irritação ocular

O teste embasa-se na inoculação da amostra teste, pura ou diluída, de acordo com o uso, no saco conjuntival de coelhos albinos. As leituras das lesões de conjuntiva, íris e córnea são realizadas nos dias 1, 2, 3 e 7 após a aplicação, podendo se prolongar até o 28º dia, seguindo a escala de Draize. Ingredientes ou produtos acabados com pH igual ou menor que 2, ou igual ou superior a 11,5 são considerados corrosivos e não devem ser avaliados (ANVISA, 2012a).

¹ LACHAPELLE, J. M. Toxicidade orgânica e geral. In: Pruniéras M. **Manual de cosmetologia dermatológica**. 2.ed. São Paulo: Andrei, 1994.

4.6.3 Teste de fototoxicidade

A fototoxicidade é uma reação aguda, que pode ser induzida por um simples tratamento com uma substância química e simultânea 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 (LACHAPELLE, 1994).

Pode-se utilizar neste teste camundongos, 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, a utilização de fonte de raios ultravioleta (UV) que não produz reação eritematosa parece adequada. 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 modificando a irradiação. Após o trabalho exploratório em animal, é necessário que seja realizado também o teste em peles humanas para melhor validação dos produtos (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003).

4.6.4 Teste de sensibilidade cutânea

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

O teste de sensibilidade é feito em porquinhos da índia ou camundongos, sendo que a substância de teste é injetada intradermicamente como emulsão a 0,1% em solução aquosa de cloreto de sódio a 0,9%. A injeção intradérmica de 0,05 mL é aplicada na região dorsal tricotomizada, repetindo-se a mesma dose, na mesma região, a cada 2 dias até completar 10 injeções, ao longo de três semanas (LACHAPELLE, 1994; BRASIL, 2002).

No 35º 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, 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 e a fase de

teste no grupo experimental são comparados. A incidência de resposta eritematosa é calculada, sendo que qualquer valor positivo indica sensibilização. 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).

4.7 Legislação

Na área cosmética, animais são utilizados para avaliar os riscos potenciais envolvidos, seja irritação, alergia ou efeitos sistêmicos a curto e longo prazo. Os animais de laboratório deverão ser utilizados sempre que não existam métodos alternativos validados que os substituam (AQUINO; SPINA; NOVARETTI, 2016).

A Portaria MS n. 1.480 (1990) determina que o setor de HPPC realize ensaios pré-clínicos em animais para irritação primária cutânea e ensaio de sensibilização. Cabe ressaltar que a utilização de animais deve, obrigatoriamente, seguir os preceitos do rigor científico e da ética que norteiam os desenhos experimentais com modelos biológicos, bem como, as normas de bioterismo preconizadas internacionalmente, dentro dos preceitos éticos, pelos guias internacionais, de forma a contribuir para o refinamento dos ensaios e a diminuição do sofrimento a que possam ser submetidos durante a realização de ensaios biológicos. As regras para o uso de animais em pesquisa não são definidas pela ANVISA e não são objeto de fiscalização da agência. Este tema é tratado na Lei 11.794, Lei Arouca, e pelos comitês de éticas em pesquisa com animais, ligados ao sistema de comitês de ética em pesquisa (ANVISA, 2012a).

Apesar de numerosos, os produtos cosméticos são formulados com um número razoavelmente restrito de ingredientes. Desta maneira, necessita-se dispor do melhor conhecimento possível de cada ingrediente utilizado, tanto no que diz respeito às suas características, bem como, a seus dados toxicológicos, levando-se em conta os vários riscos potenciais ligados ao uso cosmético. Esta medida é, com certeza, a melhor maneira de evitar problemas posteriores quanto ao comportamento do produto. A ANVISA publicou o guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos, onde são discriminados os testes necessários para comprovação de segurança de ingredientes para cosméticos (ANVISA, 2012a).

A ANVISA afirma que devem ser usados métodos substitutos aos animais nos testes feitos pelos laboratórios, porém, ainda exige testes a fim de registro de produtos

fabricados pela indústria. Atualmente, apesar de todos os esforços para a redução e substituição de animais de laboratório na experimentação biológica, ainda não é possível abandonar a utilização desses animais na avaliação da segurança de produtos, nos seus mais diversos aspectos. Outro aspecto importante diz respeito às condições ambientais e todas as regras básicas de bioterismo e manipulação de animais devem, obrigatoriamente, ser observadas (ANVISA, 2012a).

4.8 Princípio dos 3 R's

O termo 3 R's significa *refinement*, *reduction* e *replacement*, ou seja, refinamento, redução e substituição, sendo aplicado em pesquisas que mantenham a qualidade científica e minimizem a utilização de animais e o seu sofrimento. Esse princípio visa que, futuramente, possa ocorrer realmente a substituição total de testes *in vivo* (ANVISA, 2012a).

A redução estabelece que o número de animais utilizados em experimentos deve ser sempre o menor possível. Já o refinamento descreve que quando for de extrema necessidade o uso dos testes *in vivo*, este deve ser feito de modo a aliviar ou minimizar a dor, o sofrimento e o estresse dos animais utilizados. E por fim, a substituição abrange a necessidade da utilização de métodos alternativos que não utilizem animais como cobaias (SILVA, 2013).

Com base no princípio dos 3R's, diversos métodos alternativos para avaliação da segurança e eficácia de produtos cosméticos vêm sendo desenvolvidos e validados também para registro e comercialização, garantindo que os produtos cheguem ao consumidor de forma segura, sem a necessidade de testes *in vivo*.

4.9 Métodos alternativos

Segundo Presgrave (2002), para substituir, ou pelo menos diminuir a dor causada nos animais, foram criados métodos alternativos para testes de cosméticos:

- Uso de informação obtida no passado: devido a dados históricos em experimentação animal ou em seres humanos, determinados experimentos não têm necessidade de ser repetidos.
- Uso de técnicas físico-químicas: com o avanço da tecnologia e o conhecimento na área química, algumas substâncias que antigamente só

poderiam ser testadas em animais, hoje podem ser ensaiadas por métodos químicos ou físico-químicos.

- Uso de modelos matemáticos ou computacionais: método que se utiliza um banco de dados que pode prever ações de substâncias no organismo.
- Uso de organismos inferiores não classificados como animais protegidos: larvas de camarão ou pulga d'água são vistos como possibilidades de substituição ao uso de animais em laboratórios, utilizados em experimentos de ecotoxicologia, sendo uma proposta alternativa ao teste de irritação em coelhos.
- Uso de estágios iniciais do desenvolvimento de espécies animais protegidas: para substituir o teste de irritação ocular em coelhos seria o teste da membrana corioalantóide (HET-CAM), onde se utiliza o ovo embrionado aos nove dias, durante esse tempo não há o desenvolvimento do sistema nervoso do embrião.
- Uso de sistema *in vitro*: esse sistema pode ser considerado como uma substituição total ou parcial dos testes realizados em animais.
- Ensaios clínicos: a utilização de humanos não se destina ao estudo de toxicidade, mas de demonstrar a ausência da mesma, pois o ser humano só utiliza o produto depois do mesmo ter passado pelo método de teste *in vitro* e o teste animal cujos resultados negativos pressupõe que as probabilidades de toxicidade são mínimas.
- Uso de modelos *ex vivo*: biópsia de pele proveniente de cirurgias plásticas são cultivadas *in vitro* e compõe o modelo mais avançado com propriedades equivalentes à pele humana *in vivo* (GIBBS et al., 2002).
- Modelos tridimensionais: os modelos tridimensionais de reconstrução de pele e epiderme foram desenvolvidos para suprir a ausência do estrato córneo nas culturas em monocamadas cultivadas *in vitro* (CATARINO, 2015).

4.9.1 Experimentação *in vitro*

Devido à evolução técnico-científica, iniciou-se na década de 80 o desenvolvimento de modelos experimentais alternativos para a área cosmética, em substituição ao uso de animais de laboratório. Desenvolvidos inicialmente para

responder corretamente às necessidades de pesquisa em farmacologia, os métodos alternativos também foram contemplados para a avaliação de efeitos toxicológicos. Alguns destes métodos são utilizados desde tempos remotos, em particular na área da mutagenicidade. Também foram utilizados com sucesso para a demonstração de mecanismo de ação específico, sugerindo serem úteis e preditivos no que se refere a sistemas biológicos simples, como por exemplo, nos estudos feitos em microrganismos, células, tecidos e/ou órgãos de animais ou humanos (ANVISA, 2012a).

O uso de modelos *in vitro* permite reduzir o número de animais em testes cosméticos e também a redução do número de voluntários para os testes em fase avançada. Esses modelos são reprodutíveis e apresentam baixa variabilidade entre os ensaios, se comparado à variabilidade animal ou ao uso de modelos *ex vivo*. O modelo *in vitro* também permite a separação das diferentes células para avaliação individual (POUMAY; COQUETTE, 2007).

Tais modelos alternativos devem ser validados de acordo com os procedimentos internacionais na área de aplicação, para que sejam reconhecidos pelo meio científico e pelos órgãos regulatórios (BARILE, 2008; MANZINI, 2000).

Para que um modelo *in vitro* substitua um teste animal, este deve ser capaz de gerar dados comparáveis aos do modelo *in vivo* disponíveis. Além disso, o aspecto mais importante a ser considerado é o de gerar resultados que possam ser correlacionados com dados humanos. Um único teste *in vitro* não seria suficiente para suprir a necessidade de testes em animais, portanto, uma bateria de testes deve ser desenvolvida e utilizada em conjunto visando gerar resultados mais potentes (OECD, 2005).

4.9.1.1 Teste de irritação cutânea

A avaliação do potencial de irritação cutânea pode ser feita através do uso de métodos *in vitro* visando verificar a ação irritativa ou corrosiva de produtos e substâncias através do método de pele reconstituída (ANVISA, 2012a).

Os métodos de pele reconstituída podem ser usados como substitutos do teste de Draize ou como procedimento de *screening* antes de se executar o teste em animais. Estes métodos se baseiam na aplicação da amostra em substrato de pele

humana ou animal reconstituída, com posterior avaliação pela redução do *diphenyl tetrazolium bromide* (MTT).

4.9.1.2 Teste de irritação ocular

Por meio de um conjunto de métodos *in vitro* (permeabilidade e opacidade de córnea bovina (BCOP), olho isolado de galinha (ICE), HET-CAM, citotoxicidade pela difusão em gel de agarose, citotoxicidade pelo método do vermelho neutro, citotoxicidade pelo método do *neutral red uptake* (NRU), MTT, *red blood cell* (RBC)), agrupam-se informações que oferecem subsídios para garantir a segurança do produto a nível ocular (ANVISA, 2012a).

O objetivo do ensaio HET-CAM é avaliar o potencial irritante de um ingrediente sobre a membrana córneoalantóide de ovo embrionado de galinha, no décimo dia de incubação. O ensaio BCOP avalia o potencial irritante de um ingrediente após aplicação sobre a córnea isolada de bovino ou olho isolado de galinha, através da medida da opacidade e da permeabilidade após o contato com o produto teste. O ensaio RBC quantifica e avalia os efeitos adversos dos tensoativos empregados em produtos de higiene sobre a membrana plasmática das hemácias e a liberação da hemoglobina e, ainda, o índice de desnaturação da hemoglobina, avaliado através de sua forma oxidada, quantificados por espectrofotometria. A citotoxicidade pelo método NRU não pode ser empregada para formulações alcoólicas, e é avaliada utilizando-se uma cultura de células, adicionadas do corante vital vermelho neutro, onde a captação do corante pelas células viáveis é quantificada por espectrofotometria. Já a citotoxicidade pelo método MTT não é aplicável a produtos insolúveis em água, e é avaliada com a ajuda de um corante MTT, onde os parâmetros de avaliação observados são a porcentagem de morte celular e a concentração do produto que inibe 50% do crescimento celular (IC50) (NÓBREGA *et al.*, 2008).

4.9.1.3 Teste de fototoxicidade

Define-se o teste de fototoxicidade como uma resposta tóxica depois da primeira exposição da célula com agentes químicos e posterior exposição à irradiação. No que se refere à avaliação do risco alergênico e fotoalergênico ainda não existem testes *in vitro* (ANVISA, 2012a).

4.9.1.4 Teste de permeação e retenção cutânea

O objetivo do teste é avaliar *in vitro* a permeação e a retenção cutânea de uma molécula ativa. Obtém-se a membrana modelo a partir da pele da orelha do porco ou pele humana proveniente de cirurgia plástica (HAWKINS; REIFENRATH, 1986; WAGNER *et al.*, 2001).

Na grande parte dos casos, a permeação cutânea não pode ser evitada, entretanto pode ser modificada pelos ingredientes da formulação, por se tratar de uma interação físico-química entre o produto e a membrana de absorção, modulados pela camada córnea. Como modelo experimental *in vitro* e *in vivo* de penetração/permeação para formulações cosméticas, os estudos devem ser realizados em modelo de pele íntegra (ARRY, 1993; RIEGER, 1993, SCHAEFFER; REDELMEIER, 1996).

4.9.2 Simulações computacionais

A busca por métodos alternativos aos testes em animais vêm apresentando resultados satisfatórios, e as simulações de interações moleculares em computador minimizam o uso de cobaias e apontam para um futuro livre de testes *in vivo*. As simulações fazem estimativas sofisticadas sobre a probabilidade de uma substância ser perigosa, com base na sua semelhança com outras substâncias já existentes e conhecidas (FREIRE, 2015).

Os modelos computacionais, denominados métodos *in silico*, são capazes de prever as características de moléculas e a interação destas com proteínas conhecidas, além de dados toxicológicos. Incluídos nos métodos *in silico*, têm-se o SAR6 (correlação estrutura-atividade e identificação de grupos reativos), QSAR 2D (correlação quantitativa estrutura-atividade), QSAR 3D (considera a tipologia tridimensional), e QSAR 4D (considera as dinâmicas de interações) (PAIVA *et al.*, 2015).

Os métodos QSAR são os mais utilizados atualmente, especialmente no ramo da toxicologia, chamados QSTR (correlação quantitativa estrutura-toxicidade). Tais modelos podem prever *endpoints* contínuos ou categóricos (HARTUNG; HOFFMANN, 2009; WINKLER *et al.*, 2013).

Uma nova abordagem *in silico* denominada CADD (desenho de drogas feito por computador) leva em consideração a ligação da molécula ao receptor, pode prever ou melhorar o metabolismo, farmacocinética e toxicidade (KIEN; HELLER, 1967; SLIWOSKI *et al.*, 2014).

O sucesso de um método *in silico* depende exclusivamente da infraestrutura químico-informática que combine diversas fontes de dados para compreender a atividade biológica dos compostos. Esses sistemas estão em constante atualização, o que implica que novos dados devem ser continuamente incorporados ao sistema à medida em que novos conhecimentos estejam disponíveis (VEDANI; SMIESKO, 2009).

Os testes *in silico* ainda não eliminam a necessidade de experimentações com animais, mas reduzem a quantidade de substâncias a serem testadas *in vivo* (FREIRE, 2015).

4.9.3 Ensaios clínicos

Produtos cosméticos necessitam de estudos clínicos em humanos, para que as empresas ofereçam aos consumidores o máximo de segurança com o menor risco, garantindo as melhores condições de uso do produto. A partir das informações pré-clínicas, deve ser confirmada a evidência de segurança com o uso por humanos. Estas informações são importantes para estabelecer advertências de rotulagem e orientações para o serviço de atendimento ao consumidor. Os estudos clínicos com o objetivo de confirmação de segurança em humanos consistem em estudos de compatibilidade (condições maximizadas) e estudos de aceitabilidade (condições reais de uso). Há um valor preditivo nesses estudos, entretanto os resultados negativos não significam ausência total de eventuais reações nos usuários (BARAN; MAIBACH, 1994; MOSKONITZ, 1984).

4.10 Substituição dos testes *in vivo* por metodologias alternativas

Cada modelo alternativo é desenvolvido com um objetivo específico, e muitas vezes apresentam vantagens para determinado estudo, mas para outro apresentam limitações (POUMAY; COQUETTE, 2007).

No Brasil, os testes em animais não são proibidos, mas também não são obrigatórios, como na China. Segundo a ANVISA, não há exigência expressa para o uso de animais em testes de cosméticos, mas sim da apresentação de dados que comprovem a segurança dos diversos produtos registrados na agência. Métodos alternativos são aceitos desde que sejam capazes de comprovar a segurança do produto (ROSA, 2013).

Em junho de 1989, a Avon anunciou o término de todos os testes com animais em seus produtos, inclusive em laboratórios do exterior. No Brasil, O Boticário e a Natura baniram os testes em animais em 2000 e 2006. Entretanto, muitas empresas ainda testam cremes e maquiagem em animais a fim de avaliar riscos de reações alérgicas (CERQUEIRA, 2008).

Para avaliação da irritação cutânea e da corrosividade, não são mais necessários testes que expõem cobaias vivas ao produto, como coelhos. Esses testes podem ser feitos em pele humana reconstituída, ou seja, tecidos produzidos em laboratório por meio de cultura de células. Mas a aplicação desse método ainda apresenta um obstáculo para o Brasil, devido ao fato de o material utilizado na produção da pele ser importado e ter validade de apenas sete dias. Testes de permeação cutânea também podem funcionar com um sistema *in vitro*, envolvendo apenas a análise de células em laboratório. Testes de irritação ocular *in vivo* também podem ser substituídos, parcialmente, pela utilização de olhos de bois ou de galinhas que já foram abatidos para o consumo (LENHARO, 2013).

Modelos computacionais também podem substituir testes *in vivo* na verificação da toxicidade de uma substância e na maneira com que essa será metabolizada pelo organismo. O teste *in silico* pode ser feito pela análise de moléculas através de programas de computador que permitem compará-las com dados referentes a outras moléculas. Alternativas ainda mais ambiciosas, como a simulação de um órgão completo, estão em desenvolvimento (PRESGRAVE, 2009).

Enquanto a adesão a tais alternativas é capaz de substituir o uso de animais em determinadas situações, os testes *in vivo* ainda são indispensáveis para demonstrar os efeitos do produto no organismo vivo como um todo (LENHARO, 2013).

Apesar das vantagens, nenhum método alternativo individual é capaz de substituir o uso completo de testes *in vivo*, pois cada método reproduz parcialmente a complexa resposta fisiológica que ocorre em um organismo vivo. Uma combinação

estratégica de diversos métodos alternativos tem maiores chances de levar à completa substituição de testes em animais (CERQUEIRA, 2008).

4.11 Teste de penetração cutânea *in vitro* através da utilização de um modelo de biomembrana alternativo

Baby *et al.* (2008b) desenvolveram e avaliaram a estabilidade de uma emulsão cosmética contendo rutina e propilenoglicol como promotor de penetração cutânea, e estudaram também a penetração e retenção cutânea *in vitro* empregando uma biomassa alternativa: muda de pele de cobra. A rutina é utilizada como antioxidante e também na prevenção da vulnerabilidade capilar. A penetração e retenção cutânea *in vitro* foram realizadas em células de difusão vertical com muda de pele de cobra da espécie *Crotalus durissus*. Estudos de penetração *in vitro* por intermédio da pele humana seriam o ideal, porém, a muda de pele de cobra se apresenta como estrato córneo puro, fornecendo barreira similar ao humano, e é obtida sem a morte do animal. O experimento durou cerca de seis horas e a emulsão não promoveu penetração cutânea da rutina através da pele de cobra utilizada como biomembrana alternativa. Em conclusão, a emulsão não favoreceu a penetração cutânea da rutina, mas favoreceu sua retenção no estrato córneo de *Crotalus durissus*, condição estável no período de 30 dias. O estudo mostrou, portanto, ser possível e viável a utilização de testes alternativos que não maltratem animais ou seres humanos.

4.12 Desenvolvimento de uma epiderme equivalente para substituição de testes de cosméticos *in vivo*

Catarino (2015) estudou o desenvolvimento de uma epiderme equivalente, com isolamento das células a partir de amostras de pele provenientes de cirurgia de postectomia doadas voluntariamente, e posterior otimização do processo através da incorporação de uma membrana biopolimérica como suporte celular, contribuindo para a geração de métodos alternativos que possam ser utilizados na avaliação do risco cosmético em substituição aos testes *in vivo*, avaliando *in vitro* a corrosão da pele.

O modelo de epiderme humana reconstruída consiste de um tecido epidérmico diferenciado tridimensionalmente a partir de queratinócitos humanos cultivados em

um meio quimicamente definido. A validação deste modelo para testes do potencial corrosivo de cosméticos foi realizada seguindo os princípios do Guia 431 da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD). Os resultados de viabilidade celular demonstraram que o modelo criado permite distinguir substâncias corrosivas e não corrosivas. No entanto, não permite a subcategorização das substâncias corrosivas. Assim, a epiderme equivalente pode ser utilizada como um método de teste relevante e confiável usado para pesquisa e investigação de risco químico.

Visando a otimização do modelo, a autora testou a incorporação de uma membrana biopolimérica como suporte para o crescimento celular. A análise histológica demonstrou que as membranas são biocompatíveis. Entretanto, não se observou uma diferenciação adequada com a formação de uma epiderme semelhante à humana. Além disso, a falta de uniformidade e reprodutibilidade nos resultados indicam que é necessária uma otimização dos processos de fabricação das membranas e geração do equivalente epidérmico.

Em conclusão, o equivalente epidérmico poderá ser utilizado para pesquisa e avaliação de risco cosmético, contribuindo para a geração de métodos alternativos aos testes em animais de laboratório.

5 CONCLUSÃO

Os ensaios biológicos são essenciais na avaliação da segurança de produtos cosméticos, usados de forma contínua e prolongada pelos consumidores. Por esse motivo e, devido à necessidade de substituição do uso de animais, é possível concluir a necessidade da validação de métodos alternativos com viabilidade comprovada.

No artigo de Baby *et al.* (2008b), os autores realizaram um teste de penetração cutânea através de um modelo *in vitro* de biomembrana alternativa com a utilização da muda de pele de cobra, obtida sem a morte do animal. Na dissertação de Catarino (2015), a autora desenvolveu uma epiderme equivalente, com isolamento das células a partir de amostras de pele provenientes de cirurgia de postectomia, doadas voluntariamente, para avaliar *in vitro* a corrosão cutânea. Em conclusão, os autores observaram a viabilidade da substituição do teste *in vivo* pela utilização do teste alternativo proposto.

Os métodos alternativos possuem potencial de substituição ao uso de animais em testes de laboratório, mas determinadas empresas de cosméticos insistem na utilização de testes *in vivo* para demonstração do efeito real do produto no organismo vivo como um todo.

Apesar das vantagens, nenhum método alternativo individual é capaz de substituir o uso completo de testes *in vivo*. Cada método reproduz parcialmente a complexa resposta fisiológica que ocorre em um organismo vivo, e uma combinação estratégica de diversos métodos alternativos tem maiores chances de levar à completa substituição de testes em animais.

REFERÊNCIAS

ALAM, Murad; GLADSTONE, Hayes B.; TUNG, Rebecca C. **Dermatologia cosmética**. Rio de Janeiro: Elsevier Editora LTDA., 2010.

ANVISA. **Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos**. 2ª ed. Brasília, 2012a. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/106351/107910/Guia+para+Avalia%C3%A7%C3%A3o+de+Seguran%C3%A7a+de+Produtos+Cosm%C3%A9ticos/ab0c660d-3a8c-4698-853a-096501c1dc7c>>. Acesso em: 19 set. 2019.

ANVISA. **Resolução n.º 03**, de 2012. 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” e dá outras providências. Ministério da Saúde, DOU n.º 15A, seção 1, p.2 (edição extra), jan. 2012b.

ANVISA. **Resolução n.º 29**, de 2012. Aprova o Regulamento Técnico Mercosul sobre “Lista de Substâncias de Ação Conservante permitidas para Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes” e dá outras providências. Ministério da Saúde, DOU n.º 107, seção 1, p. 81, jun. 2012c.

ANVISA. **Resolução n.º 44**, de 2012. Aprova o Regulamento Técnico Mercosul sobre "Lista de substâncias corantes permitidas para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes" e dá outras providências. Ministério da Saúde, DOU n.º 155, seção 1, p. 35, ago. 2012d.

ANVISA. **Resolução n.º 47**, de 2006. Aprovar o Regulamento Técnico “Lista de Filtros Ultravioletas Permitidos para Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes”, que consta como Anexo e faz parte da presente Resolução. Revogar a Resolução RDC n.º 161, de 11 de setembro de 2001. Ministério da Saúde, DOU n.º 53, seção 1, p. 60-61, mar. 2006a.

ANVISA. **Resolução n.º 48**, de 2006. Aprovar o Regulamento Técnico “Lista de Substâncias que não podem ser utilizadas em produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes”, que consta como anexo e faz parte da presente Resolução. Ministério da Saúde, DOU n.º 53, seção 1, p. 61, mar. 2006b.

AQUINO, S.; SPINA, G. A.; NOVARETTI, M. C. Z. A proibição do uso de animais em testes cosméticos no estado de São Paulo: impactos e desafios para o desenvolvimento da indústria de cosméticos e *stakeholders*. **Desenvolvimento em Questão**, Editora Unijuí, ano 14, n. 34, p. 155-188, abr./jun. 2016.

AUBIN, G. Experimentação biológica dos produtos cosméticos. In: PRUNIÉRAS, M. **Manual de cosmetologia dermatológica**. 2. Ed. São Paulo: Andrei; 1994.

ARRY, B.W. Vehicle effect: what is an enhancer? In: SHAH, V.P.; MAIBACK, H.I. (Ed.). **Topical drug bioavailability, bioequivalence and penetration**. New York: Plinim, cap. 14, p. 261 - 276, 1993.

BABY, A. R. *et al.* Estabilidade e estudo de penetração cutânea *in vitro* da rutina veiculada em uma emulsão cosmética através de um modelo de biomembrana alternativo. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 44, n. 2, p. 233-248, 2008b.

BABY, A. R. *et al.* Métodos biofísicos empregados na análise do estrato córneo. **Latin American Journal of Pharmacy**, Buenos Aires, v.27, n.1, p.124-130, 2008a.

BBC NEWS. **As substâncias produzidas na Europa e nos EUA e usadas pela indústria de cosméticos no Brasil**. out. 2018. Disponível em: <<https://g1.globo.com/mundo/noticia/2018/10/13/as-substancias-proibidas-na-europa-e-nos-eua-e-usadas-pela-industria-de-cosmeticos-no-brasil.ghtml>>. Acesso em: 05 out. 2019.

BARAN, R.; MAIBACH, H. I. **Cosmetic dermatology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.

BARATA, Eduardo A. F. **A cosmetologia princípios básicos**. São Paulo: Tecnopress Editora e Publicidade Ltda., 2003.

BARILE, Frank A. **Principles of toxicology testing**. Florida: Taylor and Francis Group, 2008.

BENTLEY, M. V. L. B. *et al.* The influence of lecithin and urea on the *in vitro* permeation of hydrocortisone acetate through skin hairless mouse. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v.146, n.2, p.255-262, 1997.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos**. 2002. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 18 set. 2019.

BRASIL. **Lei n. 11.794**, de 08 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII de parágrafo 1o do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei n. 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, de 09 de outubro de 2008, Brasília, Brasil: República Federativa do Brasil.

BRASIL. **Decreto n. 6.899**, de 15 de julho de 2009. Dispõe sobre a composição do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, estabelece as normas para o seu funcionamento e de sua Secretaria-Executiva, cria o Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais - CIUCA, mediante a regulamentação da Lei no 11.794, de 8 de outubro de 2008, que dispõe sobre procedimentos para o uso científico de animais, e dá outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, de 16 de julho de 2009, Brasília, Brasil: República Federativa do Brasil.

CASARETT, L. J.; KLAASSEN, C. D.; DOULL, J. **Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons**. New York: McGraw-Hill, 2008.

CATARINO, C. M. **Desenvolvimento de epiderme equivalente sobre membrana do tipo transwell e membrana biopolimérica**. 2015. 116 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, São Paulo, 2015.

CERQUEIRA, N. Métodos alternativos ainda são poucos e não substituem totalmente o uso de animais. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 60, n. 2, p. 47-49, 2008.

CHORILLI, Marlus *et al.* **Toxicologia dos cosméticos**. São Paulo: Latim American Journal of Pharmacy, 2006.

CONCEA. **Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica**. Brasília: Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, 1. ed. 93 p, 2016.

COSMÉTICOSBR. **As 20 maiores empresas globais de beleza**. 2018. Disponível em: <<http://www.cosmeticosbr.com.br/conteudo/article/as-20-principais-empresas-globais-de-beleza-tem-brasileira-na-lista/>>. Acesso em: 16 jun. 2019.

DINO. **Mercado da beleza prevê crescimento para 2019**. 2018. Disponível em: <<https://www.terra.com.br/noticias/dino/mercado-da-beleza-preve-crescimento-para-2019,370bb0c89535a4e08c3667103a4f7e289ygoati.html>>. Acesso em: 16 jun. de 2019.

ÉPOCA NEGÓCIOS. **As substâncias proibidas na Europa e nos EUA e usadas pela indústria de cosméticos no Brasil**. 2018. Disponível em: <<https://epocanegocios.globo.com/Economia/noticia/2018/10/substancias-proibidas-na-europa-e-nos-eua-e-usadas-pela-industria-de-cosmeticos-no-brasil.html>>. Acesso em: 22 out. 2019.

EUCERIN. **Entendendo a pele: estruturas e funções da pele**. Disponível em: <<https://www.eucerin.com.br/sobre-pele/conhecimentos-basicos-sobre-a-pele/estrutura-e-funcoes-da-pele>>. Acesso em: 18 set. 2019.

EUROMONITOR INTERNATIONAL. 2019. Disponível em: <<http://www.euromonitor.com/>>. Acesso em: 18 set. 2019.

FAÇANHA, Rosângela. **Estética Contemporânea**. Rio de Janeiro: Livraria Rubio Ltda, 2003.

FREIRE, D. Cientistas usam simulações para evitar testes em animais. **EXAME**, abr. 2015. Disponível em: <<https://exame.abril.com.br/ciencia/cientistas-usam-simulacoes-para-evitar-testes-em-animais/>>. Acesso em: 05 out. 2019.

GIBBS, S. *et al.* Effect of skin barrier competence on SLS and water-induced IL-1 alpha expression. **Experimental Dermatology**, v. 11, n. 3, p. 217-223, 2002.

GUY, R. H. *et al.* Iontophoresis: electrorepulsion and electroosmosis. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v.64, n.1/3, p.129-132, 2000.

HARTUNG, T.; HOFFMANN, S. Food for thought on in silico methods in toxicology. **Altex**, v. 26, n. 3, p. 155-166, 2009.

HAWKINS, G. S.; REIFENRATH, W. G. Influence of skin source, penetration cell fluid, and, partition coefficient on *in vitro* skin penetration. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 75, p. 378–381, 1986.

KIEN, G. A.; HELLER, F. N. Simulation of biologic systems by digital computer. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 48, n. 9, p. 456-462, 1967.

LACHAPELLE, J. M. Toxicidade orgânica e geral. In: Pruniéras M. **Manual de cosmetologia dermatológica**. 2.ed. São Paulo: Andrei, 1994.

LENHARO, M. **Veja testes que já não exigem cobaias e aqueles em que são necessárias**. G1: Ciência e Saúde. São Paulo, 2013. Disponível em: <<http://g1.globo.com/ciencia-e-saude/noticia/2013/10/conheca-testes-que-ja-nao-exigem-cobaias-e-aqueles-em-que-sao-necessarias.html>>. Acesso em: 06 out. 2019.

LEONARDI, Gislaine Ricci. **Cosmetologia aplicada**. São Paulo: Livraria e Editora Santa Isabel Ltda., 2008.

MOSER, K. *et al.* Passive skin penetration enhancement and its quantification *in vitro*. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Amsterdam, v.52, n.2, p.103-112, 2001.

MANZINI, J. **Declaración de helsinki**: principios éticos para la investigación médica sobre sujetos humanos. *Acta bioeth.* Santiago, v. 6, n. 2, dez. 2000.

MOSKONITZ, H. R. **Cosmetic product testing**: a modern psychophysical approach. New York: Marcel Dekker, 1984.

NAIK, A.; KALIA, Y. N.; GUY, R. H. Transdermal drug delivery: overcoming the skin's barrier function. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, Oxford, v.3, n.9, p.318-326, 2000.

NÓBREGA, A. M. *et al.* Avaliação da irritabilidade ocular induzida por ingredientes de cosméticos através do teste de Draize e dos métodos HET-CAM e RBC. **Ciências da Saúde**, Brasília, v. 6, n. 2, p. 103-120, jul./dez. 2008.

ORBIS RESEARCH. 2019. Disponível em: <<https://www.orbisresearch.com/>>. Acesso em: 22 out.2019.

OECD. Organisation for Economic Co-operation and Development. **Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated teste methods for hazard assessment**. Paris: OECD, 2005, 96 p. (OECD Séries on Testing and Assessment, n. 34), 2005.

PAIVA, D. S. *et al.* Análise da utilização de testes alternativos para avaliação de segurança de produtos cosméticos. **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório**, v. 3, n.1, p. 43-49, 2015

PAUWELS, M.; ROGIERS, V. Considerations in the Safety Assessment of Cosmetics. **Business Briefing**: Global Cosmetics Manufacturing, p.16- 17, 2004.

PINTO, T. J. A; KANEKO, T. M; OHARA, M. T. **Controle biológico de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. São Paulo: Ateneu; 2003.

POUMAY, Y.; COQUETTE, A. Modelling the human epidermis in vitro: tools for basic ad appliedresearch. **Archives of Dermatological Research**, v. 298, n. 8, p. 361-369, 2007.

PRESGRAVE; Octavio Augusto França. **Alternativas para animais de laboratório: do animal ao computador**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2002.

PRESGRAVE, O. A. F. Métodos alternativos. In: LAPCHIK, V. B. V.; MATTARAIA, V. G. M.; KO, G. M. (Org.). **Cuidados e manejo de animais de laboratório**. São Paulo: Atheneu, 2009.

QUIROGA, Marcial Ignacio; GUILLOT, Carlos F. **Dermatologia cosmética, clínica e terapêutica**. Buenos Aires: El Ateneo, 1955.

RIBEIRO, Cláudio de Jesus. **Cosmetologia aplicada a dermoestética**. São Paulo: Pharmabooks Editora, 2010.

RIEGER, M.M. Factors affecting sorption of topically applied substances. In: ZATZ, J.L. (Ed.). **Skin permeation: fundamentals and application**. Wheaton: Allured, Cap. 2, p. 33-72, 1993.

ROSA, G. Cientistas brasileiros pedem fim dos testes de cosméticos em animais. **Veja**, 2013. Disponível em: <<https://veja.abril.com.br/ciencia/cientistas-brasileiros-pedem-fim-dos-testes-de-cosmeticos-em-animais/>>. Acesso em: 06 out. 2019.

SAMPAIO, S.; RIVITTI, E. A. **Dermatologia**. 3. ed. São Paulo: Artes médicas, 2007.

SANTOS, Amanda Luizetto *et al.* **Cosmetologia**. São Caetano do Sul, São Paulo: Difusão Editora, 2013.

SARTORI, Lucas Rossi; LOPES, Roberto Peporine; GUARATINE, Thais. **A química no cuidado da pele**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 2010.

SCHAEFFER, H.; REDELMEIER, T. E. **Skin barrier, principles of percutaneous absorption**. Switzerland: Karger, 1996.

SEBRAE. **Cosméticos à base de produtos naturais**. Novembro de 2008.

SILVA, S. J. **Novas perspectivas na indústria cosmética com foco na redução do uso de animais e nos métodos alternativos**. 2013. 43 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

SLIWOSKI, G. *et al.* Computational methods in drug discovery. **Pharmacological Reviews**, v. 66, n.1, p.334-395, 2014.

SOUZA, Valéria Maria de. **Ativos dermatológicos**: guia de ativos dermatológicos utilizados na farmácia de manipulação para médicos e farmacêuticos. São Paulo: Pharmabooks, v. 2, 2005.

VEDANI, A.; SMIESKO, M. In silico toxicology in drug Discovery: concepts based on three-dimensional models. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 37, n. 5, p. 477-496, 2009.

VIGLIOGLIA P. A, RUBIN, J. Cosmiatria II. **Ciência que compreende la atención cosmética de la piel sana o enferma**. Buenos Aires: AP Americana de Publicaciones, 1991.

WAGNER, H. *et al.* Interrelation of permeation and penetration parameters obtained from *in vitro* experiments with human skin and skin equivalents. **Journal of Controlled Release**, v. 75, p. 283-295, 2001.

WINKLER, D. A. *et al.* Applying quantitative structure-activity relationship approaches to nanotoxicology: current status and future potential. **Toxicology**, v. 313, n. 1, p. 15-23, 2013.