

A importância da aplicação de testes in vitro na garantia da segurança dos produtos cosméticos

The importance of the application of in vitro tests to guarantee the safety of cosmetic products

La importancia de la aplicación de ensayos in vitro para garantizar la seguridad de los productos cosméticos

Recebido: 28/10/2022 | Revisado: 06/11/2022 | Aceitado: 08/11/2022 | Publicado: 15/11/2022

Miquiele Maria Francisco

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7393-8209>

Centro Universitário Vale do Ipojuca, Brasil

E-mail: miquielemaria@hotmail.com

Tibério Cesar Lima de Vasconcelos

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7177-0561>

Centro Universitário Vale do Ipojuca, Brasil

E-mail: tiberio.vasconcelos@professores.unifavip.edu.br

Resumo

A aparência física do ser humano é refletida através da pele e suas imperfeições a tornaram um atrativo para os pesquisadores e para Indústria de Cosméticos. Para desenvolver uma nova formulação de cuidados com a pele, precisa-se de uma rigorosa avaliação dos componentes ali presentes. Os produtos cosméticos devem apresentar segurança e não devem causar quaisquer riscos aos seres humanos em situações normais ou quando utilizados de maneira previsível. Por isso, os testes in vitro passaram a ser uma alternativa para avaliação da segurança dos produtos cosméticos, uma vez que os testes in vivo apresentam inconveniências. Dessa forma, essa pesquisa buscou revisar a importância da aplicação de testes in vitro na garantia da segurança dos produtos cosméticos. Onde utilizou como metodologia pesquisa bibliográfica do tipo revisão integrativa nas bases de dados da Biblioteca Virtual em Saúde e PubMed utilizando a inserção dos DeCS: Cosméticos, In vitro, Segurança; Cosmetics, In vitro, Safety; Cosméticos, In vitro, Seguridad; combinados com o operador booleano AND para realização das buscas. Após critérios de inclusão e exclusão, 8 artigos foram selecionados para discussão. Os resultados desta revisão exibiram a aplicação dos testes in vitro na avaliação da segurança e eficácia de um tratamento de piolhos sem agrotóxicos, verificação da citotoxicidade do bis-retinamido metil quando comparado ao retinol, investigação da eficácia de despigmentação da hidroquinona, utilização para analisar a genotoxicidade de alguns produtos químicos, entre outros. Concluindo que os métodos in vitro são uma alternativa viável, que garante avaliar a segurança dos produtos cosméticos.

Palavras-chave: Cosméticos; In vitro; Segurança.

Abstract

The physical appearance of the one reflected through an attractive human being is attractive to the eyes and to the Cosmetic Industry. To develop a new skin care need, a rigorous evaluation of all components present. Cosmetic products must and must not present any risks to humans in normal situations or when used in a predictable manner. Therefore, in vitro tests to be an alternative for evaluating the safety of cosmetic products, since in vivo tests the inconveniences. Thus, this research sought to review the importance of applying in vitro tests in ensuring the safety of cosmetic products. Where used as a methodology bibliographic research of data from the integrative review in the databases of the Virtual Health Library and PubMed using the insertion of DeCS: Cosméticos, In vitro, Segurança; Cosmetics, In vitro, Safety; Cosméticos, In vitro, Seguridad; combined with the Boolean operator AND to perform the searches. After inclusion and exclusion, 8 articles were selected for discussion. The results of this review show the application of in vitro tests in evaluating the safety and efficacy of a pesticide-free lice treatment, verification of cytotoxicity when compared to retinol, investigation of hydroquinone depigmentation research, use to learn genotoxicity of some chemical products, among others. Concluding that the in vitro methods are a viable alternative, which guarantees the safety of the products.

Keywords: Cosmetics; In vitro; Safety.

Resumen

La apariencia física del ser humano se refleja a través de la piel y sus imperfecciones la han hecho atractiva para investigadores y para la Industria Cosmética. Para desarrollar una nueva formulación para el cuidado de la piel, se necesita una evaluación rigurosa de los componentes presentes. Los productos cosméticos deben ser seguros y no

deben causar ningún riesgo para los humanos en situaciones normales o cuando se usan de manera predecible. Por lo tanto, las pruebas *in vitro* se han convertido en una alternativa para evaluar la seguridad de los productos cosméticos, ya que las pruebas *in vivo* presentan inconvenientes. Por lo tanto, esta investigación buscó revisar la importancia de aplicar pruebas *in vitro* para garantizar la seguridad de los productos cosméticos. Donde se utilizó como metodología la investigación bibliográfica del tipo revisión integradora en las bases de datos de la Biblioteca Virtual en Salud y PubMed utilizando la inserción de DeCS: Cosméticos, *In vitro*, Segurança; Cosmetics, *In vitro*, Safety; Cosméticos, *In vitro*, Seguridad combinado con el operador booleano AND para realizar las búsquedas. Después de los criterios de inclusión y exclusión, 8 artículos fueron seleccionados para discusión. Los resultados de esta revisión mostraron la aplicación de pruebas *in vitro* para evaluar la seguridad y eficacia de un tratamiento para piojos libre de pesticidas, la verificación de la citotoxicidad del bis-retinamoido metil en comparación con el retinol, la investigación de la eficacia despigmentante de la hidroquinona, el uso para analizar la genotoxicidad de algunos químicos, entre otros. Concluyendo que los métodos *in vitro* son una alternativa viable, que garantiza evaluar la seguridad de los productos cosméticos.

Palabras clave: Cosméticos; *In vitro*; Seguridad.

1. Introdução

O maior órgão do Corpo humano é a pele, com uma composição de 16% do peso corporal. Ela é formada pela epiderme – tecido epitelial de origem ectodérmica e pela derme – tecido conjuntivo de origem mesodérmica; e recobre toda a superfície do corpo realizando diversas funções, entre elas a proteção contra patógenos, agentes químicos, desidratação e atritos. Além de enviar informações recebidas sobre o ambiente para o Sistema nervoso central, atua na termorregulação e excreção de muitas substâncias graças as suas glândulas sudoríparas (Junqueira & Carneiro, 2013).

A exposição da pele a agente químicos tóxicos, radiação ultravioleta, fumaça de cigarro, bactérias patógenas, vírus, poluição e íons de alguns metais podem provocar produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e radicais livres. Esses agentes oxidativos conseguem causar disfunções na pele, como enrugamento, hiperpigmentação, textura áspera, envelhecimento, entre outros. Por isso, a aparência física do ser humano é refletida através da pele e suas imperfeições a tornam um atrativo para os pesquisadores e para Indústria de Cosméticos (Sgardi, et al., 2007; González, et al., 2008).

Os produtos cosméticos são misturas, substâncias ou formulações utilizadas no corpo humano com o intuito de melhorar ou proteger a aparência e/ou odor do mesmo (Ramos et al, 2022). A Diretiva de Cosméticos 76/768/EEC da Europa determinou que um produto cosmético é qualquer preparação ou substância indicada a ser utilizada em várias partes externa do corpo, nas membranas da cavidade oral ou nos dentes e tenham como objetivo principal ou exclusivo limpar, melhorar aparência, perfumar e/ou amenizar odores corporais e/ou proteger do mesmo, além de manter em boas condições. Nos Estados Unidos o Food and Drug Administration (FDA) define cosméticos como produtos indicados a serem colocados no corpo humano para limpar, promover atratividade, melhorar ou alterar aparência sem afetar estrutura ou função do mesmo. Desta forma, assim como na Europa, nos Estados Unidos algumas formulações são consideradas cosméticas, como os antitranspirantes, e são drogas de venda livre, por isso, passam por legislações mais rigorosa (Orton & Wilkinson, 2004).

Os produtos cosméticos devem apresentar segurança e não devem causar quaisquer riscos aos seres humanos em situações normais ou quando utilizados de maneira previsível (Parlamento europeu, 2009). Para garantir a segurança de tais produtos, é preciso utilizar um avaliador de segurança com qualificação comprovada. Em geral é aceito que a comprovação de segurança de cada componente da formulação é a base para avaliar seguridade de um produto cosmético (Comissão europeia, 2003).

Para desenvolver uma nova formulação de cuidados com a pele, precisa-se de uma rigorosa avaliação dos componentes ali presentes. Vários estudos *in vivo* são realizados com máximo de voluntários humanos e em animais de laboratório para analisar eficácia e segurança da formulação cosmética (Ashawat, et al., 2009; Datta & Paramesh, 2010; Akhtar et al, 2010). A aplicação desses estudos em pessoas voluntárias tem diversas inconveniências, longo período de tempo para serem realizados, custos exorbitantes, além de serem potencialmente perigosos para os voluntários clínicos (Kale et al, 2010).

Além da enorme dificuldade para conseguir autorização do comitê de ética de pesquisa que envolve seres humanos. Em consequência a isso, houve um crescente interesse em utilizar métodos *in vitro* para avaliar eficácia e segurança dos produtos cosméticos, pois além de serem menos demorados, de maior custo-benefício, diminuir a participação de voluntários humanos e de animais, ainda podem ajudar a reduzir o custo de tais produtos (Roy et al, 2013).

Dessa forma, a presente revisão integrativa de literatura teve como objetivo revisar a importância da aplicação de testes *in vitro* na garantia da segurança dos produtos cosméticos, abordando vantagens para a escolha destes métodos quando comparados a outros.

2. Metodologia

A presente pesquisa trata-se de uma revisão de literatura do tipo integrativa, que segundo Soares et al, 2014, é um “tipo de revisão da literatura que reúne achados de estudos desenvolvidos mediante diferentes metodologias, permitindo aos revisores sintetizar resultados sem ferir a filiação epistemológica dos estudos empíricos incluídos.”. Tal ideia se alinha com o pensamento de Kakushi e Évora (2016), que diz que esse tipo de pesquisa possibilita elaborar uma síntese do conhecimento já descrito na literatura sobre um determinado assunto e proporciona uma análise de vasto entendimento dos resultados encontrados.

Para desenvolver o estudo foi indispensável seguir às seis leis fases segundo Mendes, et al., (2008). A 1ª lei - deve ser feita a identificação do tema escolha da hipótese ou como será a pesquisa para a elaboração da revisão integrativa; 2ª - deve-se organizar os critérios de inclusão ou exclusão do estudo e como será o processo de busca na literatura; 3ª - tirar dos estudos conceitos das informações selecionadas e separação dos estudos; 4ª - análise dos estudos incluídos na revisão integrativa; 5ª - fase de entendimento dos resultados; por fim, a 6ª lei - apresentação da revisão e a abordagem do conhecimento.

Dessa forma, baseando-se nas ideias acima citadas e com a intenção de responder à pergunta norteadora: “Qual a importância da aplicação de testes *in vitro* na garantia da segurança dos produtos cosméticos?” para seleção dos artigos utilizados no trabalho foram estabelecidos critérios de inclusão, como: identificação de estudos do tipo guia de prática clínica, ensaio clínico controlado, estudo de rastreamento, estudo observacional, livros e documentos, ensaio clínicos, ensaios controlados e randomizados; determinação de um intervalo significativo de tempo de 10 anos, incluindo o período de 2012 a 2022 e a existência do material nos idiomas português, inglês e espanhol.

As bases de dados utilizadas para encontrar os artigos foram o portal BVS (Biblioteca Virtual em Saúde), o qual possibilita acesso à MEDLINE (Medical Literature Analysis and Retrieval System Online), LILACS (Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde) e IBECS (Índice Bibliográfico Español en Ciencias de la Salud); e também foi utilizada a base de dados PubMed. Além disso, foram aplicados DeCS (Descritores em Ciências da Saúde) em português, inglês e espanhol, a fim de garantir maior abrangência na quantidade de artigos, sendo eles: Cosméticos, *In vitro*, Segurança; Cosmetics, *In vitro*, Safety; Cosméticos, *In vitro*, Seguridad. Estes descritores foram cruzados entre si com o auxílio do operador booleano “AND”. Consequentemente, após seleção dos artigos, um novo filtro foi estabelecido, os de critérios de exclusão, removendo artigos de revisão, artigos que apresentassem discordância com o tema, repetidos nas plataformas, e, que não respondessem à pergunta condutora.

Para extração das informações dos artigos selecionados foi utilizado como base o método de análise de conteúdo elucidado por Sousa e Santos (2020), que determina uma padronização da vistoria de conteúdo, assegurando uma maior qualidade do processamento de dados. Por isso, consiste em realizar uma pré-análise (leitura superficial do artigo, como título e resumo; definição de um dado importante de cada artigo selecionado), seguido de uma exploração (leitura criteriosa dos artigos, determinando o ponto principal, assim elaborando um conjunto de ideias) e por fim um tratamento dos resultados

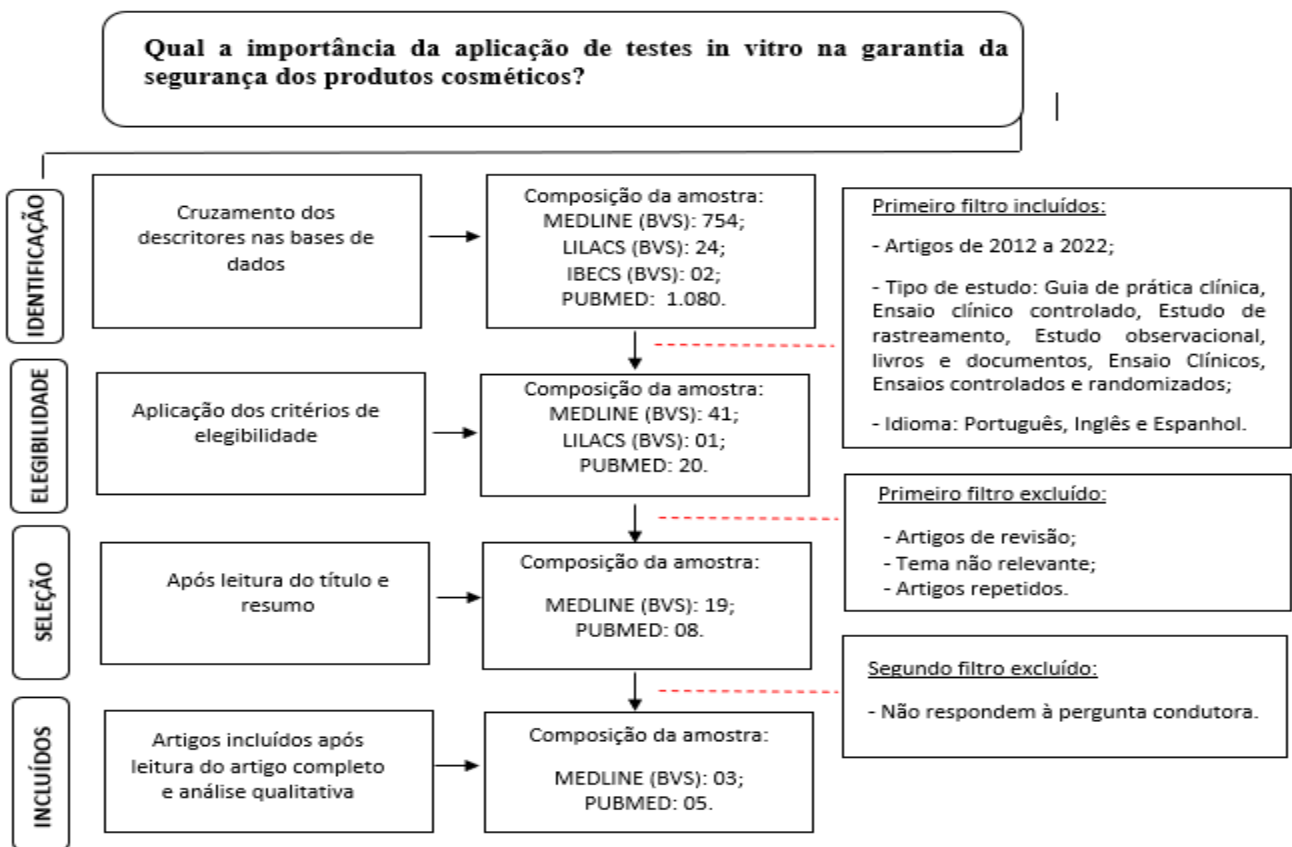
(ideias já definidas são entendidas e correlacionadas entre si, gerando uma incorporação de ideias que correspondem ao tema e a pergunta norteadora).

Com a intenção de esclarecer tais feitos e possibilitar uma melhor compreensão foi elaborado um fluxograma, que determina o número de artigos selecionados nas bases de dados e os resultados foram devidamente analisados, classificados e ordenados em uma tabela para melhor exposição destes.

3. Resultados e Discussão

Como resultado, a partir dos critérios de inclusão e exclusão estabelecidos e aplicados nas bases de dados, 08 artigos possibilitaram responder à pergunta condutora. Para melhor entendimento ilustrou-se tal procedimento em fluxograma (Figura 1) e após leitura aprofundada e análise minuciosa dos artigos selecionados, foi construído um instrumento de sistematização de dados em forma de tabela, com os descritivos dos itens: citação, título, objetivo e principais resultados a partir da perspectiva de cada autor (Quadro 1).

Figura 1 - Demonstração gráfica do processamento dos artigos para a obtenção das informações trabalhadas no presente artigo.



Fonte: Autoria própria.

Quadro 1 - Caracterização dos artigos da amostra final quanto a citação, título, objetivo e principais resultados.

	Citação	Título	Objetivo	Principais resultados
01	Wang, Zhang, & Wang, 2016.	Aplicação de métodos in vitro para avaliar a segurança de produtos para cuidados com o bebê.	Realizar um ensaio para avaliar a segurança dos produtos para cuidados com o bebê.	Três métodos in vitro foram conduzidos para avaliar a segurança de 12 produtos para cuidados com o bebê, que incluíam os tipos mais comuns. Além disso, um estudo de pesquisa com consumidores também foi realizado por duas semanas para avaliar a segurança. Os resultados do modelo de epiderme humana reconstruída, modelo de epitélio da córnea humana e pesquisa com consumidores mostraram que nenhuma irritação foi encontrada em nenhum produto de teste e os testes HET-CAM mostraram resultados positivos.
02	Won, Loy, Randhawa & Southall, 2014.	Eficácia clínica e segurança do 4-hexil-1,3-fenilenodiol para melhorar a hiperpigmentação da pele.	Investigar a eficácia despigmentante do 4-hexil-1,3-fenilenodiol em vários modelos in vitro e em um estudo clínico controlado randomizado.	O estudo in vitro demonstrou que o 4-hexil-1,3-fenilenodiol inibiu a melanogênese através da regulação da atividade e expressão da tirosinase. Tal inibição é reversível e não está associada à toxicidade celular nos melanócitos.
03	Kim et al, 2015.	Estabilidade química, clínica e in vitro de um novo derivado de retinóide híbrido, bis-retinamido metilpentano..	Avaliar a estabilidade química do bis-retinamido metilpentano (RS-2A) sob condições térmicas e de luz em comparação com o retinol, examinando os perfis de degradação, a atividade in vitro biológica, citotoxicidade e eficácia clínica.	A estabilidade química e os mecanismos de degradação do RS-2A sob condições térmicas e de luz foram investigados usando HPLC e LC-MS. HPLC foi validada para medição de estabilidade de RS-2A. O RS-2A apresentou maior estabilidade térmica e foto-estável quando comparado ao retinol, o que pode ser benéfico para o desenvolvimento de formulações tópicas e cosmecêuticas. RS-2A exibiu o aumento da síntese de colágeno em comparação com retinol. Além do mais, RS-2A apresentou citotoxicidade muito diminuída. No estudo clínico, um tratamento de 4 semanas com RS-2A resultou em melhora significativa na aparência das rugas periorbitais sem efeitos adversos. Os resultados gerais indicaram o potencial do RS-2A como agente antienvhecimento para preparações cosmecêuticas, em virtude de sua maior estabilidade química.
04	Lee et al, 2018.	Restauração e hidratação da barreira da pele usando adesivos de microagulhas de dissolução carregados com óleo de cavalo.	Encapsular o Óleo de Cavalo (HO) em uma microagulha de dissolução cosmética (DMN) para uma entrega transdérmica eficiente.	Foi realizada avaliação in vitro e avaliação clínica de adesivos HO-DMN para aplicação cosmética. Essas avaliações demonstraram evidências convincentes de que o HO-DMN é eficaz na restauração e hidratação da barreira cutânea. Sua aplicação melhorou a pele e elasticidade da pele, teor de umidade da pele densidade dérmica. Uma breve avaliação de segurança para verificar a irritação da pele e reação adversa também foi realizada, e os resultados positivos apoiaram a disponibilidade dos adesivos HO-DMN para uso cosmético.
05	Greive, Lui, Barnes & Oppenheim, 2012.	Segurança e eficácia de um tratamento de piolhos não baseado em pesticidas - resultados de um estudo comparativo randomizado em crianças.	Comparar a segurança e a eficácia de um xampu para piolhos sem pesticidas com espuma de malatão em crianças.	Ao todo 216 crianças se inscreveram, destas 172 foram por protocolo. O xampu sem pesticidas foi significativamente mais eficaz do que a espuma de malatão para a população com intenção de tratar (62,3 vs 40,4% livre de piolhos, não ajustado P=0,002; ajustado P= 0,003), bem como para a população por protocolo (67,8 vs 43,0% livre de piolhos, não ajustado P=0,001; ajustado P= 0,004). Os eventos adversos se limitaram a coceira ou ardor. O teste de contato com o xampu sem pesticidas não apresentou reações adversas. In vitro os testes usando piolhos demonstraram que o xampu sem agrotóxicos é ovicida e pediculicida.
06	Aardema et al, 2012.	Avaliação de produtos químicos que requerem ativação metabólica no EpiDerm™ 3D ensaio de micronúcleo de pele reconstruída humana (RSMN).	Descrever os resultados de um ensaio com micronúcleo de pele humana reconstruída para produtos químicos que requerem ativação metabólica.	O protocolo padrão de duas aplicações ao longo de 48 h foi comparado com um protocolo estendido envolvendo três aplicações ao longo de 72 h. Entendeu-se que o período de tratamento para 72 h alterou significativamente o resultado apenas para 4NQO, que foi negativo no regime de dosagem padrão de 48 h, mas positivo com o tratamento de 72 h. DMBA e CP foram positivos no ensaio padrão de 48 h e BaP apresentou resultados mistos; DBA e DMN foram negativos em ambos os regimes de dosagem de 48 h e 72 h. Concluiu-se que o RSMN detecta alguns produtos químicos que requerem ativação metabólica (4 de 6 produtos químicos foram positivos em um ou ambos os

				protocolos).
07	Maronpot et al, 2016.	Estudos genéticos e de toxicidade da ciclodextrina glucanotransferase em ratos.	Fazer uma avaliação da segurança da ciclodextrina glucanotransferase, produzida por <i>Bacillus pseudocaliphilus</i> DK-1139, usando uma bateria de ensaios de genotoxicidade e um estudo de toxicidade de dose repetida de 90 dias em ratos Sprague Dawley.	A ciclodextrina glucanotransferase não induziu mutações com ou sem ativação metabólica no ensaio de mutação reversa bacteriana. A formação de micronúcleos não foi induzida nos ensaios in vitro ou in vivo com ou sem ativação metabólica. Nenhuma indução de dano ao DNA foi detectada no fígado, estômago ou duodeno de camundongos machos ou fêmeas no ensaio do cometa. O sulfato de sódio também apresentou resultado negativo nesses mesmos ensaios de genotoxicidade. No estudo de ratos com dose repetida de 90 dias, não foram encontrados achados clínicos ou patológicos adversos relacionados ao tratamento.
08	Nishida et al, 2015.	Triagem de fotosegurança não animal para ingredientes cosméticos complexos com ferramentas de avaliação fotoquímica e fotobioquímica.	Estabelecer uma estratégia de previsão de fotosegurança para ingredientes cosméticos complexos com peso molecular indefinido, usando ensaios in vitro fotoquímicos e fotobioquímicos.	O estudo demonstrou a aplicabilidade de ferramentas in vitro de avaliação fotoquímica, incluindo análise espectral UV/VIS e ensaio de ROS para ingredientes cosméticos complexos. Os resultados obtidos demonstraram uma abordagem sistemática em camadas para avaliação simples e rápida da fotosegurança não animal de ingredientes cosméticos complexos que pode ser construída usando ensaios in vitro fotoquímicos.

Fonte: Autoria própria.

Um estudo realizado por Kim et al, 2015, que buscou avaliar a estabilidade química, clínica e in vitro do bis-retinamido metil (RS-2A) em comparação com o retinol observou-se no teste in vitro de citotoxicidade que as determinações de viabilidade celular após exposição que 5-100mi de RS-2A não apresentaram nenhum efeito citotóxico. Além do mais sua concentração necessária para inibir o crescimento celular de 50% foi de 1000 mi para RS-2A. Enquanto o retinol, se mostrou citotóxico em concentrações acima de 60mi. No ensaio in vitro para irritação induzida por retinóides os resultados apontaram que o RS-2A não apresentou uma irritabilidade da pele induzida por retinóides in vitro. Dessa forma, RS-2A é considerado seguro para utilização tópica e cosmeceutica pois não apresenta problemas significativos de irritação. Nesse estudo, o ensaio in vitro foi utilizado para avaliar a citotoxicidade e irritação induzida por retinóides, do bis-retinamido metilpentano quando comparado ao retinol, demonstrando sua importância na análise e comparação de substâncias a fim de identificar se esta é segura para ser utilizada em produtos cosméticos.

Uma pesquisa feita em 2012 buscou avaliar a segurança e eficácia de um tratamento de piolhos sem agrotóxicos com espuma de malatião. Nesse estudo foram realizados testes in vitro para analisar sua eficácia ovicida e pediculicida. Para isso foram utilizados ovos de piolho e água como controle. Um ovo de piolho que foi imerso no xampu sem pesticidas por 15 minutos e após 10 dias, nenhum ovo havia eclodido. Porém, após imersão em água os ovos de piolho após 7, 8, 9 e 10 dias eclodiram $7.0 \pm 2.5\%$, $57 \pm 4.6\%$, $70 \pm 5.7\%$ and $90 \pm 2.7\%$, respectivamente. Demonstrando que o xampu, portanto foi significativamente mais ovicida do que o controle de água. Na análise pediculicida o ovo de piolho tratados com 24 horas de idade com xampu ou água não apresentaram diferença na aparência quando fotografados após 24 horas do tratamento. Porém, ovos de piolhos tratados com xampu com 24 horas de idade demonstraram que ninfas totalmente formadas estavam presentes em ovos passados 9 dias do tratamento. Nestes ovos as ninfas são natimortas. Em comparação os ovos que foram tratados com água eclodiram e estão vazios após 9 dias do tratamento. Após 24, 48, 72 ou 96 horas independente dos ovos terem sido tratados, resultados semelhantes foram encontrados. 1 hora após o tratamento, 40% dos piolhos tratados com xampu estavam moribundos e 60% mortos, enquanto 98% dos piolhos tratados com água estavam vivos. Dessa forma, o xampu foi considerado altamente pediculicida quando comparado ao controle de água (Greive, et al., 2012).

A hidroquinona é um agente despigmentante tópico bastante utilizado. Por mais de 50 anos tem sido utilizada clinicamente para tratar diversos distúrbios de hiperpigmentação e é considerada padrão-ouro na avaliação de agentes despigmentantes. Entretanto, alguns efeitos adversos, entre eles irritação associada ao seu uso a logo prazo despertaram

preocupações sobre seu uso em produtos cosméticos. Por isso, um estudo realizado por Won, et al., buscou investigar a eficácia de despigmentação do 4-Hecilia-1,3 fenilenodiol em vários modelos *in vitro* e em um estudo clínico controlado randomizado. Aqui o modelo *in vitro* aplicado mostrou nitidamente, assim como o estudo clínico controlado, o efeito despigmentante da 4-hexil-1,3-fenilenodiol mediado através da inibição da expressão proteica e atividade da enzima tirosinase, sem estar associada à toxicidade nos melanócitos, demonstrando a eficácia e segurança na modulação da hiperpigmentação da pele (Won, et al., 2014).

A sétima emenda da diretiva de cosméticos determinou que ingredientes cosméticos não podem ser testados quanto a sua genotoxicidade em ensaios *in vivo*. Por isso, a avaliação de genotoxicidade deve basear-se exclusivamente em testes *in vitro*. A partir disso um estudo resolveu investigar se alguns produtos químicos genotóxicos que requerem ativação metabólica podem ser detectados através de um ensaio com micronúcleo de pele reconstituída (RSMN). Os produtos avaliados foram 4-nitroquinolina-N-óxido (4NQO), ciclofosfamida (CP), dimetilbenzantraceno (DMBA), dimetilnitrosamina (DMN), dibenzantraceno (DBA) e benzo(a)pireno (BaP). O protocolo padrão envolvendo duas doses ao longo de 48 h foi comparado com um regime de tratamento mais longo, de três doses e 72 h. Como resultado, quatro dos seis produtos químicos avaliados foram positivos em um mais dos regimes de dosagem, sendo eles DMBA, CP, 4NQO e BaP. O período estendido de tratamento para 72 h alterou o resultado apenas para 4NQO, que havia sido negativo no regime de 48 h, mas positivo com o tratamento de 72 h. Enquanto isso, os outros dois produtos químicos (DBA e DMN) foram negativos em ambos os regimes de dosagem de 48 h e 72 h. Com bases nesses resultados, entendeu-se que para testes gerais, o uso de um período de tratamento mais longo é recomendado em situações em que o resultado do tratamento padrão de 48 h é negativo ou questionável. Além disso, concluiu-se que o ensaio RSMN é um método *in vitro* é indispensável na avaliação da genotoxicidade de produtos químicos aplicados por via dérmica (Aardema et al, 2012).

Concomitante a isso uma pesquisa realizada por Nishida et al, 2015, buscou estabelecer uma estratégia de previsão de fotosegurança para ingredientes cosméticos empregando ensaios *in vitro* fotoquímicos e fotobioquímicos. Para isso 20 estratos vegetais foram selecionados como materiais modelo com base em informações de fotosegurança, e seus potenciais fototóxicos foram avaliados por meio de análise espectral ultravioleta (UV)/luz visível (VIS), ensaios de espécies reativas de oxigênio (ROS)/ROS micelares (mROS), e teste de fototoxicidade de absorção de vermelho neutro de 3T3 (3T3 NRU PT). Os resultados obtidos demonstraram que a aplicabilidade de ferramentas *in vitro* para avaliação fotoquímica podem ser úteis para o desenvolvimento de estratégia de avaliação de fotosegurança para ingredientes cosméticos complexos. A estratégia de ensaio proposta pode atender aos requisitos da 7ª Emenda da Diretiva Europeia de Cosméticos de “substituir” os testes animais por experimentos não animais.

O óleo de cavalo (HO) vem sendo utilizado em produtos cosméticos por seus efeitos tradicionalmente conhecidos de hidratação da pele e restauração da barreira cutânea. Por isso Lee et al, 2018, buscaram analisar se Óleo de Cavalo encapsulado em uma microagulha de dissolução cosmética (DMN) era capaz de restaurar e hidratar a barreira da pele por meio de uma entrega transdérmica eficiente. Tal estudo foi desenvolvido através de métodos clínicos e *in vitro*. O teste de penetração na pele de adesivos DMN carregados com HO realizado *in vitro* utilizou a pele de cadáver de porco e solução de azul de triptofano a 0,4%. Após a aplicação foi confirmado uma penetração bem-sucedida na pele dos HO-DMNs através da barreira cutânea mais externa. Esse resultado mostrou os HO-DMS são capazes de entregar diretamente o HO encapsulado na área epidérmica, através de dia boa morfologia e resistência mecânica. Aqui, pode-se observar que a avaliação *in vitro* de adesivos HO-DMN para aplicação cosmética foi essencial pois comprovou atividade hidratante e de restauração da pele. Tal avaliação foi posteriormente confirmada na avaliação clínica e demonstrou que o adesivo HO-DMN é seguro para uso cosmético.

Por fim, uma pesquisa realizada com a ciclodextrina glucanotransferase (CGTase) utilizou entre outros, o ensaio de micronúcleo *in vitro* para avaliar a segurança da (CGTase). A CGTase é comercialmente usada como agente de processamento

na fabricação de cosméticos, alimentos e produtos farmacêuticos. Como resultado desse estudo a CGTase mostrou ser ligeiramente citotóxica para células TK6 cultivadas em concentrações de aproximadamente 4000 -g/mL e maiores±S9; mas sua citotoxicidade em todas as concentrações testadas foi inferior a 50%. Observou-se uma precipitação em todas as doses testadas. Nenhuma mudança de pH foi observada com base na mudança de cor do meio. A indução de micronúcleos foi menos de 3 vezes maior do que o controle do veículo em todas as doses com e sem S9, foi considerada negativa a resposta geral. Tais dados indicam que, a CGTase não é excessivamente citotóxica para células TK6 cultivadas e não induz micronúcleos neste sistema de teste, nas condições testadas desse estudo. Esse mesmo ensaio foi realizado com o sulfato de sódio (um contaminante da preparação de CGTase). O sulfato de sódio não foi tóxico para células TK6 cultivadas nas doses testadas. Não foi observado em nenhuma da dose testadas alguma precipitação. Nenhuma mudança de pH foi observada com base na mudança de cor do meio. Como a indução de micronúcleos foi menos de 3 vezes maior do que o controle do veículo em todas as doses com e sem S9, a resposta geral foi considerada, também, negativa. Esses dados indicam que, o sulfato de sódio não é tóxico para células TK6 cultivadas e não induz micronúcleos neste sistema de teste, nas condições de teste utilizadas neste estudo (Maronpot et al, 2016).

4. Conclusão

Ao longo dos anos foi possível observar através de várias pesquisas que os estudos in vivo para analisar eficácia e segurança dos produtos cosméticos além terem um custo exagerado, demandarem um longo período de tempo para serem realizados, são um potencial perigo para os voluntários clínicos e requerem uma enorme dificuldade para conseguir autorização do comitê de ética. Por isso, houve uma crescente necessidade e interesse em empregar testes in vitro para obter os resultados já mencionados, pois estes, além de oferecerem um maior-custo benefício, são menos demorados e permitem diminuir a participação de voluntários humanos e de animais.

A partir disso, diante de todo o exposto, observou-se a importância da utilização dos métodos in vitro como uma alternativa viável e que garante avaliar a segurança dos produtos cosméticos. Sua aplicação permitiu avaliar a segurança e eficácia de um tratamento de piolhos sem agrotóxicos, verificar a citotoxicidade do bis-retinamoido metil quando comparado ao retinol, investigou a eficácia de despigmentação da hidroquinona, foi utilizado para avaliar a genotoxicidade de alguns produtos químicos, analisou e comprou que o óleo de cavalo encapsulado em uma microagulha de dissolução cosmética é capaz de hidratar e restaurar a pele e por fim, demonstrou que a ciclodextrina glucanotransferase, utilizada comercialmente na produção de cosméticos não é tóxica para células, nas condições de testes realizados.

Através desta pesquisa identificou-se que há evidências na literatura sobre a relevância da aplicação dos testes in vitro. No entanto, ainda são muitos os estudos que não utilizam tais métodos para investigar a segurança dos cosméticos. Diante disso, sugere-se a realização de estudos futuros, inclusive a nível nacional, que busquem reunir ainda mais evidências clínicas acerca da aplicação de testes in vitro na garantia da segurança dos produtos cosméticos.

Referências

- Aardema, M. J., Barnett, B. B., Mun, G. C., Dahl, E. L., Curren, R. D., Hewitt, N. J., & Pfuler, S. (2013). Evaluation of chemicals requiring metabolic activation in the EpiDerm™ 3D human reconstructed skin micronucleus (RSMN) assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 750(1-2), 40-49.
- Akhtar, N., Khan, B. A., Mahmood, T., Parveen, R., Qayum, M., Anwar, M., & Farooq, M. (2010). Formulation and evaluation of antisebum secretion effects of sea buckthorn w/o emulsion. *Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences*, 2(1), 7-13.
- Ashawat, M., Banchhor, M., Saraf, S., & Saraf, S. (2009). Herbal Cosmetics: " Trends in Skin Care Formulation". *Pharmacognosy Reviews*, 3(5), 9-82.
- Datta, H. S., & Paramesh, R. (2010). Trends in aging and skin care: Ayurvedic concepts. *Journal of Ayurveda and integrative medicine*, 1(2), 3-110.

- de Oliveira Ramos, M., de Oliveira Ramos, D., de Freitas, Z. M. F., Monteiro, M. S. D. S. B., & dos Passos, M. M. B. (2022). Perfil das notificações por cosméticos reportadas ao Notivisa, Brasil. *Research, Society and Development*, 11(2), e42511223050-e42511223050.
- European Commission. (2003). Directive 2003/15/EC of the European Parliament and of the Council of 27 February 2003 amending Council Directive 76/768/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products. *Official Journal of the European Union*, 46, 26-35.
- González, S., Fernández-Lorente, M., & Gilaberte-Calzada, Y. (2008). The latest on skin photoprotection. *Clinics in dermatology*, 26(6), 26-614.
- Greive, K. A., Lui, A. H., Barnes, T. M., & Oppenheim, V. J. (2012). Safety and efficacy of a non-pesticide-based head lice treatment: Results of a randomised comparative trial in children. *Australasian journal of dermatology*, 53(4), 255-263.
- Junqueira Luiz, C., & Carneiro, J. (2013). *Histología básica. Texto y atlas. 12va ed. Brasil: Editorial Guanabara Koogan.*
- Kakushi, L. E., & Évora, Y. D. M. (2016). Social networking in nursing education: integrative literature review. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*, 24.
- Kale, S., Kavade, E., & Yadav, A. V. (2012). Formulation and in-vitro evaluation for sun protection factor of *Crinum asiaticum* Linn flower (Family-Amaryllidaceae) extract sunscreen creams. *Indian J. Pharm. Educ*, 46, 112-119.
- Kim, K. H., Lim, D. G., Lim, J. Y., Kim, N. A., Park, S. H., Cho, J. H., & Jeong, S. H. (2015). Chemical stability and in vitro and clinical efficacy of a novel hybrid retinoid derivative, bis-retinamido methylpentane. *International Journal of Pharmaceutics*, 495(1), 93-105.
- Lee, C., Eom, Y. A., Yang, H., Jang, M., Jung, S. U., Park, Y. O., & Jung, H. (2018). Skin barrier restoration and moisturization using horse oil-loaded dissolving microneedle patches. *Skin Pharmacology and Physiology*, 31(3), 163-171.
- Maronpot, R. R., Hobbs, C. A., Davis, J., Swartz, C., Boyle, M., Koyanagi, M., & Hayashi, S. M. (2016). Genetic and rat toxicity studies of cyclodextrin glucanotransferase. *Toxicology Reports*, 3, 381-392.
- Mendes, K. D. S., Silveira, R. C. D. C. P., & Galvão, C. M. (2008). Revisão integrativa: método de pesquisa para a incorporação de evidências na saúde e na enfermagem. *Texto & contexto-enfermagem*, 17, 758-764.
- Nishida, H., Hirota, M., Seto, Y., Suzuki, G., Kato, M., Kitagaki, M., & Onoue, S. (2015). Non-animal photosafety screening for complex cosmetic ingredients with photochemical and photobiochemical assessment tools. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 72(3), 578-585.
- Orton, D. I., & Wilkinson, J. D. (2004). Cosmetic allergy. *American journal of clinical dermatology*, 5(5), 327-337.
- Roy, A., Sahu, R., Matlam, M., Deshmukh, V., Dwivedi, J., & Jha, A. (2013). In vitro techniques to assess the proficiency of skin care cosmetic formulations. *Pharmacognosy reviews*, 7(14), 97.
- Sgardi, F. C., do Carmo, E. D., & Rosa, L. F. B. (2007). Radiação ultravioleta e carcinogênese. *Revista de Ciências Médicas*, 16(4/6).
- Soares, C. B., Hoga, L. A. K., Peduzzi, M., Sangaleti, C., Yonekura, T., & Silva, D. R. A. D. (2014). Integrative review: concepts and methods used in nursing. *Revista da Escola de Enfermagem da USP*, 48, 335-345.
- Sousa, J. R. de, & Santos, S. C. M. dos. (2020). Análise de conteúdo em pesquisa qualitativa. *Revista Pesquisa E Debate Em Educação*, 10(2), 1396-1416.
- UNION, P. (2009). Regulation (EC) No 1223/2009 of the european parliament and of the council. *Official Journal of the European Union L*, 342, 59-209.
- Wang, F., Zhang, C., & Wang, B. (2021). Application of in vitro methods to evaluate the safety of baby care products. *Toxicology in Vitro*, 75, 105194.
- Won, Y. K., Loy, C. J., Randhawa, M., & Southall, M. D. (2014). Clinical efficacy and safety of 4-hexyl-1, 3-phenylenediol for improving skin hyperpigmentation. *Archives of dermatological research*, 306(5), 455-465.