



Toxicologia dos Cosméticos

Marlus CHORILLI ^{1,2*}, Maria Virgínia SCARPA ¹,
Gislaine Ricci LEONARDI ² & Yoko Oshima FRANCO ²

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas,
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Departamento de Fármacos e Medicamentos,
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho,
Rodovia Araraquara-Jaú, Km 1, 14801-902, Araraquara - SP, Brasil.

² Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Metodista de Piracicaba,
Rodovia do Açúcar, Km 156, 13400-911, Piracicaba - SP, Brasil.

RESUMO. Apesar de não ser desejável, os produtos cosméticos podem ocasionar alguns efeitos adversos ao usuário. Tais efeitos podem ser decorrentes de fatores individuais como também pelo uso inadequado. Logo, a avaliação de segurança deve preceder a colocação do produto cosmético no mercado. Uma vez que o produto cosmético é de livre acesso ao consumidor, o mesmo deve ser seguro nas condições normais ou razoavelmente previsíveis de uso. Historicamente, os testes de avaliação de segurança eram realizados com animais (*in vivo*); porém, atualmente, alguns centros de pesquisa estão adotando novas alternativas (*in vitro*) que visam a substituição dos testes com animais. Este artigo enfatiza a necessidade de realização de ensaios de toxicidade para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes, bem como apresenta os testes *in vivo* e *in vitro* utilizados abordando a necessidade de se aplicar métodos alternativos aos ensaios *in vitro* na avaliação de segurança dos mesmos.

SUMMARY. "Cosmetics Toxicology". Although not desirable, cosmetic products can cause some adverse effects in the user. Such effects can be due both to individual factors and by inadequate use. So, the safety evaluation must precede the placement of the cosmetic product in the market. Once the consumer has free access to cosmetic product, it must be safe in normal conditions or reasonably foreseeable of use. Historically the evaluation tests were accomplished with animals (*in vivo*) but, at the moment, some research centers have been adopting new alternatives (*in vitro*) in order to replace the tests with animals. This article emphasizes the necessity of accomplishing toxicity assays for personal hygiene products, cosmetics and perfumes, and also presents the tests *in vivo* and *in vitro* used, approaching the necessity of alternative methods to the assays *in vitro* in the evaluation of security of them.

INTRODUÇÃO

Cosméticos são preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano, pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membranas mucosas da cavidade oral, com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência, corrigir odores corporais e ou protegê-los ou mantê-los em bom estado. Os cosméticos, de acordo com os artigos 3º e 26º da Lei 6.360/76 ¹ e 3º, 49º e 50º do Decreto 79.094/77, podem ser enquadrados em quatro categorias: produtos de higiene, cosmético, perfume e produto de uso infantil. Pelo grau de risco que oferecem são classificados em grau 1 (produtos com risco mí-

nimo) e grau 2 (aqueles com risco potencial), visando a finalidade do uso do produto, áreas do corpo abrangidas, modo de usar e cuidados a serem observados quando de sua utilização ^{1,2}.

Apesar de não desejável, há relatos na literatura de reações adversas a cosméticos ^{3,4}. Viglioglia & Rubin ⁵ dividem as reações adversas a cosméticos em: reações irritativas: imediatas (ex: hidróxido de sódio) ou acumulativa (ex: tensoativos); reações alérgicas ou sensibilizantes: dermatite de contato (ex: por princípios ativos, veículos, conservantes) ou granuloma alérgico (ex: zircônio); dermatites por fotossensibilização: fototoxicidade ou fotoalergia; reações sistêmicas: por inalação (ex: fragrâncias) ou por absorção per-

PALAVRAS-CHAVE: Cosméticos, Métodos alternativos, Métodos *in vivo*, Toxicologia.

KEY WORDS: Alternative methods, Cosmetics, *In vivo* methods, Toxicity.

* Autor a quem correspondência deve ser enviada. E-mail: chorilli@fcfar.unesp.br

cutânea (ex: persulfato de amônio); reações físicas e outras: por oclusão (ex: foliculite por óleos); ação carcinogênica.

A irritação pode ser definida como intolerância local podendo corresponder a reações de desconforto, variando sua intensidade desde ardor, coceira e pinicação podendo chegar até a corrosão e destruição do tecido. Todas estas reações se restringem à área em contato direto com o produto ⁶.

A sensibilização corresponde a uma alergia, que é uma reação de efeito imediato (de contato ou urticária) ou tardio (hipersensibilidade). Ela envolve mecanismos imunológicos e pode aparecer em outra área diferente da área de aplicação, podendo se manifestar por eritema, edema e secreção com formação de crostas ⁵. O risco de alergia pode decorrer tanto em função dos ingredientes quanto do produto final ⁶.

Reações sistêmicas são reações resultantes da passagem de quaisquer substâncias do produto para a circulação sanguínea, diretamente por via oral, inalatória, transcutânea ou transmucosa, metabolizadas ou não ⁶. Já dermatites por fotosensibilização são reações adversas que ocorrem após exposição combinada de certos componentes à luz ⁵. Na grande maioria dos casos, as reações sistêmicas são avaliadas a partir dos dados relativos às matérias primas. Não se conhecem efeitos toxicológicos sistêmicos em produtos acabados que não sejam causados pelos próprios ingredientes. Portanto, é importante prever este tipo de risco para os produtos que eventualmente possam ser ingeridos ou inalados, ou aqueles destinados a uma população em particular (crianças, gestantes, etc). Assim, a maioria das informações necessárias na avaliação do risco potencial de um produto cosmético resulta do conhecimento dos ingredientes que compõem a formulação. São eles que podem ser os responsáveis por qualquer efeito sistêmico e por boa parte do risco alérgico. Contudo, a fórmula do produto acabado pode interferir, à medida que facilita a absorção total ou parcial dos ingredientes sendo responsável, também, por possíveis sinergismos, resultantes da associação de matérias-primas ⁶.

Há diversos relatos na literatura de substâncias presentes em cosméticos que apresentam determinado grau de toxicidade. Outras substâncias, por sua vez, apresentam nível de uso aceitável, como corantes, conservantes e filtros solares, devendo-se respeitar a legislação vigente quanto à concentração em que devem ser incorporados às formulações ⁶.

Groot *et al.* ⁴ realizaram um estudo em 119 pacientes para determinar quais eram os componentes presentes em cosméticos responsáveis por dermatite de contato. Para tanto, os autores aplicaram topicamente nos voluntários, durante 2 dias, substâncias relatadas como alérgenos. Eles observaram que o mais importante alérgeno cosmético foi um sistema conservante composto de metilsotiazolinona e metilclorosotiazolinona, que provocou reação em 33 pacientes (27,7%), seguido por resina de toluenosulfonamida/formaldeído presentes em laquês (15 pacientes, 12,6%) e pelo emulsificante oleamido-propildimetilamina, presentes em loções infantis para o corpo (13 pacientes, 10,9%).

Hernandez & Mercier-Fresnel ⁷ relatam que reações adversas a cosméticos podem ser ocasionadas principalmente pelos conservantes usados em formulações. Porém, Soni *et al.* ⁸ ao realizarem estudos para verificação de prováveis efeitos tóxicos para o propilparabeno, um conservante microbiológico muito utilizado, observaram baixa toxicidade oral aguda em animais de laboratório, nenhuma evidência de atividade carcinogênica e resultado negativo para o teste de Ames, o que comprova não potencial carcinogênico. Resultados semelhantes foram observados para outro conservante microbiológico, o metilparabeno ⁸.

Viglioglia & Rubin ⁵ afirmam que tensoativos aniônicos como o lauril sulfato de sódio possuem propriedades irritantes quando aplicados sobre a pele. Segundo os autores, tensoativos catiônicos podem também causar dano cutâneo. Já tensoativos não iônicos, como polissorbato 80, possuem potencial de irritação menor. Outra substância presente em cosméticos e que possui considerável grau de toxicidade é a fragrância. Jackson ⁹ afirma que de 1500 substâncias comumente usadas em fragrâncias, cerca de 100 (6,7%) causam reações adversas. Como exemplo, tem-se óleo de marigold, que apresenta fototoxicidade. Também, várias substâncias presentes em cosméticos podem causar dermatite de contato, principalmente em tinturas capilares, como betanaftol e pirogalol ⁵.

Recentemente, muito se tem discutido acerca da toxicidade do formaldeído, que vem sendo utilizado em alisantes capilares em concentrações de 0,4 a 29,7%. Segundo Boletim Informativo da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) ¹⁰, órgão regulamentador destas questões no Brasil, o formaldeído é uma matéria-prima com uso permitido em cosméticos nas funções de conservante (limite máximo de uso

permitido de 0,2%, de acordo com a Resolução RDC Nº 162, de 2001) e como agente endurecedor de unhas (limite máximo de uso permitido 5%, segundo Resolução RDC Nº 215, de 2005)^{11,12}. Tal Boletim Informativo cita também que a utilização do formaldeído com função diferente das citadas e em limites acima dos permitidos pode causar danos à saúde. Todos os produtos registrados pela ANVISA que apresentam formaldeído na sua composição têm as concentrações da substância dentro dos limites previstos na legislação vigente. Logo, quando o produto não é registrado, sua composição não foi avaliada, podendo conter substâncias proibidas ou de uso restrito, em condições e concentrações inadequadas ou não permitidas, o que pode acarretar riscos à saúde da população, como irritação da pele, vermelhidão, queimaduras, lacrimação, visão embaçada, hipersensibilidade e até mesmo queda de cabelo¹⁰.

Dentre as orientações mencionadas pelo Boletim Informativo da ANVISA¹⁰ destaca-se: o formaldeído está sendo utilizado em concentrações maiores que a permitida pela ANVISA com a função de alisante, podendo causar riscos à saúde; o formaldeído é considerado cancerígeno pela OMS (Organização Mundial de Saúde), sendo que quando absorvido pelo organismo por inalação e principalmente pela exposição prolongada apresenta como risco o aparecimento de câncer na boca, nas narinas, no pulmão e no sangue; não utilizar produtos que contenham formaldeído com finalidade e concentrações diversas das permitidas, visto que o formaldeído em concentrações permitidas não tem função de alisante; não utilizar produtos sem registro; em caso de dúvida, consultar um médico de confiança; o consumidor que encontrar irregularidades poderá entrar em contato com a Vigilância Sanitária Municipal, Estadual ou com a ANVISA. Logo, o órgão regulamentador brasileiro incentiva a Cosmetovigilância como prática para tentativa de coibir o uso indiscriminado do formaldeído em produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes.

Outras substâncias ainda que merecem destaque são os metais. Vários metais têm aplicações cosméticas, dentre eles alumínio, bário, bismuto, boro, cobalto, cromo, ferro, manganês, prata, titânio e zinco. Alguns estudos, porém, estão verificando que determinados metais são poderosos alérgenos, dentre eles o cromo, cobalto, mercúrio e principalmente o níquel¹³. Os quatro macrometais essenciais, sódio, potássio, cálcio e magnésio, são imprescindíveis no balanço homeostático do organismo.

É fundamental que reações adversas consecutivas à utilização de preparações cosméticas sejam evitadas ou pelo menos mantidas em limites aceitáveis. Para isso, é imprescindível que estudos de tolerância sejam realizados antes de qualquer introdução no mercado de novas formulações. É uma questão ética relacionada a todos os responsáveis pelos diferentes ramos profissionais implicados na elaboração e comercialização de cosméticos. Assim, apesar de uma avaliação rigorosa prévia destes riscos no caso de uma determinada preparação, efeitos de irritação ou de alergia podem sobrevir em indivíduos predispostos³.

Sparacio¹⁴ cita que, mediante o contingente de formulações cosméticas, estas precisam apresentar alguns diferenciais para ganhar a aceitação do consumidor, como, por exemplo, segurança, biocompatibilidade e funcionalidade. Assim, é primordial o desenvolvimento de testes que comprovem um alto nível de segurança do produto, o qual poderá ser utilizado por consumidores de vários tipos e condições de pele.

Logo, o objetivo deste trabalho é enfatizar a necessidade de realização de ensaios de toxicidade para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes, bem como apresentar os testes *in vivo* e *in vitro* utilizados abordando a necessidade de se aplicar métodos alternativos aos ensaios *in vitro* na avaliação de segurança dos mesmos.

SEGURANÇA DE COSMÉTICOS

Independente do grau de risco que o produto cosmético apresenta, este deve ser seguro. Entende-se por segurança de cosméticos a ausência razoável de risco de lesão significativa em condições de uso previsíveis, ou seja, define-se segurança em termos de probabilidade de que o produto não provoque danos significativos. Quando se fala em segurança de produtos cosméticos, deve-se entender que não existe 100% de segurança em nenhuma substância química, já que até mesmo água pode ser perigoso se administrada em quantidades inadequadas¹⁵.

Segundo Romanowski e Schueller¹⁵ um consumidor pode usar diversos produtos cosméticos diferentes num mesmo dia. Se cada um dos produtos contiver, por exemplo, 10 componentes, esse indivíduo estará exposto a muitos compostos químicos por dia. Como essas substâncias entram em contato direto com várias partes do corpo, como couro cabeludo, região próxima aos olhos, mucosas e cavidade oral, é essencial garantir ao consumidor que ele esteja utilizando um produto seguro.

Considerando que verdadeiramente não existe ausência de risco e, dadas às dificuldades para estabelecer conceitos relativos a uma condição razoavelmente previsível de uso, o responsável por um produto cosmético deve empregar recursos técnicos e científicos suficientemente capazes de reduzir possíveis danos aos usuários, ou seja: formulando o produto com substâncias referenciadas (substâncias constantes em compêndios e legislação), que sejam as mais seguras possíveis; informando o consumidor, da maneira mais clara possível, a fim de evitar mau uso do produto e seguindo as Boas Práticas de Fabricação e Controle ⁶.

Assim, uma das responsabilidades dos formuladores cosméticos é assegurar que os produtos sejam seguros. Para isso, o entendimento do funcionamento dos testes de segurança é primordial. Infelizmente, não existe um único manual de métodos mundialmente aceitos para os testes de segurança; pelo contrário, mediante a vasta gama de metodologias, cada empresa escolhe seus métodos para procedimentos de segurança dos produtos ¹⁵.

A avaliação de segurança deve preceder a colocação do produto cosmético no mercado. Uma vez que o produto cosmético é de livre acesso ao consumidor, o mesmo deve ser seguro nas condições normais ou razoavelmente previsíveis de uso ⁶.

Na legislação brasileira não se exige testes de toxicidade para o registro de produtos cosméticos. De acordo com a Resolução 79/00 ¹, Anexo XXI e suas atualizações, o que existe é apenas um termo de responsabilidade que a empresa assina, onde a mesma declara possuir dados comprobatórios que atestam a eficácia e segurança de seus produtos ⁶.

Na Comunidade Européia, a segurança de produtos cosméticos é regulada pela Diretiva Cosmética (76/768/EEC) de 1976, artigos 2º e 7º, os quais afirmam que um produto cosmético não deve causar dano à saúde humana quando aplicado em condições razoáveis ou razoavelmente previsíveis de uso; na produção deve-se considerar o perfil toxicológico da substância ativa, sua estrutura química e o nível de exposição. Pode-se perceber, assim, que a Diretiva Cosmética impõe uma obrigatoriedade de que os produtos cosméticos devem ser seguros, mas não fornece detalhes específicos ou métodos que possam ser utilizados nestes testes de segurança. O SCCNFP (Comitê em Cosméticos e Produtos Não Alimentícios) recomenda o uso de testes toxicológicos baseados naqueles utilizados para produtos farmacêuticos e agroquímicos ¹⁶.

Nos Estados Unidos, o registro de produtos cosméticos é controlado pelo FDA (Food and Drug Administration), codificado no Título 21, Código de Regulamentos Federais (21 CFR), partes 700 a 740 (21 CFR 700 a 740). Embora o FDA não obrigue que os fabricantes de cosméticos testem seus produtos para a garantia da segurança, ele incita fortemente os mesmos a realizarem os testes toxicológicos apropriados. Se a segurança do produto não for adequadamente verificada, este deve ter uma indicação na embalagem advertindo que a segurança do produto não foi determinada ¹⁷.

Jackson ¹⁸ considera como elementos fundamentais na toxicologia cutânea os seguintes aspectos: substância química, a dose de exposição ao produto químico, quantidade da substância permeada, classe do cosmético na qual o ativo pode ser utilizado, método, duração e frequência de aplicação, quantidade de produto em cada aplicação e possível exposição do produto à luz solar ¹⁹.

Com o objetivo de garantir maior segurança para o usuário do produto cosmético, diversos órgãos regulamentadores têm se mobilizado com o objetivo de normatizar e comprovar a segurança e eficácia de tais produtos. Dentre as resoluções estabelecidas pelo Mercosul, tem-se a MERCOSUR/GMC/RES Nº 19/05, que discute o programa de cosmetovigilância na área de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. Os objetivos desta normativa são: garantir o cumprimento dos padrões de qualidade dos produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes produzidos nos países integrantes do Mercosul; destacar a responsabilidade dos fabricantes em garantir a segurança e a eficácia dos produtos por eles produzidos e conscientizar da necessidade de cumprir os requisitos obrigatórios relacionados à comprovação da segurança e eficácia de tais produtos. Assim, as empresas instaladas em países pertencentes ao Mercosul fabricantes de produtos cosméticos devem implementar um sistema de cosmetovigilância, com o objetivo de garantir ao usuário a segurança e eficácia dos mesmos, facilitar o acesso ao usuário de relatos sobre problemas de uso, defeitos de qualidade, efeitos indesejáveis e garantir o acesso do consumidor à informação. Também, estas empresas devem manter o registro dos dados de cosmetovigilância e avaliá-los; caso sejam identificadas situações que impliquem risco para a saúde do usuário, tais empresas devem notificar a autoridade sanitária local de seu país ²⁰.

Outra resolução que deve ser destacada é a

MERCOSUR/GMC/RES. Nº 26/04, que traz os requisitos técnicos específicos para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. Tal resolução complementa a resolução MERCOSUR/GMC/RES. Nº 24/95, com o intuito de promover uma implementação uniforme desta resolução pelos países envolvidos, estabelecer requisitos técnicos para que os fabricantes e importadores comprovem a segurança e eficácia de uso destes produtos possibilitando a livre circulação dos mesmos em todos os países do Mercosul, aperfeiçoar as ações de controle sanitário de tais produtos garantindo sua segurança em condições normais de uso, além de trazer a relação de documentos necessários para regular a fabricação destes produtos ^{21,22}.

Dentre os requisitos obrigatórios que as empresas devem apresentar que constam no anexo da resolução MERCOSUR/GMC/RES. Nº 26/04 tem-se: fórmula qualitativa; função dos componentes da fórmula; bibliografia e referências dos componentes; especificações técnicas, organolépticas e físico-químicas das matérias-primas e do produto acabado; especificações microbiológicas das matérias-primas e do produto acabado; processo de fabricação; especificações técnicas do material de embalagem; dados de estabilidade; sistema de codificação de lotes; projeto de arte das etiquetas ou rótulos; comprovação da eficácia e segurança; finalidade do produto; certificado de venda livre autorizado e certificado de inscrição do estabelecimento ²¹.

TESTES DE TOXICIDADE EM COSMÉTICOS

A determinação do potencial tóxico é o primeiro passo na análise de risco de um produto e consiste de uma série de estudos de toxicidade, sendo necessários os seguintes ensaios: toxicidade aguda dérmica, toxicidade oral e percutânea, irritação e sensibilização cutânea, irritação ocular primária, inalação, fotossensibilidade e fototoxicidade (no caso de substâncias absorventes de raios UV), toxicidade sub-aguda, potencial mutagênico, carcinogênico, teratogênico e acneigênese ^{3,15,19}. Outros estudos necessários são aqueles que visam a determinação da margem de segurança, já que os ingredientes devem ser incorporados na fórmula do produto cosmético num nível de concentração que apresente margem de segurança adequada. A margem de segurança é definida como a relação entre a dose experimental mais elevada, que não produz qualquer efeito sistêmico adverso depois de um mínimo de 28 dias de ingestão oral em espécie animal, e a dose diária absorvida, a qual o consumidor pode ser exposto por

via cutânea. Esta relação não pode ser menor que cem ⁶.

O Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos ⁶ orienta como estudos básicos úteis os seguintes testes: absorção cutânea; estudo do potencial de efeito sistêmico - toxicidade aguda e testes de mutagenicidade; estudo do potencial de efeito alergênico - teste de alergenidade; estudo do potencial de risco irritativo - irritação primária da pele e irritação primária da mucosa (ou ocular).

Além disso, o Guia orienta como estudos complementares úteis em situações particulares: estudo do risco sistêmico potencial: toxicidade subaguda - desejável quando o ingrediente é destinado ao uso diário; estudo do efeito na reprodução (fertilidade / teratogenicidade peri/pós-natal) - necessário quando o ingrediente pertence a uma família química com suspeita de risco ou se utilizado em produtos indicados para gestantes e fotomutagenicidade - utilizada para ingredientes que absorvem os raios ultravioleta entre 290 e 400 nm; estudo do risco irritativo potencial: irritação por efeito cumulativo - desejável quando o ingrediente é destinado a ser utilizado em produtos de uso regular, sem enxágüe; avaliação de riscos particulares - teratogenicidade, carcinogenicidade e genotoxicidade ⁶.

Há várias metodologias de testes que os pesquisadores podem empregar para avaliar a segurança dos produtos cosméticos. Historicamente, estes eram realizados com animais (*in vivo*), porém atualmente alguns centros de pesquisa estão deixando de fazer estes tipos de testes e adotando novas alternativas (*in vitro*) que excluem testes com animais ¹⁵. Um ensaio *in vivo* geralmente não deve ser executado na eventual existência de outro método científico *in vitro* válido, satisfatório, razoável e disponível na prática para obtenção do resultado desejado ¹⁹.

TESTES IN VIVO

Os estudos *in vivo* permitem a investigação do potencial toxicológico de uma substância quando aplicada a um animal através de uma via de exposição (oral, inalatória ou tópica) similar à do homem, permitindo a observação de efeitos adversos.

Teste de irritação ocular primária (Teste de Draize)

Lachapelle ³ sugere que o teste de irritação ocular primário é interessante para produtos que serão aplicados próximos aos olhos e que podem acidentalmente penetrar nos mesmos,

como os produtos de maquiagem em redor dos olhos (máscara, sombra, maquiagem de pálpebras, delineadores, entre outros), produtos de maquiagem do rosto (base fluida) e formulações para o cabelo (xampus, entre outros).

Em um dos olhos de 6 coelhos albinos aplica-se a substância a ser analisada, e o outro olho atua como controle. Observa-se a reação ocular em intervalos específicos de tempo durante um período médio de 72 h, podendo prolongar-se por 7-8 dias. Os efeitos observados podem ser classificados em uma escala de 1 a 8. Dentre os efeitos, tem-se: ulceração e opacidade da córnea, inflamação da íris, hemorragia e necrose, inchaço da conjuntiva, deterioração do olho e cegueira ⁶.

Testes de toxicidade aguda dérmica

Utilizam-se 10 cobaias, sendo 5 de cada sexo, as quais são tratadas com 2 g/kg da substância ou produto acabado em pele intacta ou irritada com lauril sulfato de sódio durante 4 ou 24 h. Os animais são observados para detecção de sinais de reações adversas por 14 dias. Se tais sinais não forem observados, a substância pode ser considerada praticamente não tóxica, e testes seqüentes não são requeridos ¹⁹.

Irritação cutânea

Podem ser realizados tanto em coelhos ²³ como em humanos ³. Mede-se a irritação cutânea com o auxílio de um teste epicutâneo feito sobre a pele abrasada e sobre a pele intacta de no mínimo seis coelhos albinos raspados na antevéspera da prova. Sobre a pele de cada animal, realizam-se três incisões paralelas de três cm de comprimento com uma agulha de injeção hipodérmica de forma a abrasar a camada córnea, sem provocar sangramento. Sobre cada superfície a testar, aplica-se 0,5 mL (para líquidos) ou 0,5 g (para semi-sólidos) das formulações a serem testadas, recobrimo-se a área de aplicação com uma gaze. Após 24 e 72 h, procede-se a avaliação das reações observadas, de forma a obter o índice de irritação cutânea, seguindo a escala de Draize: discretamente irritantes (índice ≤ 2), moderadamente irritantes (índice entre 2 e 5) e muito irritantes (índice ≥ 6) ³.

Os testes de irritação em coelhos têm também suas limitações, principalmente relacionadas à não detecção de irritações quando se trata de irritantes fracos. Assim, pode-se realizar o teste das irritações repetidas durante 21 dias consecutivos no homem aplicando quantidade definida da amostra sobre o dorso, recoberto com gaze após aplicação, de em média 24 vo-

luntários durante 24 h e verificando os efeitos diariamente. O teste é repetido no mesmo local por 21 dias, salvo se há desenvolvimento de eritema. O número médio de dias necessários para obtenção de reações adversas serve como índice do poder irritante da substância ³. Assim, se começarem irritações no 10º dia, o índice de irritação da substância é 10.

Fotossensibilidade e Fototoxicidade

Algumas substâncias provocam reações adversas somente quando expostas à luz, como eritema intenso, hiperpigmentação, queimadura e edema. Os testes fotoalergênicos baseiam-se em testes oclusivos repetidos realizados em cobaias albinas utilizando radiação ultravioleta (UV) durante a fase inicial de exposição. As cobaias são expostas diariamente durante 3 semanas à radiação e, após período de 14 dias, são expostas a mais uma exposição. O procedimento seguinte é a avaliação da reação alérgica. Já os testes de fototoxicidade, realizados também em cobaias albinas e na maioria das vezes realizados somente com matérias primas, expõem a pele à matéria prima teste e em seguida às radiações UVA e UVB ¹⁵. Substâncias presentes em cosméticos e que podem causar fotossensibilidade são geralmente as fragrâncias ²⁴.

Testes de Sensibilização Cutânea

Pode-se empregar o método de maximização, no qual utiliza-se cerca de 20 cobaias, que é considerado o modelo de eleição para estudos de alergia de contato ²⁴. Este teste comporta duas etapas: uma fase de indução da sensibilização e outra de revelação. Aplicam-se inicialmente 6 injeções intradérmicas, 3 de cada lado do pescoço, à saber: 2 com adjuvante completo de Freund (substância que tem por função principal exacerbar a resposta imune), 2 com a substância teste numa concentração de 5% sem o adjuvante e 2 com a substância teste emulsificada a 5% no adjuvante completo de Freund. Uma semana mais tarde, raspam-se as regiões em que as injeções foram aplicadas. Se a substância teste não for irritante, aplica-se na região lauril sulfato de sódio a 10% em vaselina, com o objetivo de provocar uma irritação leve localmente e, após 24 h, aplica-se a substância teste no local. A fase de revelação se realiza 14 dias após a fase tópica e aplica-se a maior dose não irritante. Depois de 24 h, a pele é examinada para observação de reações alérgicas. A intensidade da resposta é quantificada na hora da remoção da banda e 48 h depois ^{3,6,24}.

Acneigênese

O método para verificar acneigênese baseia-se numa experimentação na qual se observou que, pincelando o conduto auditivo externo do coelho com diferentes óleos, obtinha-se, depois de 14 dias, uma hiperqueratose folicular cuja intensidade era reflexo do efeito comedogênico no homem. Utilizam-se 6 coelhos albinos Nova Zelândia de 2 a 3 kg. As amostras são diluídas na proporção de 1 a 10 g. Efetuam-se 15 aplicações (três semanas com cinco aplicações cada) de 1 mL da solução teste na parte interna da orelha direita (a orelha esquerda é utilizada como controle). São realizadas leituras diárias e 24 h após a última aplicação para observação de eritema, edema e presença ou ausência de comedões ^{3,6,15}.

Toxicidade oral e percutânea

Determinadas quantidades de matérias-primas no organismo podem provocar vômitos, danos aos órgãos internos e até a morte. Os testes destinados a medir a toxicidade oral e percutânea 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 h. Tanto no teste de toxicidade oral quanto no teste de toxicidade 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 ¹⁵.

Inalação

Quando inalados, alguns compostos podem provocar danos internos ou inibir o sistema respiratório. Isto pode acontecer para substâncias contidas em aerossóis, como fragrâncias, substâncias antimicrobianas, entre outras. Assim, tais substâncias devem ser submetidas a testes de segurança de inalação, através da determinação da concentração letal CL₅₀. Neste teste, os animais são expostos à substância via inalação à determinada concentração no ar. Em seguida, são medidas as taxas de mortalidade. Neste experimento, as características da substância teste devem ser verificadas, como tamanho da partícula, concentração transportada pelo ar e sedimentação de partículas de aerossol, já que estas

informações serão importantes para os testes com animais ¹⁵.

Potencial mutagênico

Geralmente é utilizado o teste de Ames. Neste teste, utiliza-se o procedimento experimental do ensaio em placa de *Salmonella*/Microsoma de Ames para analisar a atividade mutagênica da substância teste em cada um dos cinco estirpes histidino-dependentes de *Salmonella typhimurium* com ou sem ativação de microsomas de mamífero (fração de fígado S9 de rato). É necessária também a realização paralela de um controle negativo, composto pelo extrato do meio, e de um controle positivo, composto por um mutágeno conhecido. São considerados como resultado positivo os testes em que a substância produz resposta positiva após três concentrações da dose, tendo-se o cuidado de aumentar também o controle positivo ¹⁹. Segundo Lachapelle ³ de cada 10 corantes presentes em preparações cosméticas como batons, três se mostraram mutágenos nos testes de Ames.

Potencial carcinogênico

Os testes para determinar se o produto provoca câncer são semelhantes aos testes do potencial mutagênico, porém sua duração é muito maior. Recomenda-se a realização dos testes conhecidos como “doses heróicas”, já que seria necessário grande número de animais no teste para detectar potencial carcinogênico em níveis reais. Assim, administram-se doses muito grandes a pequenos números de animais. Para algumas substâncias, o câncer provocado por grandes doses também seria provocado por doses menores, sugerindo que doses poderiam ser extrapoladas com esse método. Todavia, apenas dados relativos a doses elevadas têm sido aceitos ¹⁵.

Potencial teratogênico

Animais prenhes são expostos ao composto teste e analisados o desempenho reprodutivo, o desenvolvimento do embrião e o desenvolvimento pós-natal do animal ¹⁵.

TESTES IN VITRO

Durante os últimos anos, muitos fatores têm levado à necessidade de desenvolvimento de métodos toxicológicos para testes de cosméticos *in vitro*, dentre eles: avanços em procedimentos de isolamento de células e conhecimento das técnicas de cultura de tecidos; técnicas analíticas sofisticadas que permitem a medida de peque-

nas quantidades de materiais biologicamente importantes; novos produtos humano-específicos desenvolvidos por biotecnologia; pressão imposta pelas comunidades regulatórias e pela sociedade para diminuição do número de animais usados em pesquisa; menor tempo das análises toxicológicas *in vitro* e reconhecimento pela comunidade científica de que as metodologias *in vitro* fornecerão melhores abordagens em áreas específicas ²⁵.

Várias medidas têm sido executadas para diminuição do uso de animais em estudos de toxicidade. Em 1984, o Governo Britânico concedeu fundos para o desenvolvimento de métodos alternativos ao FRAME (Fund for Replacement of Animal Medical Experiments), que desde 1983 edita a revista ATLA (Alternatives to Laboratory Animals). Em 1994, inaugurou-se o ECVAM (European Committee for Validation of Alternative Methods), instituição da Comunidade Européia encarregada de promover e validar técnicas e metodologias destinadas à substituição de testes em animais. Instituições como CTFA (Cosmetic, Toiletries and Frangrance Association) e IRAG (Interagency Regulatory Alternatives Group) são referências de instituições que contribuem para acelerar a padronização e harmonização de metodologias *in vitro* ⁶.

Dentre as instituições que se preocupam em estudar métodos alternativos destaca-se também a Asociación Española de Toxicología, através do Grupo de Trabajo Especializado en Métodos Alternativos (GTEMA), que periodicamente lança boletins sobre o assunto nas mais diversas áreas, como compostos químicos, alimentos e contaminantes, meio ambiente, cosméticos e medicamentos, proteção e experimentação animal, dentre outros ^{26,27}.

O Boletín GTEMA 28 de 2003 e o Boletín GTEMA 33/34 de 2006 apresentam o intenso trabalho do Parlamento e Conselho Europeu para concretização da 7ª Ementa Diretiva 76/768/EEC, que proíbe a experimentação com animais na indústria cosmética a partir de 2009, fixando este ano para total implementação de métodos alternativos. Além disso, o Boletín GTEMA 33/34 de 2006 cita ainda algumas normas para proteção dos animais usados em experimentos e outros fins científicos, dentre elas a exigência de que a experimentação seja supervisionada por um comitê de ética local e haja a criação de uma comissão ética estatal do bem-estar animal, além de classificar os indivíduos que trabalham com o manuseio de animais em diversas categorias: a) indivíduo responsável pelo cuidado dos

animais; b) indivíduo que executa os experimentos; c) indivíduo responsável por dirigir os experimentos; d) indivíduo especialista em ciências de experimentação animal que cuide do bem-estar dos mesmos, sendo que para o indivíduo se encaixar em alguma destas categorias deve cumprir uma série de requisitos além de realizar cursos de formação específica ^{26,27}.

A substituição dos testes em animais tem sustentação na política dos 3 R's (Refinamento, Redução e Substituição) introduzido por Russel & Burch ²⁸ no sentido de humanizar a experimentação científica, tendo como estratégia uma pesquisa racional minimizando o uso de animais e seu sofrimento, sem comprometer a qualidade do trabalho científico que está sendo executado. No setor de cosméticos, os métodos alternativos adotados baseiam-se em modelos *in vitro* utilizando culturas de tecidos ou organismos inferiores e modelos matemáticos e humanos. Estes testes abrangem várias culturas celulares (de pele, células tumorais e fibroblastos), avaliação da indução da liberação de substâncias indicadoras de inflamação ou alergia, construção de modelos matemáticos e computadorizados, ensaios com isótopos radioativos, recurso a banco de órgãos, etc. ¹⁹.

Bancos de dados contendo informações sobre alérgenos também estão sendo desenvolvidos em vários casos de reações adversas, como por exemplo, nos casos de dermatite de contato. O CADES (Contact Allergens Database Evaluation System) é um banco de dados que abrange toda a literatura entre 1975 e 1990 com informações sobre experimentações animais e humanas em casos de dermatite de contato ²⁹.

Logo, deve-se frisar que os métodos alternativos à experimentação animal também apresentam algumas desvantagens, principalmente relacionadas ao fato de que uma cultura simples não pode mimetizar as interações complexas dos tipos de células no corpo, já que o metabolismo *in vivo* pode ser simulado somente a uma pequena extensão, mas não completamente. Além disso, sistemas de cultura são relativamente estáticos e a dose da substância química teste pode não ser a mesma do teste *in vivo*. Também, nas metodologias de cultura podem estar presentes problemas físicos como solubilidade, estabilidade e efeitos biofísicos da substância teste ²⁵.

Independente do teste a ser utilizado, Loprieno *et al.* ²⁵ atentam para a necessidade de que estes testes sejam validados antes de serem executados. Validação pode ser definida como

processo pelo qual a relevância de um procedimento é estabelecida para um propósito particular. Validação é autenticação, confirmação ³⁰⁻³². O principal objetivo da validação é estabelecer parâmetros para que possa haver repetibilidade (mesmo operador, mesmas condições experimentais, mesmos equipamentos) e reprodutibilidade (diferentes operadores, diferentes laboratórios, diferentes condições experimentais) das condições experimentais ³³.

Os métodos alternativos podem ser utilizados tanto para ingredientes como para produtos cosméticos e têm por objetivo principal avaliar o potencial irritativo, alergênico e sistêmico, este último, essencialmente por meio de sua absorção oral ou permeação ⁶. Os principais testes utilizados são:

Teste *in vitro* de irritação da pele

Devido à complexidade das reações envolvidas no mecanismo de irritação da pele, é muito difícil estabelecer parâmetros que possam ser avaliados por um sistema *in vitro*. Na avaliação do efeito irritante na pele causado por um cosmético, é possível, através da combinação de diferentes critérios de avaliação, identificar a corrosão/não-corrosão de potenciais substâncias químicas. A corrosão é definida como a produção de uma lesão irreversível seguida da aplicação de um produto teste. Dentre os métodos utilizados para testes de corrosão da pele tem-se o teste de resistência elétrica transcutânea, conhecido como TER, e o teste EPISKIN. No TER, a substância a ser testada é aplicada durante 24 h em discos de epiderme de ratos. Para cada substância, são utilizados três discos de pele. A substância teste é então removida por lavagem com jato de água (até 30 °C). Antes de medir a TER, reduz-se a tensão superficial da pele adicionando-se etanol 70%, seguido de hidratação com solução de sulfato de magnésio (154 mM). 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 ≥ 5 KW, a substância não é corrosiva ². Já no teste EPISKIN, a substância ou produto acabado é aplicado topicamente por mais de 4 h 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 a 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 ³⁴.

Teste de fototoxicidade

A base deste teste é a comparação da citotoxicidade de um agente químico testado com ou sem exposição adicional a doses não tóxicas de luz UVA. A citotoxicidade é expressa na determinação da dose dependente que reduz o crescimento celular utilizando-se um corante vital, chamado vermelho neutro. De acordo com este método, têm-se identificados quatro mecanismos pelos quais a absorção de luz por um cromóforo pode resultar numa resposta fototóxica. Todos eles resultam em lesões celulares. Neste teste, células chamadas 3T3 são mantidas em cultura durante 24 h para a formação de monocamadas. Duas placas por substância teste são pré-incubadas com 8 concentrações diferentes da substância por uma hora. Em seguida, uma das placas é exposta a uma dose de luz UV não citotóxica, enquanto a outra é mantida no escuro (controle). Em ambas as placas, o meio de tratamento é depois substituído por um meio de cultura e após 24 h de incubação, a viabilidade celular é determinada pela aquisição do vermelho neutro durante 3 h. Um resultado positivo neste teste indica que a substância teste tem potencial fototóxico ^{6,25,34}.

Teste de absorção cutânea

O teste de absorção cutânea é um teste alternativo para predição de determinado efeito sistêmico, sendo utilizado tanto componentes da formulação e produto acabado ⁶. É possível estudar *in vitro* a permeabilidade de substâncias através da pele utilizando-se uma câmara de difusão, isto é, uma célula dividida em duas partes por uma membrana. A face externa da membrana fica em contato com a substância a penetrar, enquanto que a outra face contém um lí-

quido (solução receptora) que entra em contato com o que atravessa e permite sua dosagem. De tempos em tempos, retira-se uma alíquota da solução receptora para verificação por metodologia analítica da concentração da substância ou formulação teste ³⁴.

Teste *in vitro* 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 e sabonetes líquidos 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 parâmetro de caracterização dos efeitos dessas substâncias *in vitro* ⁶.

Teste de irritação ocular

Alguns dos testes de irritação ocular existentes são: teste ocular enucleado ou isolado derivado de tecido de coelho ou galinha, teste de membrana córneo-alantóide do ovo de galinha (HET-CAM) e ensaio de permeabilidade e opacidade corneal bovina (BCOP). No ensaio de HET-CAM, tem-se por 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 é baseado na observação dos efeitos irritantes (hiperemia, hemorragia e coagulação) após 5 min de aplicação do produto, puro ou diluído, sobre a membrana córneo-alantóide. Obtém-se uma escala que considera os fenômenos observados. Já 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 é baseado 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, que determina a diferença de transmissão do fluxo luminoso entre a córnea ser avaliada, fixando um valor numérico da opacidade. Já 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 ^{14,35}.

CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

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 de teste 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 que apresentam, por exemplo, formaldeído, em concentrações inadequadas.

Logo, a implementação de uma política de Cosmetovigilância na área de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes, 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 testes de toxicidade 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, que define o ano de 2009 como prazo máximo para não mais utilização de animais em testes de segurança de cosméticos. Os testes *in vitro* surgem como uma promissora e importante tentativa de elucidação de toxicidade das substâncias presentes em cosméticos. Todavia, apesar do desenvolvimento de grande variedade de métodos alternativos experimentais, estes têm provado, em grande parte, estarem ainda longe de serem seguros substituintes da experimentação animal. Mesmo diante destes fatos, tendências futuras prováveis são a completa substituição dos testes envolvendo animais pelos testes *in vitro*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2000) Resolução-RDC 79. *Diário Oficial [da]*

- República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 31 ago. 2000.
2. Leonardi, G.R. (2004) "*Cosmetologia Aplicada*", Ed. Medfarma, São Paulo, págs. 1-12.
 3. Lachapelle, J.M. (1994) Toxicidade orgânica e geral. In: Pruniéras, M. "*Manual de Cosmetologia Dermatológica*", 2. ed., Ed. Andrei, São Paulo, págs. 325-56.
 4. Groot, A.C., D.P. Bruynzeel, J.D. Bos, L.M. Van Der Meeren, T. Van Joost, B.A. Jagtman & J.W. Weyland (1988) *Arch. Dermatol.* **124**: 1525-9.
 5. Viglioglia, P.A. & J. Rubin (1991) "*Cosmiatria II*", AP Americana de Publicaciones, Buenos Aires.
 6. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2002) *Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos*. Brasília, DF. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em: 12 de novembro de 2003.
 7. Hernandez, M. & M.M. Mercier-Fresnel (1999) "*Manual de Cosmetologia*", 3. ed., Revinter, Rio de Janeiro, págs. 133-7.
 8. Soni, M.G., S.L. Taylor, N.A. Greenberg & G.A. Burdock (2002) *Food Chem. Toxicol.* **40**: 1335-73.
 9. Jackson, E.M. (1993) *Cosmet. Toiletries* **108**: 43-6.
 10. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2005) Boletim Informativo - Escova progressiva, alisantes e formol. Brasília, DF.
 11. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2001) Resolução-RDC 162. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 12 set. 2001.
 12. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2005) Resolução-RDC 215. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF.
 13. Hostynek, J.J. (1998) *Cosmet. Toiletries* **113**: 33-42.
 14. Sparacio, R.M. (1996) *Cosmet. Toiletries* **111** (11): 47-51.
 15. Romanowski, P. & R Schueller (1996) *Cosmet. Toiletries* **111**: 79-86.
 16. *Alternatives to animal testing. Testing - a regulatory requirement*. Disponível em: <http://www.colipa.com/alternatives.html#n>. Acesso em: 12 de novembro de 2003.
 17. U.S. Food and Drug Administration (1992) *Cosmetic handbook - cosmetic safety*. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/cos-hdb1.html>. Acesso em: 12 de novembro de 2003.
 18. Jackson, E.M. (1990) *Cosmet. Toiletries* **105**(9): 135-47.
 19. Baker, F.W. & L.H. Bruner (1997) *Elsevier Science B.V.*, págs.567-573.
 20. Mercado Común del Sur (MERCOSUR). Resoluciones del Grupo Mercado Común. MERCOSUR/GMC/RES Nº 19/05. Programa de cosméticos y perfumes. LVIII GMC - Asunción, 09/VI/05.
 21. Mercado Común del Sur (MERCOSUR). Resoluciones del Grupo Mercado Común. MERCOSUR/GMC/RES Nº 26/04. Requisitos técnicos específicos para productos de higiene personal, cosméticos y perfumes. LV GMC - Brasilia, 08/X/04.
 22. Mercado Común del Sur (MERCOSUR). Resoluciones del Grupo Mercado Común. MERCOSUR/GMC/RES Nº 24/95. Requisitos para el registro de productos cosméticos mercosur extra-zona - zona y para la habilitación de empresas representantes titulares del registro en el estado parte receptor e importadores. LV GMC - 1995.
 23. Draize, J.H., G.L. Woodard & H.O. Calvary (1944) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **82**: 377.
 24. Draelos, Z.D. (1999) "*Cosméticos em dermatologia*", 2.ed., Revinter, Rio de Janeiro, págs.279-88.
 25. Goldberg, A.M. (1989) *Cosmet. Toiletries* **104**(11): 53-59.
 26. Asociación Española de Toxicología. Grupo de Trabajo Especializado en Metodos Alternativos (GTEMA). Boletín GTEMA 28, 2003.
 27. Asociación Española de Toxicología. Grupo de Trabajo Especializado en Métodos Alternativos (GTEMA). Boletín GTEMA 33/34, 2006.
 28. Russel, W.M.S. & R.C. Burch (1959) "*The principles of humane experimental technique*", Methuen, London.
 29. Hostynek, J.J. (1998) *Cosmet. Toiletries* **113**: 33-7.
 30. Loprieno, N., L.H. Bruner, G.J. Carr, M. Chamberlain, M. Cottin, O. de Silva & S.S. Kato (1995) *Toxicol. In Vitro* **9**: 827-38.
 31. Balls, M. & J.H. Fentem (1999) *Toxicol. In Vitro* **13**: 837-46.
 32. Worth, A. & M. Balls (2002) *ATLA* **30** (Sup. 1): 13-9.
 33. Barlow, B.D., L. Marshall & J. McPherson (2001) *Cosmet. Toiletries* **116**: 51-5.
 34. Ponec, M. (1992) *Int. J. Cosmet. Sci.* **14**: 245-64.
 35. Gordon, V.C. & C.P. Kelly (1989) *Cosmet. Toiletries* **69**: 69-74.