

Simone de Almeida Ribeiro

**Identificação de métodos para descoberta de novos princípios ativos com  
atividade antienvhecimento.**

Rio de Janeiro

2013

Simone de Almeida Ribeiro

**Identificação de métodos para descoberta de novos princípios ativos com atividade antienvhecimento.**

Dissertação apresentada, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, do Instituto de Tecnologia em Fármacos - FIOCRUZ

Orientadora: Prof<sup>ta</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mariana Conceição de Souza

Rio de Janeiro

2013

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Medicamentos e Fitomedicamentos/ Farmanguinhos / FIOCRUZ - RJ

R484i            Ribeiro, Simone de Almeida

Identificação de métodos para descoberta de novos princípios ativos com atividade antienvhecimento. / Simone de Almeida Ribeiro . – Rio de Janeiro, 2013.

xv, 65f ; 30 cm.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Mariana Conceição de Souza

Dissertação (mestrado) – Instituto de Tecnologia em Fármacos – Farmanguinhos, Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, 2013.

Bibliografia: f. 54-62

1. Cosméticos anti-idade. 2. Métodos alternativos. 3. Fluxograma  
4. Título.

CDD 660.6

Simone de Almeida Ribeiro

**Identificação de métodos para descoberta de novos princípios ativos com atividade antienvhecimento.**

Dissertação apresentada, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, do Instituto de Tecnologia em Fármacos – Fundação Oswaldo Cruz

Aprovada em 26 de fevereiro de 2013.

Banca Examinadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carmen Penido  
Instituto de Tecnologia em Fármacos – FIOCRUZ (Presidente da Banca)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elaine Cruz Rosas  
Instituto de Tecnologia em Fármacos – FIOCRUZ

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Monica Freiman  
Instituto de Tecnologia em Fármacos - FIOCRUZ

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria das Graças Henriques  
Instituto de Tecnologia em Fármacos – FIOCRUZ

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Erika Martins  
Instituto de Tecnologia em Fármacos – FIOCRUZ

Rio de Janeiro

2013

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, Maria Alice e Agápito, por todo apoio, carinho e em especial, por me ensinarem todos os dias, o valor do conhecimento. Aos meus irmãos, amigos e familiares pelo carinho, torcida e apoio durante a elaboração deste trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que iluminou e guiou meus passos, em sua infinita sabedoria.

Agradeço aos meus pais Maria Alice de Almeida Ribeiro e Agápito Rojas Ribeiro, por serem meus pilares de sustentação, me apoiando sempre nos momentos mais importantes da minha vida.

A minha querida tia, Laudelira Rita d'Almeida, que nunca mediu esforços para me ajudar com a minha formação, cursos e viagens;

Ao meu namorado Ronaldo da Silva Cavalcanti, pelo companheirismo, compreensão, carinho e atenção;

A minha orientadora, Dra. Mariana Conceição de Souza, pelo incentivo, amizade e sem a qual, jamais teria chegado até aqui;

As minhas queridas amigas de trabalho, Neise O. C. Avelar e Ana Paola C. Fazio, pelo apoio e compreensão nos dias em que não pude comparecer;

Em especial ao meu amigo de trabalho Vando Nascimento por todo apoio e ajuda para conclusão deste trabalho;

Vera Carolina Bordallo Bittencourt e Carla Ribeiro Polycarpo pela inspiração para a confecção deste trabalho e de outros projetos;

A toda equipe Dermage, em especial, a Lisabeth Braun, pelo apoio e pela compreensão dos dias em que estive ausente no trabalho.

## CATALOGAÇÃO NA FONTE

•

Na versão impressa, deverá constar no verso da folha de rosto.  
Formatar a fonte conforme o modelo escolhido para todo o trabalho (Arial ou Times New Roman)

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese/dissertação, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

“Se a fé remove até montanhas, o desejo é o que torna o irreal possível.”

*Cássia Eller*



## RESUMO

RIBEIRO, Simone de Almeida Identificação de métodos para descoberta de novos princípios ativos com atividade antienvhecimento. 2013. Dissertação Mestrado Profissional em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2013.

Atualmente um ser humano vive mais tempo do que há 100 anos, porém sob forte estresse e em um meio ambiente altamente poluído. Essa nova realidade fez aumentar a incidência de doenças como câncer e doenças crônico-degenerativas. Em contrapartida as indústrias farmacêuticas e cosméticas buscaram alternativas para o tratamento dessas novas doenças e para melhora do bem-estar e aparência da população, respectivamente. No entanto, especialistas da área dermatológica chamam a atenção para o uso indiscriminado dos produtos cosméticos, principalmente devido ao marketing exagerado visando à venda destes produtos. Sendo assim, é importante que tanto a eficácia, assim como a segurança desses produtos seja avaliada. Devido a razões científicas e éticas, determinar esses testes *in vitro* se tornou um objetivo essencial e fundamental em todo o mundo. O presente trabalho tem como objetivo avaliar os métodos descritos na literatura para descoberta de princípios ativos com atividade antienvhecimento visando o desenvolvimento de cosmecêuticos, levando-se em consideração a avaliação de segurança e eficácia das substâncias testadas. Métodos *in vitro* foram selecionados em revistas indexadas, patentes e legislação nacional vigente. Por ser uma classe recente, a legislação que regulamenta o registro de cosmecêuticos com atividade antienvhecimento não existe. Observamos ainda, uma grande quantidade de métodos onde é possível avaliar a eficácia de substâncias quanto sua atividade hidratante, antirrugas, despigmentante, fotoprotetora, anti-inflamatória e antiinflacidez. Com isso, podemos concluir que mesmo com a escassez de legislação para regulamentar cosmecêuticos, existem técnicas descritas na literatura, validadas ou não, que estão de acordo com os princípios dos “três Rs” de Russel e Burch, e são úteis para avaliar a atividade antienvhecimento de princípios ativos.

Palavras-chave: Cosméticos anti-idade. Métodos alternativos. Fluxograma.

## ABSTRACT

Nowadays the humans live longer than 100 years ago, but under severe stress and in a highly polluted environment. This new reality has increased the incidence of diseases such as cancer and chronic degenerative diseases. In contrast to pharmaceutical and cosmetic industries sought alternatives to treat these new diseases and improved well-being and appearance of the population, respectively. However, specialists in dermatology draw attention to the widespread use of cosmetic products, mainly due to marketing hype aimed at selling these products. Therefore, it is important that both the effectiveness and safety of these products are evaluated. Due to scientific and ethical reasons, these tests determine *in vitro* has become an essential objective and fundamental worldwide. This study aims to evaluate the methods described in the literature for discovery of active ingredients with anti-aging activity aimed at developing cosmeceuticals, taking into account the evaluation of safety and efficacy of the tested substances. *In vitro* methods were selected in refereed journals, patents and current national legislation. Because it is a recent class, the legislation governing the registration of cosmeceuticals in antiaging activity does not exist. We also observed a large quantity of methods in which you can evaluate the effectiveness of substances as their activity moisturizer, wrinkle, depigmentation, sunscreen, anti-inflammatory and anti-sagging. With this, we can conclude that even with the lack of legislation to regulate cosmeceuticals, are described in the literature, validated or not, that is in accordance with the principles of the “three Rs” of Russell and Burch, and is useful to evaluate the activity anti-aging active ingredients.

Keywords: Anti-aging cosmetics. Alternative methods. Flowchart.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Estrutura da pele normal mostrando as camadas da epiderme, derme e hipoderme.....	18
Figura 2 –	Esquema da epiderme humana.....	18
Figura 3 –	Acúmulo de células senescentes pode promover a perda de integridade e função da pele com a idade.....	21
Figura 4 –	Características histológicas da pele jovem e envelhecida protegida do sol.....	22
Figura 5 –	Amostras histológicas pele envelhecida.....	23
Figura 6 –	Diferenças na pele fotoprotegida (A) e fotoexposta (B) na parte interna e externa superior do braço.....	24
Figura 7	Participação das EROs em múltiplas etapas das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAP Kinase – “ <i>Mitogen activated protein kinases</i> ”).....	26
Figura 8	Reconstrução de pele <i>in vitro</i> .....	
Figura 9	Visioscan® VC98 e software SELS 2000 da empresa Courage 1 Khazaka electronic GmbH .....	38 40
	Determinação da metodologia <i>in vitro</i> de escolha.....	
Figura 10		42

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Apelos comerciais utilizados para aumentar as vendas de produtos cosmecêuticos.....	15
Tabela 2 - Mudanças estruturais da pele envelhecida.....	24
Tabela 3 Testes pré-clínicos para avaliação de segurança em ingredientes cosméticos sugeridos pelo “Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos”.....	31 33
Tabela 4 - Métodos Alternativos propostos no guia para avaliação de segurança de ingredientes e produtos cosmético.....	34
Tabela 5 – Testes clínicos de compatibilidade e aceitabilidade para avaliação de segurança em ingredientes cosméticos sugeridos pelo “Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos” .....	37
Tabela 6 - Métodos alternativos aprovados ou em fase de aprovação no sistema de acompanhamento para revisão de métodos alternativos.....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BCOP	Opacidade e Permeabilidade de Córnea Bovina ( <i>Bovine corneal opacity and permeability</i> )
BRACVAM	Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos
COLIPA	Associação Européia de Cosméticos, Produtos de Higiene e Perfumaria ( <i>The European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association</i> )
DMPnp	Dose mínima pigmentária em uma pele não protegida
DMPp	Dose mínima pigmentária em uma pele protegida
ECVAM	Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos ( <i>European Center for Validation of Alternative Methods</i> )
FDA	Administração de Alimentos e Drogas ( <i>Food and Drug Administration</i> )
FD&C Act	Lei Federal de Drogas, Alimentos e Cosméticos ( <i>Federal Food, Drug and Cosmetic Act</i> )
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FRAME	Fundo para a substituição de experimentos com animais médicos ( <i>Fund for Replacement of Animal Medical Experiments</i> )
HET-CAM	Teste em Membrana Cório-Alantóide de Ovo Embrionado de Galinha ( <i>Hen's Egg Test - Chorioallantoic Membrane</i> )
ICCVAM	Comitê de Coordenação Interagências sobre Validação de Métodos Alternativos ( <i>Interagency Coordinating Committee on the Validation of</i>

*Alternative Methods)*

INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
JACVAM	Centro Japonês de Validação de Métodos Alternativos ( <i>Japanese Center for the Validation of Alternative Methods</i> )
MTT	Ensaio de captação do corante Tetrazólio ( <i>Methyl-thiazol-tetrazolium</i> )
NRU	<i>Neutral Red Uptake</i> – Ensaio de captação do corante Vermelho Neutro
OECD	Organização para cooperação econômica e desenvolvimento ( <i>Organization for Economic Cooperation and Development</i> )
PPD	Pigmento do escurecimento persistente ( <i>Persistent pigment darkening</i> )
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
ROS	Espécies reativas de oxigênio ( <i>Reactive oxygen species</i> )
ZEBET	Centro de Documentação e Avaliação de Métodos Alternativos e Complementares de Experimentação Animal ( <i>Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch</i> )

## SUMÁRIO

1.	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
1.1	<b>Considerações gerais</b> .....	13
2.	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
2.1	<b>Estrutura e função da pele normal</b> .....	19
2.2	<b>Mudanças estruturais da pele envelhecida</b> .....	
2.3	<b>Mecanismos envolvidos no envelhecimento cronológico e no fotoenvelhecimento da pele</b> .....	24 25
2.3.1	<u>Causas da senescência celular</u> .....	25
2.3.1.1	Teoria dos radicais livres.....	27
2.3.1.2	Desgaste dos telômeros.....	27
2.3.1.3	Senescência iniciada por dano ao DNA.....	27
2.3.1.4	Fatores extrínsecos.....	28
2.4.	<b>Cosméticos</b> .....	30
3.	<b>OBJETIVO</b> .....	30
3.1	<b>Objetivo principal</b> .....	30
3.2	<b>Objetivo específicos</b> .....	30
4.	<b>METODOLOGIA</b> .....	32
5.	<b>RESULTADOS</b> .....	
5.1	<b>Levantamento da legislação vigente que versa sobre reconhecimento e registro de cosméticos</b> .....	32
5.2	<b>Levantamento de métodos para avaliação de eficácia clínica e in vitro de cosméticos</b> .....	37 37
5.2.1	<u>Fotoproteção</u> .....	37
5.2.1.1	Avaliação de eficácia da proteção UVA.....	37
5.2.1.2	Avaliação de eficácia da proteção UVB.....	
5.2.2	<u>Avaliação da hidratação para pele: determinação do conteúdo aquoso do estrato córneo</u> .....	38 39
5.2.3	<u>Avaliação do efeito redutor de rugas e linha de expressão</u> .....	39
5.2.4	<u>Avaliação do efeito imunoprotetor</u> .....	39
5.2.5	<u>Avaliação da redução da flacidez</u> .....	40

5.2.6	<u>Depigmentante</u> .....	40
5.2.7	<u>Avaliação do efeito protetor ao DNA</u> .....	41
5.3	<b>Fluxo de trabalho sugerido para descoberta de novos princípios ativos</b>	53
6.	<b>com atividade antienvhecimento</b>	44
7.	<b>DISCUSSÃO</b> .....	56
8.	<b>CONCLUSÃO</b> .....	58
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Considerações Gerais

O crescimento industrial-tecnológico oferece inúmeros benefícios que agilizam o cotidiano do ser humano. No entanto, tal crescimento cobra um preço alto. Atualmente um ser humano vive mais tempo do que há 100 anos, porém sob forte estresse e em um meio ambiente altamente poluído. Essa nova realidade fez aumentar a incidência de doenças como câncer e doenças crônico-degenerativas. Em contrapartida, a indústria farmacêutica acompanhou o crescimento industrial e suas consequências, sempre procurando alternativas terapêuticas para o tratamento dessas novas doenças.

Como todos os outros órgãos do corpo humano, a pele sofre mudanças fisiológicas e morfológicas com o avançar da idade e fornece as primeiras evidências do processo de envelhecimento. No entanto, o avanço dos procedimentos e tratamentos cosméticos permite que sinais visíveis relacionados ao envelhecimento da pele sejam atenuados.

O termo cosmecêutico foi introduzido em 1961 por Raymond Reed, com o intuito de definir cosméticos com atividade comprovada cientificamente. Já em 1984 Dr. Albert Kligman refinou a definição e caracterizou cosmecêutico como uma classe de cosméticos com atividades terapêuticas, que ajudam a cuidar da saúde da pele ou mucosas da área externa do corpo, como boca e genitais, ajudando a evitar envelhecimento precoce, câncer, danos causados pela longa exposição à luz solar ou a agentes químicos entre outros (NEWBURGER, 2009). Entre os cosmecêuticos mais usados podemos destacar os desodorantes antitranspirantes, xampu anticaspa, sabonetes ou cremes corporais com óleos essenciais com apelo aromaterápico (calmante, estimulante, energizante, etc.), agentes fotoprotetores e antienvelhecimento. A maioria dos cosmecêuticos disponíveis hoje em dia é destinada aos cuidados da pele, principalmente da face. Além do apelo estético, a pele da face, assim como a das mãos, está constantemente exposta aos agentes químicos do ambiente e aos raios solares, quando comparada a outras regiões do corpo, tais como, seio e região abdominal.

Os dermocosméticos são cosmecêuticos indicados ou não por dermatologistas que unem a eficácia de um item farmacêutico de tratamento ao resultado estético proporcionado pelos cosméticos (DRAELOS, 2009). Entretanto, produtos que prometem melhorar a

aparência da pele, tais como: cremes antirrugas, agentes clareadores ou antienvelhecimento, não se encaixam em nenhuma das classificações regulamentadas pela ANVISA. Como consequência da falta de classificação, não há exigência adequada da comprovação de segurança e/ou eficácia, bem como informações e cuidados, modo e restrições de uso deste tipo de produto. A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) na Resolução da Diretoria Colegiada - RDC no. 211 de 4 de julho de 2005 classifica cosméticos, produtos de higiene pessoal e perfumes como

“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 e ou corrigir odores corporais e ou protegê-los ou mantê-los em bom estado”.

Na referida resolução, tais produtos são divididos ainda em Grau 1 ou 2 de acordo com sua ação fim. Produtos do Grau 1 são aqueles que

“se caracterizam por possuírem propriedades básicas ou elementares, cuja comprovação não seja inicialmente necessária e não requeiram informações detalhadas quanto ao seu modo de usar e suas restrições de uso, devido às características intrínsecas do produto”,

como, por exemplo, sabonetes, xampus (que não sejam anticaspa ou antiqueda), maquiagem sem fotoproteção, creme dental entre outros. Já produtos classificados no Grau 2

“são aqueles que possuem indicações específicas, cujas características exigem comprovação de segurança e/ou eficácia, bem como informações e cuidados, modo e restrições de uso”

como maquiagem com fotoproteção, creme dental anticárie ou antitártaro, xampu anticaspa, antitranspirante axilar, antirrugas entre outros.

Atualmente tanto na ANVISA, quanto no "Food and Drugs Administration" (FDA) cabe ao fabricante registrar o produto como cosmético ou medicamento. No entanto, pela facilidade, os fabricantes fazem o registro como cosmético. É importante ressaltar que especialistas da área dermatológica chamam a atenção para o uso indiscriminado deste tipo de produto pela população e apontam três principais motivos: a) não há necessidade de prescrição médica para a aquisição deste tipo de produto; b) a variedade de produtos que existe a disposição da população e, finalmente; c) o “marketing” exagerado visando a venda destes produtos. Segundo esses mesmos especialistas, esses problemas não existiriam se os cosmeceuticos fossem regulamentados pelas agências nacionais de saúde e/ou vigilância sanitária do mundo todo. Para isso é imprescindível que regras sejam estabelecidas para que um princípio ativo ou uma formulação seja considerado um cosmeceutico (DRAELOS, 2009).

Recentemente, NEWBURGER (2009) discorreu sobre alguns equívocos que estão diretamente relacionados a esse tipo de produto, tais como: cosmecêuticos são regulados como medicamentos, sua finalidade foi aprovada por agências reguladoras antes de entrar no mercado, os ingredientes utilizados foram testados e seus mecanismos de ação estabelecidos antes de entrar no mercado, e ainda, por serem à base de produtos naturais não são tóxicos, todos falsos. O autor destaca ainda alguns apelos comerciais utilizados pelo setor de “marketing” das indústrias fabricantes de cosmecêuticos, que induzem o consumidor a comprar o produto. A tabela 1 resume alguns destes apelos comerciais. De forma interessante, apelos comerciais ressaltando a eficácia do produto são tão valorizados quanto apelos emocionais ou culturais.

Tabela 1- Apelos comerciais utilizados para aumentar as vendas de produtos cosmecêuticos.

<b>APELO FUNCIONAL</b>	<b>METODO REAL DE AVALIAÇÃO FUNCIONAL</b>
Testado clinicamente	Passou por avaliação clínica feita por autoridades no assunto.
Testado em laboratório	Passou por avaliação pré-clínica <i>in vitro</i> e/ou <i>in vivo</i> . Tem as atividades sobre a fisiologia celular bem definida.
Experiência pessoal	A avaliação é feita pelo consumidor. A indústria estimula o consumidor a “sentir” os efeitos, como “pele mais lisa”, “ajuda a reduzir os efeitos...”.
Formulação diferenciada	Utiliza termos como “5x mais concentrado” ou “5% de <i>Aloe vera</i> ”, deixando o consumidor sem saber exatamente da concentração final do ingrediente ativo. Não há avaliação real, apenas induz o consumidor a acreditar que um produto mais concentrado é mais eficaz.
Características segurança	Produto foi avaliado quanto à segurança em seu uso.
Depoimentos pessoais	Utilização de testemunhos de celebridades ou doutores-atores que testaram e aprovam o uso do produto.
Apelo cultural/ecológico	A indústria usa a prerrogativa de que não há necessidade de avaliação funcional, pois utiliza ingredientes “100% naturais”, “não utilizado em animais de laboratório”, “DNA vegetal”.
Apelo de superioridade	A indústria usa prerrogativa de superioridade, no entanto não revela os produtos que estão sendo comparados.

Apelo emotivo	A indústria usa prerrogativa emocional como “por que eu mereço”.
---------------	--

Adaptado de Newburger, 2009.

Os testes de toxicologia e eficácia que os órgãos reguladores indicam para coletar essas informações estão ultrapassados, e são em grande parte baseados em experimentos com uso de animais e muitas vezes mal interpretados (ABBOT, 2005). No entanto, devido à evolução técnico-científica, na década de 80 iniciou-se o desenvolvimento de modelos experimentais alternativos para a área cosmética, visando substituição do uso de animais de laboratórios para avaliação principalmente do perfil de segurança, de acordo com a “European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association” (ECTPA), órgão que representa a indústria de cosméticos na Europa globalmente. De fato, no início de 2003 a Diretiva de Cosméticos da União Européia estipulou o fim imediato do uso de animais para teste de segurança de produtos cosméticos, impondo a data limite de 2013 para substituição de todos os testes *in vivo* por testes alternativos *in vitro* (ADLER, 2011).

Os métodos alternativos são definidos pelos “três Rs”, termo descrito pela primeira vez por Russel e Burch em 1959, no qual hoje se baseiam os princípios dos guias para pesquisa com o uso de animais: “reduction” (redução), “refinement” (refinamento) e “replacement” (substituição) (WEIGHARDT, 2009). Alguns destes métodos vêm sendo utilizados desde os tempos remotos, em particular na área de mutagenicidade onde numerosos testes foram desenvolvidos, validados e integrados nas diretivas internacionais tais como a “Organisation for Economic Cooperation and Development” (OECD).

Embora os produtos cosméticos sejam aplicados topicamente, um ou mais ingredientes podem permear a barreira cutânea, sendo parcial ou totalmente absorvidos. Desta forma, a avaliação do risco potencial do produto nas condições normais ou razoavelmente previsíveis de uso, como por exemplo, xampu nos olhos, é essencial. (ANVISA, 2005). Apesar da preocupação com a segurança, não existem regras claras para o teste de eficácia de cosméticos. No caso de medicamentos, algumas regras devem ser cumpridas para que haja o registro do medicamento. Algumas dessas regras incluem a comprovação a partir de testes de eficácia de que o medicamento funciona para o fim sugerido pelo fabricante (BRASIL, 2005). Já no caso de cosméticos e principalmente cosmecêuticos não existem regras que imponham a necessidade de comprovação da eficácia do produto para o fim destinado. De fato, os testes de eficácia muitas vezes acontecem após a venda do produto (PANICH, 2011).

Desta forma é imperativo que, no desenvolvimento de cosméticos, se tenha um fluxo de trabalho que garanta não só a segurança do produto, mas também a sua eficácia. A CCD (Cosmética Científica Dermatológica Comércio e Indústria Ltda) atua desde 2002 investindo

em Pesquisa e Desenvolvimento de produtos cosméticos. A CCD tem como principal objetivo a produção e comercialização de cosméticos, por este motivo, possui produtos voltados para cada uma das segmentações desta classe de produtos, como por exemplo: a Linha Photoage (protetor solar), Hidracare (hidratação), Age Inverse (anti-idade) e Secatriz (antiacne), todos com teste de segurança exigidos pela ANVISA. No Brasil esse mercado já fatura aproximadamente R\$1 bilhão por ano com um crescimento anual de 15%. O público-alvo desse mercado compreende principalmente as mulheres que a cada ano que passam buscam cada vez mais cedo não só o tratamento como a prevenção do envelhecimento da pele. Atualmente, no Brasil, os principais concorrentes são empresas estrangeiras, principalmente as francesas como LaRoche Posay e Vichy, mas há uma grande oportunidade para empresas brasileiras já que as estrangeiras não fabricam todos os produtos no Brasil, deparando-se muitas vezes com falta dos produtos nos pontos de venda devido a problemas nos trâmites de importação.

Desta forma, entendemos que a idealização de uma metodologia de trabalho, considerando os princípios éticos dos “três Rs”, para o estabelecimento de teste de segurança e eficácia de produtos cosméticos, não só ajudará a estabelecer regras para a descoberta de novos princípios ativos com atividade antienvhecimento, como ainda fortalecerá a indústria farmacêutica brasileira.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Estrutura e função da pele normal**

A epiderme, ou simplesmente pele, é a camada mais externa do corpo humano. É composta por múltiplas camadas: a camada superior composta por queratinócitos, a camada intermediária composta por células espinhosas e a camada mais interna ligada à lâmina basal composta por células basais (Alberts, 1989). É interessante notar que, apesar das diferenças morfológicas e funcionais de cada camada, todas são oriundas de células-tronco presentes na camada basal. De fato, as células já diferenciadas oriundas da camada basal são “empurradas” para as camadas superiores e substituem células mortas. A pele é composta por três camadas: epiderme, derme e hipoderme (Figura 1).

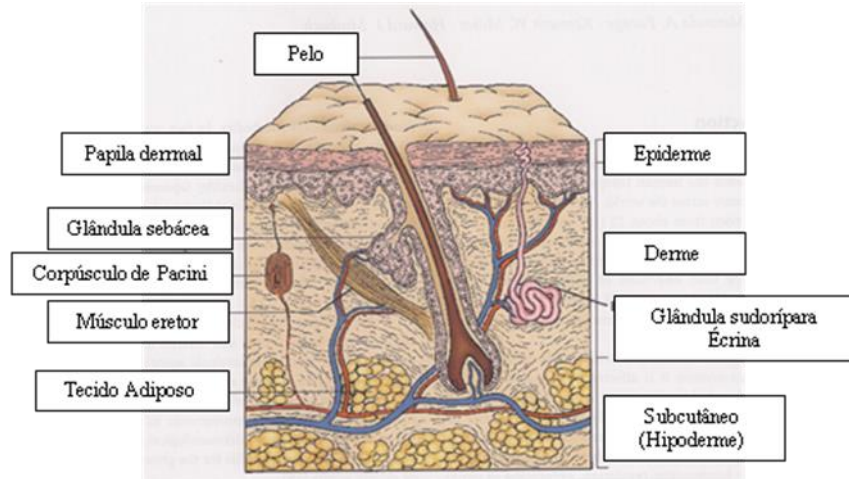


Figura 1: Estrutura normal da pele mostrando as camadas epidérmica, dérmica e hipodérmica. Adaptado de Miranda, 2010.

A epiderme é a camada mais externa e contém principalmente queratinócitos com uma pequena população de melanócitos e células do sistema imune (células de Langerhans). Os queratinócitos compõem o epitélio estratificado formando uma camada que mede de 50 a 100  $\mu\text{m}$  de espessura dependendo do sítio anatômico e do indivíduo. Os queratinócitos epidérmicos têm origem em uma única camada de células na membrana basal, camada localizada entre a derme e epiderme. As células produzidas nesta camada se movimentam para cima em direção ao estrato espinhoso e granuloso para formar o estrato córneo, formando por células mortas, mas não quimicamente inertes (REES, 2004) (Figura 2).

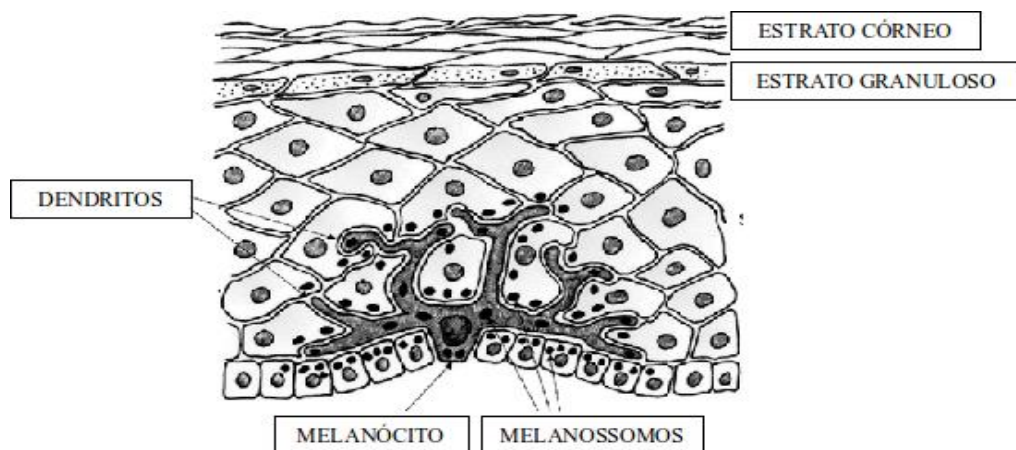


Figura 2: Esquema da epiderme humana. Adaptado de Rees, 2004.

O estrato córneo é formado por corpos celulares achatados oriundos de queratinócitos mortos, chamados corneócitos. O estrato córneo tem em média quinze camadas de células na maior parte do corpo, variando entre três camadas na pele fina dos olhos e cinquenta camadas na palma das mãos e sola dos pés. Quanto a sua constituição, o estrato córneo compreende cerca de 60% de proteínas estruturais, 20% de água e 20% de lipídios, tornando tal estrato um tecido dinâmico e metabolicamente interativo (MIRANDA, 2010).

Os corneócitos do estrato córneo são cobertos por um envelope altamente entrelaçado. O lipídio lamelar extracelular que envolve essas células é composto por ceramidas, ácido graxos de cadeias longas e colesterol formando uma barreira que, em adultos saudáveis, mantém o conteúdo de água viável de aproximadamente 70% na epiderme (CASPER, 2003). Esses lipídeos, assim como o sebo, fator natural de hidratação (FNH), ácidos orgânicos e íons inorgânicos, são responsáveis pela retenção de água no estrato córneo. Outros componentes em minoria também contribuem para manter a hidratação da pele. Foi demonstrado que o ácido hialurônico, o maior componente que retém água na derme, faz parte de uma via de proteção de barreira e hidratação do estrato córneo. O ácido hialurônico é observado não só na derme, mas também na epiderme. A síntese do ácido hialurônico pelos queratinócitos subjacentes, assim como a presença desta macromolécula no próprio estrato córneo normal, foi comprovada por SAIKA et al. (2000), através da cultura de pele de ratos com N-glucosamina-[H3] (SAIKA, 2000).

Quando a função barreira e a capacidade de reter água do estrato córneo estão comprometidas, o ressecamento patológico da pele pode ocorrer tornando-a menos flexível, resultando no surgimento de rachaduras e fissuras na pele (McCALLION, 1993).

A derme é a camada densa e irregular de tecido conectivo que compreende a maior parte da espessura da pele. Sua principal função é fornecer uma matriz de suporte para as estruturas ali embebidas como, por exemplo, vasos e nervos. É composta principalmente de fibras altamente estáveis, predominantemente de colágeno e aproximadamente 5% de elastina. Os fibroblastos são as células que sintetizam todos os componentes da matriz, colágeno, elastina e substância fundamental. (BALIN, 1989). O colágeno presente neste tecido contribui para a sua força tensora. Já a elastina fornece elasticidade e resistência. Outros componentes capazes de reter água, como por exemplo, o ácido hialurônico, são responsáveis pelo turgor da derme e as glicosaminoglicanas oferecem o suporte as estruturas da derme (BRINCAT, 2005).

## **2.2 Mudanças estruturais da pele envelhecida**

A pele é um órgão com características únicas e que sofre ação tanto de fatores intrínsecos (p.ex. regulação gênica), quanto extrínsecos (p.ex. exposição à UVA/UVB) (FARAGE, 2010). É nela onde as mudanças associadas com a idade são mais visíveis (SATOR, 2006). Quando começamos a envelhecer, nossa pele torna-se mais fina e flácida,

formando facilmente linhas finas na superfície do corpo onde há movimento caracterizando o visual envelhecido dos indivíduos (TAGAMI, 2008). Na pele, o envelhecimento não é diferente do observado em outros órgãos. No entanto, a exposição intensa a agentes químicos, radiação ionizante e até radicais livres oriundos de má alimentação podem acelerar o processo de senescência e promover uma aparência e funcionalidade mais envelhecida a uma pele de pouca idade cronológica.

A anormalidade funcional mais consistente encontrada na pele envelhecida é o achatamento da interface dermo-epidérmica. Este processo ocorre por consequência da rarefação e redução da papila dermal (Figura 1). Entre os 30 e 90 anos de idade, a interdigitação dessas camadas diminui mais de 50%. Clinicamente, estas alterações moleculares e celulares são visíveis através do desenvolvimento de rugas, aspereza da pele aumentada, redução da elasticidade entre outros (SÜDEL, 2005). O conteúdo de água na pele envelhecida, particularmente no estrato córneo, é menor que na pele jovem. Já é bem conhecida a correlação entre o tamanho dos corneócitos e a taxa de renovação do estrato córneo, o que reflete na atividade proliferativa epidérmica. Ainda, a taxa de renovação do estrato córneo de uma pele envelhecida é menor na pele mais velha que na pele jovem. De fato já foi demonstrado que alguns corneócitos que cobrem a camada córnea envelhecida são significativamente mais largos que os da pele jovem (TAGAMI, 2008). Além dos fatores já descritos podemos também citar outras alterações funcionais identificadas durante o envelhecimento da pele, como o aumento do pH da superfície epidérmica, o que aumenta a susceptibilidade a infecções; a diminuição da percepção neurosensorial da dor em intensidade e velocidade (aumentando o risco de injúria térmica). Além disso, o declínio no conteúdo de lipídios reduz a eficácia de alguns medicamentos tópicos e as reações alérgicas e irritantes se tornam lentas e menos intensas o que compromete a capacidade da pele envelhecida de reparar danos e feridas (FARAGE, 2008).

A característica marcante deste órgão de possuir uma camada de célula basal composta por células não diferenciadas em grande atividade mitótica, atribui à ela a capacidade e facilidade de regeneração. Por outro lado, a intensa atividade mitótica pode resultar não em reposição celular, mas sim em um tipo diferenciado de células que possui características únicas (revisto em CAMPISI, 2005). Em 1965 Hayflick e colaboradores mostraram que após determinado número de divisões celulares, culturas de fibroblastos humanos não mais entravam em mitose, descrevendo assim, a senescência celular (HAYFLICK, 1965). Desde então, os fenótipos e as causas da senescência celular vêm sendo estudados. A célula senescente não está latente nem é totalmente diferenciada. Ela não possui uma característica



própria, mas um conjunto de características que podem levar à identificação de células em senescência (RODIER, 2011). Células senescentes são caracterizadas por estar em estágio de ciclo celular irreversível, aumento de tamanho em relação às células irmãs não senescentes, expressão de  $\beta$ -galactosidase, possuir disfunção nos telômeros e, por fim, produzir mediadores inflamatórios, proteases e fatores de crescimento (RODIER, 2011). Em roedores, primatas e humanos, células senescentes são encontradas em diversos tecidos renováveis, como endotélio vascular, células hematopoiéticas, estroma e órgãos ricos em tecido epitelial como trato gastro-intestinal e pele (JEYAPALAN, 2007; CAMPISI, 2007), e estão relacionadas a patologias relativas à idade avançada como osteoartrite e aterosclerose (CHANG, 1995; VASILE, 2001; PRICE, 2002) (Figura 3).

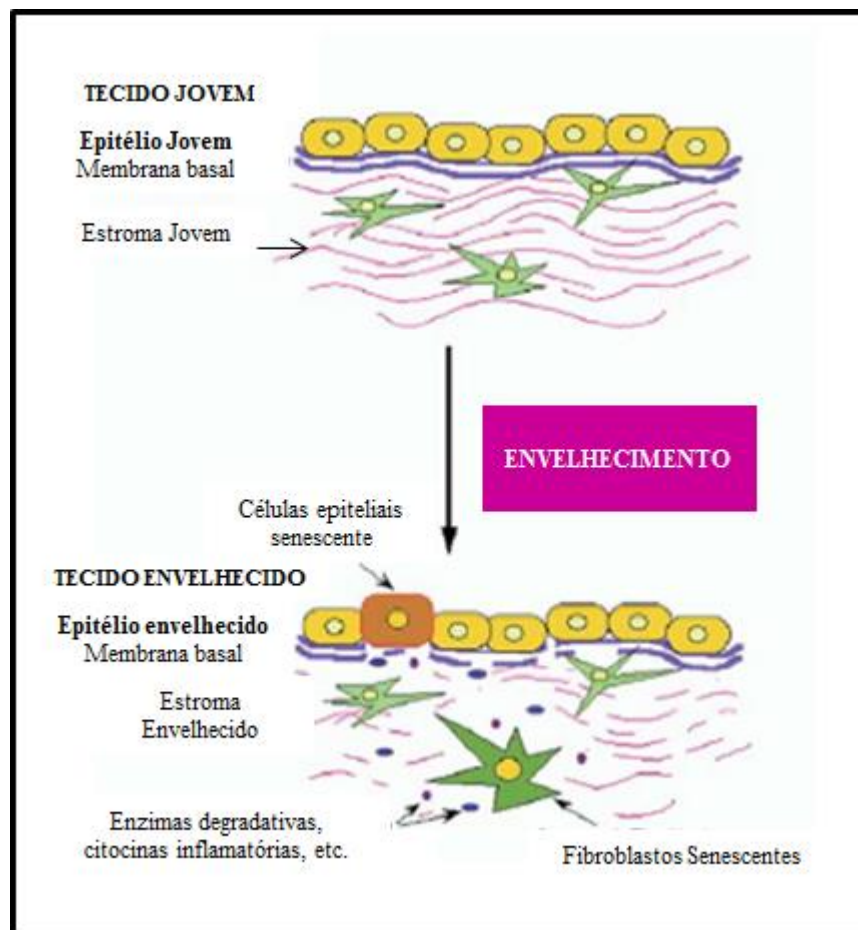


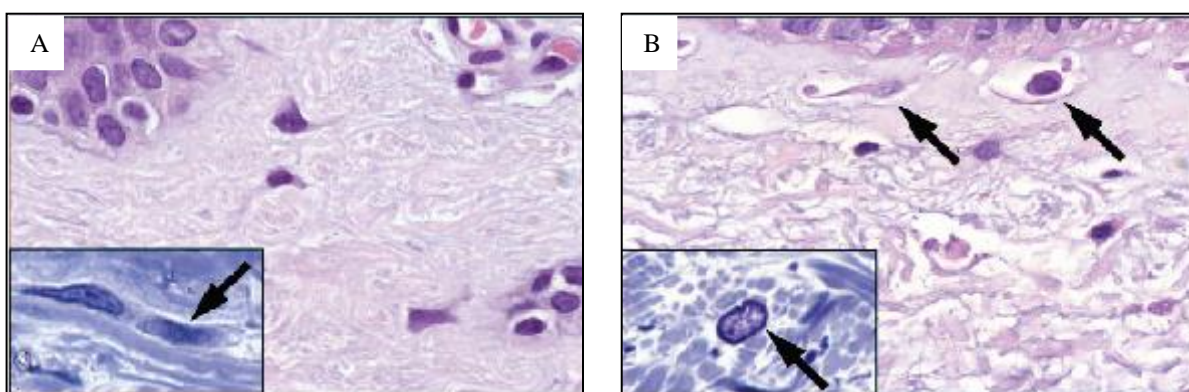
Figura 3: Acúmulo de células senescentes pode promover a perda de integridade e função da pele com a idade.

Adaptado de Campisi, 1998.

A redução de fibras de colágeno tipo I e III é uma característica do envelhecimento cronológico da pele e é aumentado pelo fotodano. Metaloproteinases (MMP), enzimas que degradam a matriz de colágeno, são estimuladas pela radiação ultravioleta (UV). A indução repetida dessas enzimas pela exposição solar ao longo dos anos ou décadas é responsável pela produção fragmentada de colágeno na pele. A quantidade total de colágeno diminui cerca de

1% ao ano ao longo da vida adulta, o colágeno produzido torna-se mais espesso ao longo dos anos, menos solúvel, exibindo menor capacidade de reter água, tornando-se menos resistente a digestão pela colagenase (FENSKE, 1986). Durante o envelhecimento cronológico da pele, as metaloproteinases aumentam gradativamente. Este fato foi observado em cultura de monocamada de células obtidas de indivíduos jovens e idosos. A degradação do colágeno existente, como esperado, foi observada, porém a síntese de novas moléculas de colágeno para substituição do material danificado, não foi observada, apresentando-se como um fator crítico na fisiopatologia geral (VERANI *et al.*, 2006).

Em 2006, Verani *et al.* demonstraram através de análises histológicas, ultraestrutural e por microscopia de fluorescência as diferenças entre a estrutura de colágeno, formato das células, e da distribuição pontos de adesão entre amostras de pele jovem e envelhecida. Diferenças nos feixes de fibras foram observadas. Os feixes de fibras na pele jovem apresentaram-se mais espessos e menos espaços entre os feixes da derme papilar quando comparado à pele envelhecida (Figura 4).



**Figura 4:** Características histológicas da pele jovem (A) e envelhecida (B) quadros principais. Alguns fibroblastos pode ser vistos orientados no plano dos feixes das fibras (seta no destaque da Figura A). Nas amostras de pele de idade, os feixes foram substituídos por fibras finas de (seta no destaque da Figura B). Há mais espaço derme e as células intersticiais são redondas ou retangulares (seta quadro principal Figura B). Retirado de Verani *et al.*, 2006.

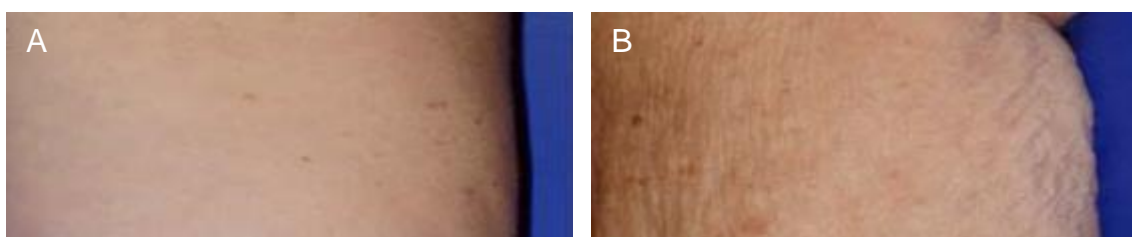
Na pele jovem as células intersticiais podem ser vistas acompanhando as fibras de colágeno diferente da pele envelhecida onde se observa uma desorganização estrutural do tecido (Figura 4, destaque).

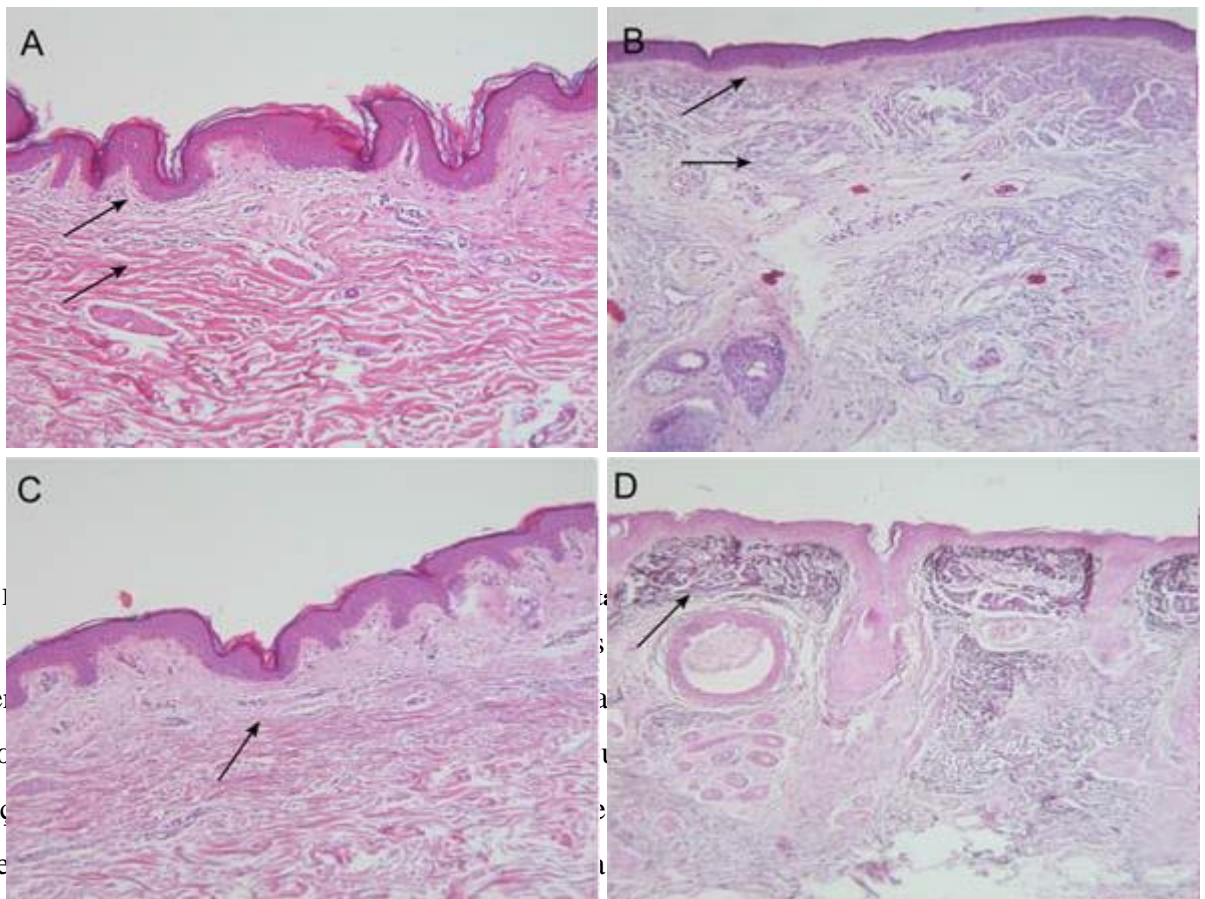
Enquanto no envelhecimento intrínseco as mudanças histológicas principais ocorrem dentro da camada de células basais, o envelhecimento da pele exposta ao sol é caracterizado pelo acúmulo de tecido elástico anormal na derme média e profunda, denominada como elastose solar (MAKRANTONAKI & ZOUBOULIS, 2007) (Figura 5).

**Figura 5: Diferenças da pele fotoprotegida (A) e fotoexposta (B) na parte interna e externa superior do braço. Amostras histológicas de pele de duas mulheres saudáveis (83 anos de idade [A, C] e 73 anos de idade, [B, D], respectivamente). Obtido a partir de pele protegida do sol (face interna da parte superior do braço, A, C), onde moderado afinamento da epiderme é demonstrado, e de pele exposta ao sol, onde há o aumento do fotodano dérmico com acúmulo anormal de tecido elástico na derme média e profunda. Adaptado de Makrantonaki & Zouboulis, 2007.**

### **2.3 Mecanismos envolvidos no envelhecimento cronológico e fotoenvelhecimento da pele**

Muitas teorias têm sido propostas para caracterização do envelhecimento da pele, incluindo a teoria da senescência celular, diminuição da capacidade de reparo do DNA e perda dos telômeros, mutações pontuais no DNA mitocondrial (DNAm<sub>t</sub>), estresse oxidativo, aumento da frequência de anormalidades cromossômicas e mutações em um único gene. Muitas mudanças no envelhecimento da pele resultam da combinação de fatores endógenos (mutações genéticas, metabolismo celular, ambiente hormonal, etc.) e exógenos (agentes químicos, toxinas, poluentes, UV e radiação ionizante). O envelhecimento exógeno ou extrínseco, afeta na maioria das vezes áreas do corpo expostas a luz solar, enquanto as mudanças características do envelhecimento endógeno ou intrínseco são principalmente visíveis em áreas protegidas da luz solar (MAKRANTONAKI & ZOUBOULIS, 2007) (Figura 6).





alter  
à fo  
func  
rece

fotoenvelhecimento que foi descrito pela primeira vez há 25 anos por Kligman. Já o envelhecimento intrínseco possui características clínicas diferentes, sendo responsável pelo ressecamento, palidez e uma pele fina com rugas superficiais (SCHRODER, 2008).

Evidências recentes indicam que o envelhecimento cronológico e da pele foto irradiada dividem características moleculares importantes. O estresse oxidativo é o ponto central para desencadear o início dos eventos de sinalização que levam a resposta celular à irradiação UV e IRA (TRAUTINGER, 2001).

**Tabela 2: Mudanças estruturais da pele envelhecida. (continua).**

Local	Efeito observado no envelhecimento
<b>Epiderme</b>	Conteúdo de lipídeos diminui
	Achatamento da junção dermo-epidérmica
	Número de melanócitos ativos diminui
	Número de células de Langerhans diminui
	Capacidade de repitalização diminui
	Número de poros aumenta

**Tabela 2: Mudanças estruturais da pele envelhecida (conclusão).**

<b>Derme</b>	Espessura reduzida
	Diminuição da vascularidade e celularidade
	Degeneração dos corpúsculos de Pacini e Meissner (tato)

	Fibras elásticas degradadas
<b>Hipoderme</b>	Mudança na distribuição de gordura
	Volume geral diminui

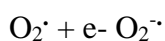
Adaptado de Miranda, 2010.

### 2.3.1 Causas da senescência celular

O processo de senescência é natural e a sua incidência aumenta de acordo com o aumento da idade do indivíduo. Na pele, as causas que induzem senescência bem como o comportamento de células senescentes não são diferentes dos observados em outros órgãos. No entanto, a exposição intensa a agentes químicos, radiação ionizante e até radicais livres oriundos de má alimentação podem acelerar o processo de senescência e promover uma aparência e funcionalidade mais envelhecida a uma pele de pouca idade cronológica.

#### 2.3.1.1 Radicais livres

Em 1956, David Harman sugeriu que os radicais livres produzidos durante a respiração aeróbica causam dano oxidativo cumulativo, resultando em envelhecimento e morte (BECKMAN & AMES, 1998). Estes radicais são átomos ou grupo de átomos, que possuem em sua última camada, um ou mais elétrons desemparelhados (HALLIWEL & GUTTERIDGE, 2007). O oxigênio é considerado um bom agente oxidante por receber elétrons de outras moléculas redutoras em sua última camada, formando espécies reativas de oxigênio. Essas espécies são inicialmente formadas, em sistemas biológicos, através da redução monoelétrica do oxigênio molecular para formar o radical ânion superóxido ( $O_2^-$ ), como no esquema a seguir (GUTTERIDGE, 1994).

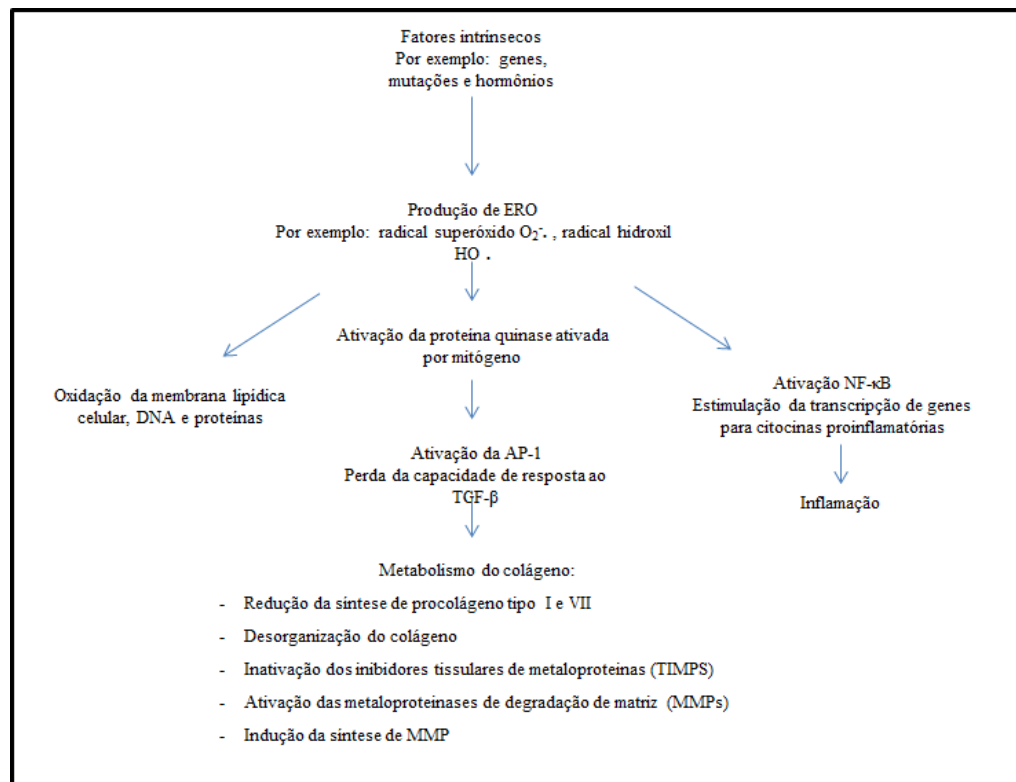


Por estarem constantemente expostos a espécies oxidantes, potencialmente danosas, os organismos aeróbios desenvolveram alguns mecanismos de defesa, que inclui a produção de enzimas como a superóxido desmutase (SOD), a catalase e o complexo glutathione peroxidase/glutathione reductase. Alguns íons presentes nos organismos vivos se ligam a essas enzimas melhorando o sistema de defesa contra as espécies reativas de oxigênio (HALLIWEL & GUTTERIDGE, 2007).

A produção em excesso de radicais de oxigênio ou espécies reativas de oxigênio (EROs) levam a um acúmulo de danos celulares que incluem oxidação do DNA resultando

em mutações e oxidação de membranas e lipídios induzindo a redução da eficiência de transporte e alteração na sinalização transmembrana, processo em que a consequência é o fenótipo envelhecido (HENSLEY, 2002). As EROs são considerados como os maiores responsáveis para o envelhecimento. Desta forma, o mecanismo de proteção contra o estresse oxidativo é tido como uma função indispensável para manutenção da saúde da pele (BARJA, 2004). A pele possui muitos mecanismos de defesa com objetivo de reduzir a produção de ERO de fontes internas. Existe um sistema de reparo que consiste de pequenas moléculas e enzimas, como por exemplo, as enzimas catalase e peroxidase e pequenas moléculas como o NADPH, carnosina, ácido ascórbico e tocoferóis, as quais doam elétron e então neutralizam os EROSs (MIRANDA, 2010).

Entretanto, evidências sucessivas sugerem que as EROs participam de uma via crucial pela participação em múltiplas etapas das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAP Kinase – “Mitogen activated protein kinases”) ao induzir a expressão da proteína ativadora AP-1, conforme figura 7.



**Figura 7: Participação das EROs em múltiplas etapas das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAP Kinase – “Mitogen activated protein kinases”). Adaptado de Miranda, 2010.**

### 2.3.1.2 Desgaste de telômeros

Atualmente, sabe-se que o limite de Hayflick (nome dado ao limite de divisões celulares) acontece, principalmente, devido à falta da atividade da telomerase (revisto em CAMPISI, 2005). Durante o processo de proliferação celular acontece um encurtamento dos telômeros, uma vez que a DNA polimerase não é capaz de replicar todo o fim 5' das fitas de DNA recém sintetizadas. Para prevenir a perda de material genético durante a duplicação de células mitóticas, enzimas denominadas telomerasas amplificam o telômero (BUCKINGHAM, 2011). Quando não há expressão ou pouca atividade enzimática da telomerase, o material genético da célula não fica disponível para duplicação e a célula não é mais capaz de se dividir.

#### 2.3.1.3 Senescência iniciada por dano no DNA

Os danos ao DNA podem acontecer por diversas formas como desgaste de telômeros e quebra da dupla fita de DNA. A principal consequência do dano ao DNA independente do tipo de dano é a ativação da via da p53. A proteína p53 é um fator de transcrição que é ativado após sinalização resultante de dano no DNA. Sua ativação leva à transcrição de genes como o p21 e p16 que funcionam como inibidores do ciclo celular (BRADY, 2011). Uma particularidade da senescência pela via da p53 é que, ao inibir a expressão de p53, a célula pode voltar a ter ciclo celular normal (BEAUSEJOUR, 2003).

#### 2.3.1.4 Fatores extrínsecos

A presença de fatores que inibem a proliferação celular como IFN- $\beta$  e TGF- $\beta$  induzem a senescência celular (MOISEEVA, 2006, ZHANG, 2004).

A exposição da pele à radiação UV induz alterações tais como degradação de moléculas de matriz celular, formação de radicais livres na pele que oxidam membranas celulares, DNA e proteínas, acelerando o processo de envelhecimento, e associa um risco aumentado de desenvolvimento de câncer de pele. Além disso, de uma forma geral, o estímulo da radiação UV induz uma reação inflamatória local com presença de células inflamatórias e produção de mediadores inflamatórios como a expressão de eicosanóides, tais como prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>); citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e quimiocinas (IL-8); e fatores de crescimento. De fato, A presença de fatores que inibem a proliferação celular como interferon- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) e fator de

crescimento transformador- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) induzem a senescência celular (MOISEEVA, 2006, ZHANG, 2004). De todos os mediadores inflamatórios produzidos pelas células da pele, PGE<sub>2</sub>, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  ativam um número suficiente de mecanismos efetores, levando à vasodilatação e à degranulação de mastócitos, ocasionando prurido, ardor e demais sinais neurossensoriais da inflamação cutânea. Além disso, mediadores inflamatórios liberados por queratinócitos, elastase produzida por neutrófilos e subprodutos da cascata oxidativa induzem aumento da atividade de metaloproteinases. Este aumento acarreta na degradação de colágeno, elastina e outras macromoléculas da matriz extracelular, induzindo, assim alterações bioquímicas na derme que favorecem significativamente o progresso do envelhecimento cutâneo.

#### 2.4 Cosméticos

A palavra cosmético deriva da palavra grega "kosmetikó", que significa "hábil em adornar". Existem evidências arqueológicas do uso de cosméticos e produtos de higiene pessoal desde 4.000 anos antes de Cristo. Cosméticos orgânicos e inorgânicos foram amplamente utilizados em muitas civilizações, tendo sido documentado seu uso já no período pré-clássico da região oriental do Mediterrâneo. Muitos elementos como chumbo, mercúrio, antimônio, bismuto, arsênico e zinco entre outros foram utilizados na produção dos cosméticos, levando também à toxicidade cutânea sistêmica (WITKOWSKI e PARIS, 2001).

Embora o uso de produtos cosméticos com o propósito de embelezar, perfumar, limpar ou em rituais de beleza exista desde a origem da civilização, somente no século XX houve necessidade de diversificação de produtos e funções, assim como a comprovação da segurança visando proteção do consumidor. Antes de 1938 nos Estados Unidos, cosméticos não eram regulamentados como drogas e a cosmetologia poderia ser geralmente considerada como uma forma de vender sonhos ao invés de eficácia e segurança. Subsequentemente, o FDA, através do "Federal Food, Drug and Cosmetic Act" (FD&C Act) regulamentou os critérios necessários para a segurança de produtos cosméticos (BAREL, 2005). No Brasil, cabe a ANVISA promover a proteção da saúde da população através do controle sanitário da produção e da comercialização de produtos e serviços submetidos à vigilância sanitária. Desta forma, a ANVISA criou regras que estabelecem testes para garantir a segurança do uso de cosméticos (BRASIL, 2005). Porém, apesar de toda preocupação por parte dos órgãos fiscalizadores, mesmo as formulações mais modernas desenvolvidas para serem toleráveis pelos consumidores, ainda existe um pequeno percentual de casos de alergia por dermatite de



contato com o uso de produtos cosméticos pela população (KAREL, 2004). Sendo assim, justifica-se o interesse dos órgãos de saúde pública, organizações e da academia de estudar e desenvolver modelos experimentais *in vivo* ou *in vitro* que possam avaliar qualitativa e quantitativamente os efeitos dos produtos e ingredientes cosméticos sobre a pele com objetivo de buscar formulações mais seguras e comprovadamente eficazes.

Qualquer metodologia, *in vivo* ou *in vitro* necessita de uma validação formal para que possa ser utilizada de forma a atender o seu objetivo específico. A validação se define como sendo o ato de estabelecer a confiabilidade e relevância de um método para um propósito particular, onde, por confiabilidade se entende como a reprodutibilidade de resultados, intra e interlaboratorial, bem como ao longo do tempo; e relevância é o valor científico e sua utilidade prática e propósito significa a aplicação pretendida do procedimento (ATLA 2004). Isso faz com que o desenvolvimento e disponibilização de métodos alternativos seja relativamente moroso. O prazo estimado atualmente para validação e aceitação de um método leva em torno de 10 anos. Por esse motivo, encontramos na literatura métodos válidos e validados (BALLS *et al.*, 1995; ICCVAM, 1997; OECD, 2005). Métodos válidos são aqueles que não passaram, necessariamente, por um processo completo de validação, mas existe uma quantidade suficiente de dados científicos para mostrar sua relevância e confiabilidade (PAUWELS e ROGIERS, 2004). Isto significa dizer que são métodos ainda em estudo, entretanto, passíveis de serem usados, ou seja, com grande possibilidade de virem a ser validados, como por exemplo, temos: HET-CAM (membrana corioalantóide – “Hen’s Egg Test-Chorioallantoic Membrane”) e NRU (citotoxicidade pelo método de vermelho neutro – “Neutral Red Uptake”). Métodos validados são aqueles para os quais a relevância e a confiabilidade está estabelecida para um propósito particular, de acordo com critérios estabelecidos (PAUWELS e ROGIERS, 2004). Dessa forma, um método validado é aquele que já passou por estudo colaborativo e tem sua metodologia e seus critérios bem definidos e aceitos oficialmente como, por exemplo: UV-NRU (citotoxicidade pelo método de vermelho neutro irradiado com ultravioleta – “UV-Neutral Red Uptake”) (PRESGRAVE, 2010).

De acordo com todos os pontos apresentado acima, é importante que tanto as causas de indução da senescência quanto seus efeitos sejam encarados como alvos profiláticos e, ainda, que um composto dito anti-idade tenha sua eficácia e segurança testada sobre algum dos alvos descritos acima, através de metodologias preferencialmente *in vitro* e que sejam validadas e aceitas pelas normas nacionais e internacionais.

## 2 OBJETIVO

### 2.1 Objetivo principal

Identificar métodos utilizados mundialmente, considerando os princípios dos “três Rs” para descoberta de novos princípios ativos com atividade antienvhecimento visando o desenvolvimento de cosmeceuticos, levando-se em consideração a avaliação de segurança e eficácia das substâncias testadas.

### 2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Realizar levantamento bibliográfico da legislação brasileira vigente quanto ao reconhecimento e registro de cosméticos, no que tange questões como segurança e eficácia.

2.2.2 Descrever os principais métodos para avaliação de segurança e eficácia já padronizadas e reconhecidas pela ANVISA e principais órgãos regulatórios internacionais.

2.2.3 Destacar as vantagens e desvantagens de cada método *in vitro*, assim como, avaliar sua reprodutibilidade *in vivo*.

2.2.4 Sugerir um fluxo de trabalho, considerando os métodos alternativos existentes, para avaliação de eficácia e de segurança em produtos cosméticos.

## 4. METODOLOGIA

Neste estudo, foi realizado levantamento bibliográfico conforme sugerido por Marconi e Lakatos (1972) que consiste no levantamento de bibliografia relevante já publicada e que tenha relação com o tema, visando ampla obtenção de dados. Para isso serão utilizados como critérios de seleção da literatura:

- Resoluções vigentes na legislação de agencias regulatórias de saúde nacionais e internacionais;
- Revistas indexadas em indexadores da área biomédica como Medline, Scopus, Web of Science;
- Patentes concedidas nacional e internacionalmente;

Após a realização do levantamento, os dados serão analisados criticamente em relação a segurança, reprodutibilidade e sustentabilidade, visando um fluxo para avaliação de segurança e eficácia, de acordo com a finalidade de cada produto cosmético.

## **5. RESULTADOS**

### **5.1 Levantamento da legislação vigente que versa sobre eficácia e segurança de produtos cosméticos.**

A primeira literatura consultada foi a legislação vigente da ANVISA. Foram encontradas 8 leis, 3 decretos, 26 resoluções e 1 portaria. Conforme disposto na [lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976](#), observamos que a ANVISA não reconhece cosmeceúticos como uma classe nem de cosméticos nem de medicamentos. De fato, foi observado que apenas a segurança é o foco principal das resoluções considerando produtos cosméticos (RDC nº 332 de 31 de setembro de 2005; Resolução - RDC nº 211, de 14 de julho de 2005, BRASIL, 2005). Apenas a legislação para protetores solares cita de forma clara as normas exigidas para comprovação de eficácia (RDC nº 237, de 22 de agosto 2002; RDC nº 30 de 1º de junho de 2012, BRASIL, 2002; 2012). A ANVISA cita inclusive, nas “Orientações para Elaboração de Dossiê de Produto Cosmético”, que não estabelece metodologias específicas para os testes de eficácia, deixando a cargo da empresa a escolha sendo sujeita à avaliação da agência.

### **5.2 Levantamento dos métodos para avaliação de segurança de ingredientes e produtos cosméticos.**

Além da legislação descrita acima, observamos que a ANVISA também dispõe do “Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos”, documento de caráter orientativo, que tem como objetivo sugerir critérios de avaliação de segurança de produtos cosméticos. O guia ainda contempla os métodos alternativos aceitos, validados e em fase de validação no Brasil. Segundo o documento para registro de um ingrediente cosmético se faz obrigatória a avaliação de toxicidade. Ela está intimamente relacionada à natureza físico-química do ingrediente e à metodologia de avaliação utilizada (via de administração, tempo e frequência de exposição, entre outros). Por esta razão, guardadas as respectivas particularidades de cada ingrediente, indica-se a realização dos seguintes ensaios pré-clínicos descritos na tabela 3 abaixo.

Tabela 3: Testes pré-clínicos para avaliação de segurança em ingredientes cosméticos sugeridos pelo “Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos” – Adaptado de ANVISA, 2012.

<b>NOME DO TESTE</b>
Toxicidade sistêmica aguda
Corrosividade e irritação dérmica
Sensibilização cutânea
Absorção/penetração cutânea
Doses repetidas
Mutagenicidade/genotoxicidade
Toxicidade subaguda e subcrônica
Irritação ocular
Irritação de mucosas
Efeitos tóxicos induzidos pela radiação UV (fototoxicidade, genotoxicidade, fotoalergia)
Carcinogenicidade
Toxicidade do desenvolvimento e reprodutiva (teratogenicidade)
Toxicocinética e Toxicodinâmica

De acordo com o “Guidance for the testing of cosmetic ingredients”, os seis primeiros testes têm sido considerados os ensaios toxicológicos mínimos, ficando os demais sujeitos à avaliação (ANVISA, 2012).

O guia para avaliação de segurança de ingredientes e produtos cosméticos da ANVISA, contempla e descreve alguns métodos alternativos para avaliação de segurança de produtos e ingredientes cosméticos *in vitro*. Até a finalização desta dissertação, nem todos os métodos *in vitro* citados nesse documento encontram-se validados, conforme resumo apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 – Métodos Alternativos propostos no guia para avaliação de segurança de ingredientes e produtos cosméticos – ANVISA, 2012.

TESTE	MÉTODO	AValiação DO MÉTODO
Citotoxicidade	MTT: avaliação da viabilidade celular através do corante MTT	Validado
	Difusão gel agarose + MTT	Não validado
Irritação Ocular	NRU: avaliação da viabilidade celular através do corante vermelho neutro	Não validado
	BCOP: “Bovine Cornea Opacity Test”	Validado
	HET-CAM: Hen's egg test (chorio-allantoic membrane test)	Não validado

Irritação Cutânea	Modelo com pele reconstituída	Validado
Corrosividade	Modelo com pele reconstituída + MTT	Validado
Fototoxicidade	3T3 NRU PT: Captação de vermelho neutro e teste de fototoxicidade	Não validado

Além dos testes pré-clínicos determinados para avaliação de ingredientes utilizados em cosméticos, o produto final, contendo a combinação desses ingredientes, podem necessitar de estudos clínicos em humanos para garantir o máximo de segurança com menor risco. A partir das informações pré-clínicas obtidas a segurança em humanos deve ser obtida através de ensaios clínicos que consistem em dois grandes grupos: estudos de compatibilidade, que avaliam a segurança em condições maximizadas, com área e quantidade aplicada controlada e estudos de aceitabilidade, que avaliam a segurança do produto cosmético nas condições reais de uso. Os testes de compatibilidade e aceitabilidade estão descritos na tabela 5 abaixo.

Tabela5: Testes clínicos de compatibilidade e aceitabilidade para avaliação de segurança em ingredientes cosméticos sugeridos pelo “Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos” – Adaptado de ANVISA, 2012.

<b>ESTUDOS DE COMPATIBILIDADE</b>
Avaliação da Irritação Cutânea Primária e Acumulada
Avaliação da Comedogenicidade com apósitos
Avaliação da Sensibilização Dérmica
Avaliação de Fotoirritação
Avaliação de Fotossensibilização
<b>ESTUDOS DE COMPATIBILIDADE</b>
Avaliação de Acnegenicidade e Comedogenicidade em uso
Avaliação de produto para Pele Sensível
Verificação da Aceitabilidade Ocular

A avaliação pré-clínica e clínica irão compor o dossiê de segurança do produto e deverão conter os relatórios dos testes ou estudos comprobatórios de segurança de uso.

## 5.2 Levantamento de métodos para avaliação da eficácia clínica e *in vitro* de cosméticos

### 5.2.1 Fotoproteção

Os fotoprotetores foram incluídos como cosmeceuticos uma vez que possuem ação preventiva e não apenas de embelezamento. Dentre as metodologias *in vivo* encontradas para avaliação

do efeito fotoprotetor, as metodologias abaixo foram selecionadas como as de maior relevância.

### 5.2.1.1 Avaliação de eficácia da proteção UVA

Até o presente momento, os principais testes para avaliação da proteção UVA *in vitro* e *in vivo* são:

- Uso de equivalentes de pele para medir a viabilidade celular, conforme figura 8 (GILLIES *et al.*, 2003, BERNERD, 2008);

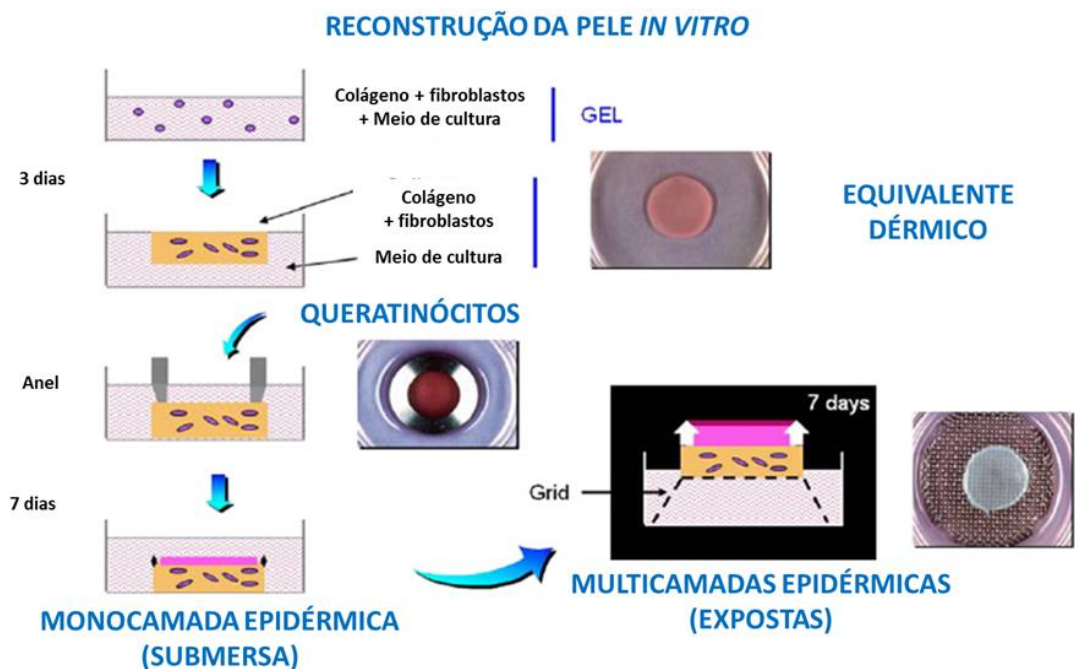


Figura 8: Reconstrução de pele *in vitro*. Adaptado de Bernerd, 2008.

- Indução da alergia de contato em ratos (GILLIES *et al.*, 2003);
- Taxa de indução de dímeros de pirimidina (GILLIES *et al.*, 2003);
- Medida do espectro de transmissão em pele excisada de epiderme humana e de ratos (GILLIES *et al.*, 2003);
- Fator de proteção UVA obtido pela razão entre a dose mínima pigmentária em uma pele protegida por um protetor solar (DMPp) e a dose mínima pigmentária na mesma pele, quando desprotegida (DMPnp) (ANVISA, 2012);
- Avaliação do efeito fotoprotetor UVA através de espectroscopia de ressonância magnética  $P^{31}$  (MRS  $P^{31}$ ) (ZEMTSOV, 2005);
- Avaliação da eficácia protetora *in vitro* pela redução da senescência de fibroblastos superficiais (BERNERD, 2008);

- Fototoxicidade em indivíduos sensibilizados por 8-metoxipsoraleno (GILLIES *et al.*, 2003);
- Pigmento do escurecimento persistente (*Persistent pigment darkening* - PPD) (ANVISA, 2012).

#### 5.2.1.2 Avaliação de eficácia da proteção UVB

As técnicas encontradas para determinação da proteção UVB *in vitro* e *in vivo* encontradas na literatura, até o presente momento foram:

- Determinação por análise espectrofotométrica (DUTRA *et. al.*, 2004);
- Produção de células de queimaduras solares (*sunburns cells*) (GILLIES *et al.*, 2003, BERNERD, 2008);
- Determinação do fator de proteção *in vivo*. (ANVISA, 2012).

#### 5.2.2 Avaliação da hidratação da pele: determinação do conteúdo aquoso do estrato córneo e da perda transepidérmica de água

A maioria dos testes encontrados baseia-se nas propriedades elétricas da pele que são alteradas com a hidratação. Os principais métodos encontrados para a medida do conteúdo aquoso do estrato córneo são:

- Espectroscopia do Infravermelho (GONÇALVES, 2009; VERDIÉR-SÉVRAIN, 2006)  
Baseia-se na absorção dérmica de ondas no infravermelho e depende do conteúdo aquoso da pele;
- Frequência de Ressonância, baseada na medida da umectação pela transmissão de ondas, que depende da elasticidade da pele (GONÇALVES, 2009; VERDIÉR-SÉVRAIN, 2006);
- Ressonância Magnética Nuclear (NMR) baseada na densidade protônica (GONÇALVES, 2009; VERDIÉR-SÉVRAIN, 2007);
- Descamação, baseada no processo natural de descamação do estrato córneo;
- Medida da Impedância, baseada na medida de sua resistência elétrica. Obtida através de um medidor de fase dérmica Nova<sup>®</sup> (*Dermal Phase Meter*<sup>®</sup> - DPM);
- Princípio da Capacitância, o qual se baseia nas diferenças entre a constante dielétrica da água e de outras substâncias. Medido através do equipamento *Corneometer* (Courage & Khazaka, Germany) que analisa a capacidade de retenção de umidade na pele através da constante dielétrica da água e medido nas camadas superficiais do estrato córneo;
- Espectrômetro de Raman *in vivo* ou *in vitro* (EGAWA, 2007), (EP 1760440 A1), (CASPER, 2003);

- Avaliação da síntese de filagrina *in vitro* em modelos de pele equivalentes (SCHLOTMANN, 2001);
- Avaliação da perda de água transepidérmica - “transepidermal water loss” (TEWL) é usado principalmente para apoiar alegações de que um produto pode a curto ou a longo prazo melhorar ou reparar a função de barreira da pele. Pode ser medido através dos equipamentos: Evaporimeter<sup>®</sup> (ServoMed, Sweden) e o Tewameter<sup>®</sup> (Courage & Khazaka, Germany) (DYKES, 2002);
- Avaliação da expressão de aquaporinas-3 (AQP-3) em monocamada de queratinócitos (LEE, 2012), (PEREDA, 2010).
- Imunohistoquímica para AQP-3 (PEREDA, 2010).

### 5.2.3 Avaliação do efeito redutor de rugas e linha de expressão

As linhas de expressão ou rugas são avaliadas *in vivo* basicamente através de imagens. A avaliação *in vivo* é realizada indiretamente através do estímulo a síntese de fibras de sustentação e elásticas conforme descrito a seguir. Os principais testes encontrados na literatura foram:

- Avaliação de imagens *in vivo* através da Visiocan<sup>®</sup> VC98 acoplado ao software SELS conforme ilustrado na figura 9;



**Figura 9: Visiocan<sup>®</sup> VC98 e do software SELS 2000 da empresa Courage1Khazaka electronic GmbH. Adaptado de Ferreira M.R.P., et al., 2010**

- Avaliação de rugas *in vivo* utilizando o sistema de Análise VISIA<sup>®</sup> (Canfield Scientific, Inc., Fairfield, NJ) (CHIU, P., et. al., 2007).
- Avaliação da síntese de colágeno *in vitro* em modelos de pele equivalentes (SCHLOTMANN, 2001).
- Avaliação da síntese de colágeno *in vitro* em cultura em monocamada de fibroblastos dérmicos (PAOLINO, 2010).

### 5.2.4 Avaliação do efeito Imunoprotetor



- Avaliação em biópsia de pele do RNAm de mediadores pró-inflamatórios (IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- $\alpha$ ) por PCR (MURRAY, 2008);

#### 5.2.5 Avaliação da redução da flacidez

O parâmetro flacidez pode ser avaliado *in vivo* através das propriedades mecânicas da pele que possui comportamento viscoelástico, apresentando tanto características elásticas quanto plásticas. Para avaliação *in vitro*, a redução da flacidez é determinada pelo aumento da síntese das fibras elásticas. Dentre as metodologias encontradas podemos destacar:

- Avaliação *in vivo* da elasticidade através do Cutometer®;
- Avaliação *in vivo* da firmeza através do Elastometer®, teste de capacidade da pele para resistir (firmeza) contra a capacidade de voltar à posição original depois de pressão;
- Avaliação *in vitro* com modelos de pele equivalente através de ensaios de imunohistoquímica para elastina, colágeno tipo I e fibrilina-1 (principal constituinte das microfibrilas dos tecidos elásticos) (LACROIX, 2007).
- Avaliação da expressão de RNA para elastina, colágeno tipo I e fibrilina-1 (LACROIX, 2007).

#### 5.2.6 Despigmante

A avaliação do efeito clareador de um produto ou ativo é medida através da inibição de síntese de melanina e pela redução da intensidade da mancha, respectivamente. Os principais métodos encontrados na literatura são:

- Avaliação do efeito clareador *in vitro* com Melanoderme (Mat-Tek)
- Avaliação da redução de manchas *in vivo* através do Mexameter acoplado ao software MPA 580 (Courage + Khazaka electronic GmbH, Cologne, Germany).

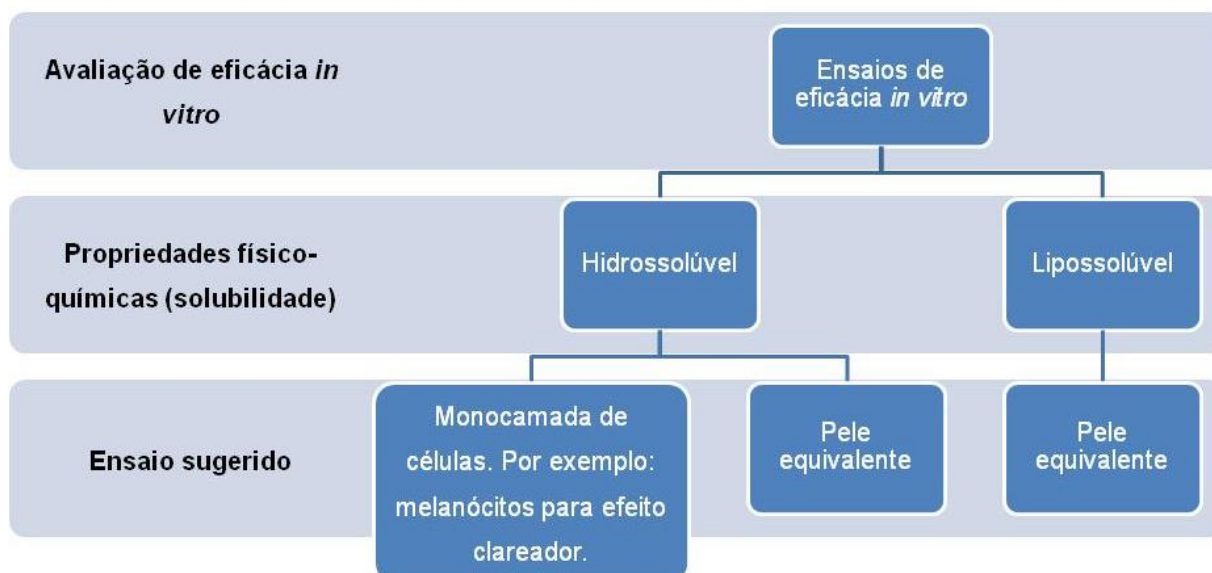
#### 5.2.7 Avaliação do efeito protetor ao DNA

O efeito protetor ao DNA pode ser mensurado indiretamente através da ação antioxidante frente a um agente agressor, como por exemplo, a radiação UV. Outro método direto é realizado através da avaliação de dímeros de timidina formado após exposição a luz UV.

- Avaliação *in vitro* do efeito antioxidante através do teste do radical 2,2,-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) que possui banda de absorção em 515nm que desaparece quando sofre redução (BONINA, 2002);
- Efeito protetor contra a peroxidação induzida pela radiação UV em membranas de lipossomas (BONINA, 2002);
- Avaliação imunohistoquímica para dímeros de timidina e p53 (MURRAY, 2008).

**5.3 Fluxo de trabalho sugerido para descoberta de novos princípios ativos com atividade antienvhecimento.** O primeiro passo para avaliação de eficácia *in vitro* de um proposto princípio ativo está baseado em suas propriedades físico-químicas, mas precisamente de sua solubilidade, conforme ilustrado na figura 10 a seguir:

Figura 10: Determinação da metodologia *in vitro* de escolha.

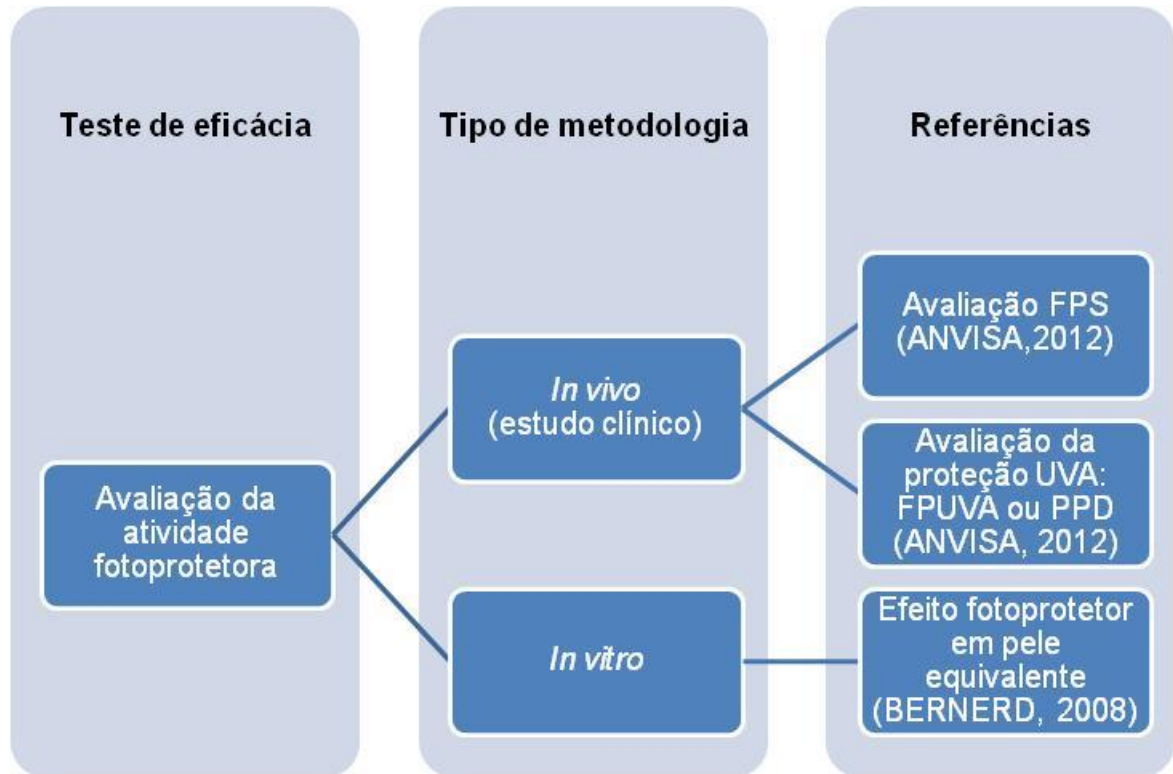


Determinada a metodologia *in vitro*, avalia-se a concentração de princípio ativo a ser testada através do método MTT através de monocamada ou não conforme resumido na figura acima (ANVISA, 2012).

Os testes de eficácia a seguir poderão ser realizados em sequência, quando não houver conhecimento sobre a interação química da molécula com as estruturas biológicas ou para avaliações direcionadas quando houver.

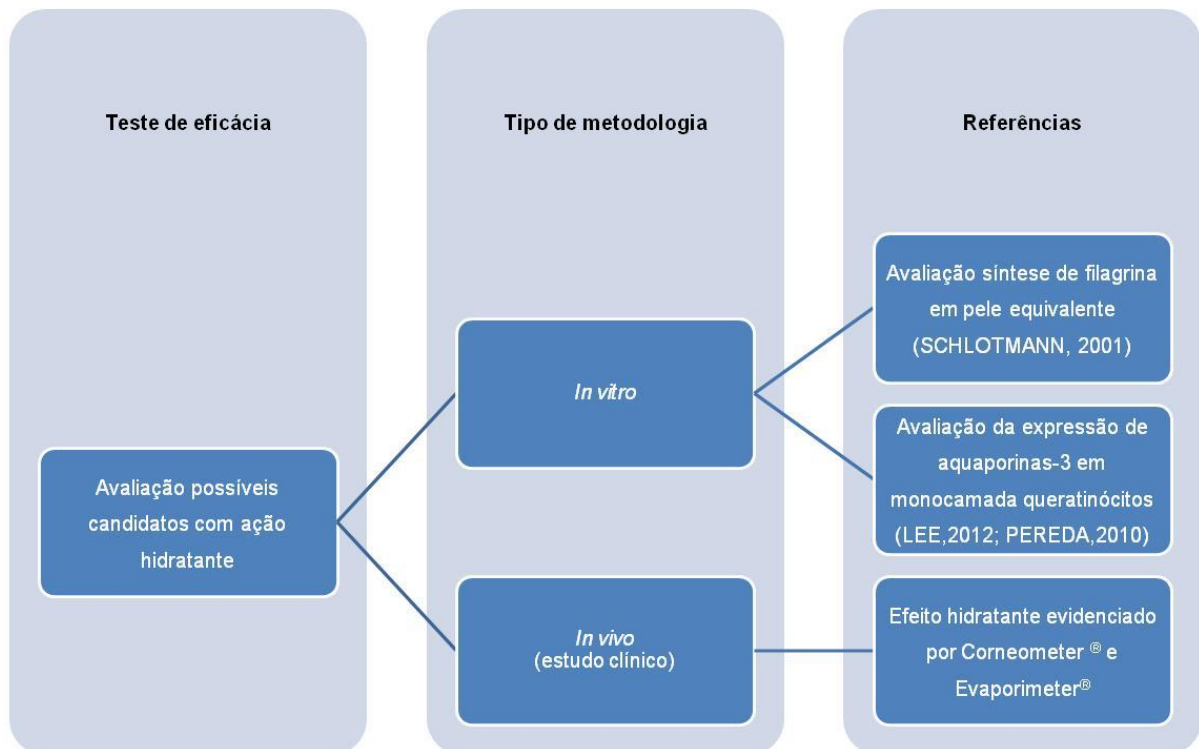
### 5.3.1 Avaliação da eficácia fotoprotetora

Figura 11: Avaliação de possíveis candidatos com ação fotoprotetora



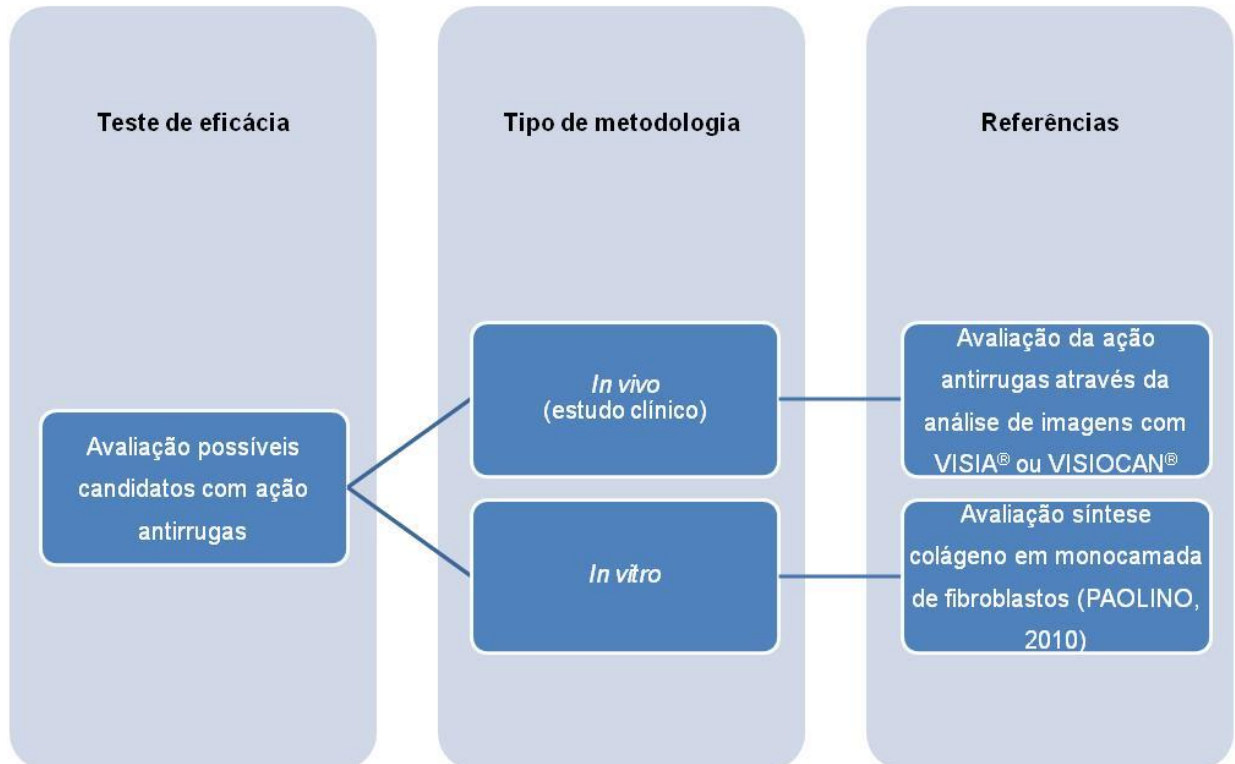
### 5.3.2 Avaliação de possíveis candidatos com ação hidratante

Figura 12: Avaliação de possíveis candidatos com ação hidratante



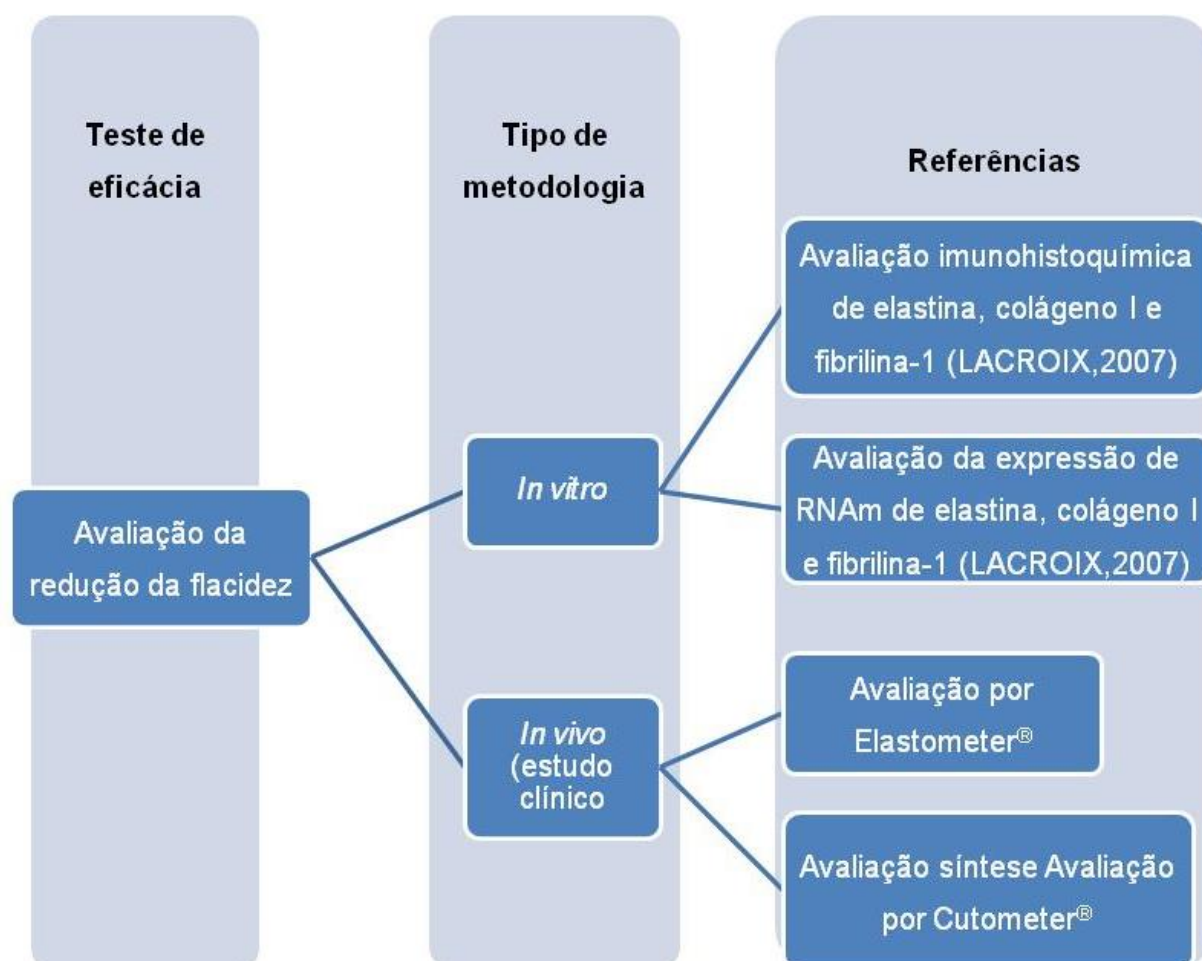
### 5.3.3 Avaliação de possíveis candidatos com ação antirrugas

Figura 13: Avaliação de possíveis candidatos com ação antirrugas



### 5.3.4 Avaliação da redução da flacidez

Figura 14: Avaliação da ação redutora da flacidez



Caso o proposto ativo exerça alguma atividade antienvhecimento, todos os testes de segurança preconizados pela ANVISA devem ser realizados para o registro do ativo com a devida finalidade (antirrugas, hidratante, protetor do DNA, etc.).

O próximo passo será a aplicação do ativo em veículos cosméticos associados ou não a outros ativos para fabricação dos produtos final que poderá ser avaliado novamente clinicamente conforme descrito acima. Os ensaios *in vitro* para a substância e clínica para o produto farão parte do dossiê do produto para solicitação do registro na ANVISA e posterior comercialização do produto.

Por ser uma classe recente, a legislação que regulamenta o registro de cosmeceuticos com atividade antienvhecimento não existe. No entanto existem técnicas descritas na literatura, validadas ou não, que estão de acordo com os princípios dos “três Rs” e são úteis para avaliar a atividade antienvhecimento de princípios ativos.

## 6. DISCUSSÃO

Os cosmeceuticos foram definidos pelo Dr Albert Kligman, em 1984, como uma classe de cosméticos com atividades terapêuticas, que ajudam a cuidar da saúde da pele ou mucosas da área externa do corpo, como boca e genitais, ajudando a evitar envelhecimento precoce, câncer, danos causados pela longa exposição à luz solar ou a agentes químicos entre outros. Entretanto, produtos que prometem melhorar a aparência da pele como cremes antirrugas, agentes clareadores ou antienvelhecimento, não se encaixam em nenhuma das classificações regulamentadas pela ANVISA. Como consequência da falta de classificação, não há exigência adequada da comprovação de segurança e eficácia, bem como informações e cuidados, modo e restrições de uso deste tipo de produto.

O envelhecimento intrínseco humano tem sido tópico de interesse dos cientistas por mais de um século, e um número significativo de estudos tem sido publicados, nos quais documenta as alterações anatômicas progressivas da pele humana com a idade, através de várias décadas ao longo da vida. No entanto, a documentação das alterações cronológicas da idade na pele de animais é limitada. A principal razão é o número escasso de modelos animais disponíveis com registros claros sobre envelhecimento da pele. Como muitos modelos animais são utilizados para avaliação de eficácia de ativos em geral, é lógico o questionamento se condições semelhantes ou diferentes são observadas quando a análise é estendida para modelos animais no reino dos mamíferos. Alguns registros histológicos e mudanças na cinética celular de modelos animais ao longo de sua vida ou em estágios representativos estão disponíveis. A maioria dos estudos foram conduzidos em camundongos sem NUDE, linhagens de camundongos (CBA, C57131/6NNia, Balb/c) e ratos (Wistar, Fisher 344). Isso dificulta fazer uma comparação significativa entre os artigos relacionados ao envelhecimento histopatológico da pele. Dentre as publicações relevantes utilizando-se modelos animais, o trabalho de Iversen e Schjoelberg, 1984, apresentou as modificações da cinética celular e epidérmica relacionadas com a idade em espécies de camundongos sem pelo, utilizando autoradiografia. Foi demonstrado que a proliferação celular epidérmica aumenta do nascimento até aproximadamente 20 semanas de idade e se mantém estável. Este estudo detalhado não pode confirmar se a epiderme afina ou se o fator proliferação celular cai sistematicamente com o aumento da idade. Por outro lado, Haratake e colaboradores apresentaram dados demonstrando que o afinamento da epiderme em camundongos sem pelo cai com o envelhecimento intrínseco. Na pesquisa realizada, a maioria dos estudos reportados em pele de camundongos estava principalmente preocupada com os efeitos da idade na espessura ou da cinética das células epidérmicas e rara atenção tem sido dada para as

mudanças morfológicas dos constituintes da derme em animais idosos. Devido à facilidade de estudar os fenômenos do envelhecimento da pele associadas à idade e às mudanças progressivas que ocorrem em mamíferos com vida curta, estudos publicados estão confinados a modelos de roedores de laboratório. Muitas publicações em tais modelos não consideram espécimes senis e, portanto, carece de uma amostragem própria população, além disso, o tempo de vida em roedores é muito variável nas linhagens. Porém estudos recentes demonstram que os modelos de camundongos estão mais acessíveis para documentação de mudanças histológicas relacionadas à idade que podem ser comparados aos dados humanos disponíveis, apesar da ressalva da comparação entre a pele de roedores com tempo de vida curta, crescidos em laboratório, com a pele humana exposta à doenças e agressões ambientais por anos o desafio é uma tarefa de grande risco (FARAGE, 2010).

Conforme abordado acima, a limitação dos estudos em animais, associada a princípios éticos, demandou da indústria, principalmente a de cosméticos, a busca por métodos alternativos aos ensaios com animais. Globalmente a indústria de cosméticos foi a pioneira no desenvolvimento desses métodos, que são desenvolvidos desde a década de 80. Desta forma o objetivo deste estudo foi selecionar métodos, considerando os princípios dos “três Rs” para descoberta de novos princípios ativos visando o desenvolvimento de cosméticos, avaliando-se, também, segurança e eficácia das substâncias testadas.

No Brasil, os primeiros passos estabelecidos para a redução no número de animais para teste em laboratório surgiram com a Lei N° 11.794, de 8 de outubro de 2008 que estabeleceu a criação do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA, assim como, a introdução, monitoramento e avaliação de técnicas alternativas que substituam a utilização de animais em ensino e pesquisa, citado no artigo V. Embora os primeiros passos tenham ocorridos no ano de 2008, a estruturação para o desenvolvimento dessas metodologias alternativas ao uso de animais ocorreu somente no ano de 2012. O Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação publicou a Portaria N° 491, de 3 de julho de 2012, onde ficou instituída a Rede Nacional de Métodos Alternativos – RENAMA, que tem por objetivo estimular a implantação, desenvolvimento, validação e certificação de ensaios e novos métodos alternativos ao uso de animais. Até a finalização desta dissertação, não foi encontrada nenhuma técnica validada para avaliação de eficácia *in vitro* de produtos ou ingredientes cosméticos no Brasil.

A primeira mudança encontrada na legislação mundial que contemplou a redução e substituição de animais de laboratórios na experimentação biológica foi a sétima Emenda da diretiva cosmética europeia (2003/15/EC), introduziu a proibição progressiva dos testes em

animais e da propaganda de produtos cosméticos e seus ingredientes que são testados em animais, conforme a seguir:

- Proibição imediata de qualquer teste em animais em que o teste alternativo validado seja aceito.

- 11/09/2004: Proibição de testes em animais para produtos cosméticos.

- 11/03/2009: Proibição imediata de qualquer teste em animais no qual um método alternativo esteja validado;

- 11/03/2009: Proibição de testes e propaganda de produtos testados em animais para testes avaliação de segurança de ingredientes cosméticos, com exceção de três estudos: toxicocinéticos, dose repetitiva, toxicidade reprodutiva. Ambos poderão ser realizados utilizando animais até 11/03/2013, data em que se espera ter métodos validados para aplicação.

Os próximos passos para os métodos alternativos priorizam quatro áreas: irritação ocular, genotoxicidade/mutagenicidade, sensibilização da pele e toxicidade sistêmica (COLIPA).

Uma visão geral de alguns dos testes alternativos (*in vitro*) aprovados ou em fase de aprovação pela União Européia foi incluída no Sistema de Acompanhamento para Revisão de Métodos Alternativos (TSAR) e estão colocados na tabela 5 a seguir.

**Tabela 6 - Métodos alternativos aprovados ou em fase de aprovação no Sistema de Acompanhamento para Revisão de Métodos Alternativos.**

Teste	Método	Classificação	Comentários
Irritação e Corrosão da pele	TER-Corrosão	<i>in vitro, ex-vivo</i> Teste de substituição	Resistência elétrica transcutânea. Substitui o método clássico, mas ainda utiliza órgãos de animais sacrificados
	HSM-Corrosão	<i>in vitro</i> Teste de substituição	Modelo de pele animal
	Corrositex <sup>®</sup> Corrosão	<i>in vitro</i> Teste com substituição parcial	Ensaio <i>in vitro</i> para teste da corrosão da pele Aplicação limitada.
	EpiSkin <sup>®</sup> Irritação	<i>in vitro</i> Teste de substituição	Modelo de pele artificial (EPISKIN) para irritação da pele (com redução MTT e liberação de IL-1
	EpiDerm <sup>®</sup> Irritação	<i>in vitro</i> Teste com	Modelo de pele artificial (EpiDerm) para irritação



		substituição parcial	da pele (com redução de MTT e liberação de IL- $\alpha$ ). Pode ser usado como substituição de testes clássicos para agentes irritantes fortes, em um quadro de testes estratégicos.
	EpiDerm <sup>®</sup> Modificada	<i>in vitro</i> Teste de substituição	Modelo de pele artificial (EpiDerm) para irritação da pele
	SkinEthic	<i>in vitro</i> Teste de substituição	Modelo de pele artificial (SkinEthic-RHE) para irritação da pele
Irritação Ocular	BCOP	<i>in vitro, ex-vivo</i> Teste de substituição	Teste de opacidade da córnea bovina
	ICE	<i>in vitro, ex-vivo</i> Teste de substituição	Teste de olhos isolados de galinha
	RRET,IRE	<i>in vitro, ex-vivo</i> Teste de substituição	Teste de olhos de coelhos Substitui o teste clássico mas ainda usa órgãos ex-vivo de animais sacrificados
	HET-CAM	<i>in vitro</i> Teste de substituição	Teste da membrana córneo-alantóide
Mutagenicidade	Micronúcleo	<i>in vitro</i> Teste de redução	Teste de micronúcleo <i>in vitro</i> Aumenta a eficácia de uma bateria de testes <i>in-vitro</i> , reduzindo a necessidade de testes para a confirmação <i>in vivo</i>
Fototoxicidade	3T3 NRU PT Fototoxicidade	<i>in vitro</i> Teste de substituição	Teste de fototoxicidade com 3T3 com captação do vermelho neutro
Absorção cutânea	Absorção da pele	<i>in vitro</i> Teste de substituição	Absorção cutânea <i>in-vitro</i>

Adaptado de Wheighardt, 2009.

Muitos trabalhos têm sido realizados mundialmente para aumentar a validação e aceitação de métodos alternativos (WHEIGHARDT, 2009). Estes esforços são reforçados através da colaboração de associações cosméticas e órgãos reguladores, como o “International Cooperation on Cosmetics Regulation” (ICCR) e “International Cooperation on Alternatives Tests Methods” (ICATM). Estes incluem corpos também acadêmicos, reguladores da indústria (como a Comissão Europeia) e outros setores da indústria.

Foi observado que a legislação que regulamenta o registro de cosmético se baseia apenas em garantir a segurança no que tange a toxicidade do produto sem orientar quanto a necessidade de avaliar a eficácia do mesmo. Conforme observado no guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos sugerido pela ANVISA, os ensaios *in vitro* são considerados até o presente momento, ensaios de triagem, não sendo aceitos para fins regulatórios no Brasil. Como exemplo, podemos citar o teste para avaliação da irritação ocular. Como há mais de um mecanismo de irritação ocular, apenas um ensaio *in vitro* não é suficiente para avaliar esse parâmetro, sendo necessário o uso de pelo menos 3 métodos em conjunto: Het-Cam, para obtenção de dados relacionados à vascularização, Opacidade e Permeabilidade de Córnea Bovina (BCOP), para avaliar opacidade/permeabilização e o ensaio de captação do corante Tetrazolium (MTT) para avaliação da citotoxicidade, sendo que o primeiro método citado não está validado, impedindo o uso desse protocolo para substituição de animais.

Em relação aos ensaios para análise de segurança, a maioria das informações necessárias na avaliação do risco potencial de um produto cosmético resulta do conhecimento dos ingredientes que compõem sua fórmula. São eles que podem, diretamente, serem os responsáveis por qualquer efeito local e sistêmico. Contudo, a fórmula do produto acabado também pode interferir, à medida que facilita a absorção total ou parcial dos ingredientes. Além disso, as possíveis interações, resultantes da associação entre os ingredientes, podem influenciar no risco potencial de um produto. Os ingredientes cosméticos podem ser sintéticos, naturais, produtos de biotecnologia ou associação de ingredientes, como por exemplo, as fragrâncias. A avaliação de segurança desses ingredientes, à semelhança de outras substâncias químicas, deve seguir rigoroso delineamento científico para fornecer bases técnicas adequadas para formulação de produtos seguros. A toxicidade de um ingrediente cosmético está relacionada a algumas de suas propriedades físico-químicas, dentre elas: estrutura química e molecular, massa molecular, solubilidade e coeficiente de partição. A interação química da molécula com as estruturas biológicas pode ser avaliada através de modelos matemáticos, genericamente designados *in silico*, tais como, SAR (“structure-activity relationship”) e QSAR (“quantitative structure activity relationship”). Apesar dos estudos já realizados, atualmente a compreensão acerca do assunto ainda é restrita e decorre da limitação dos modelos computacionais ainda disponíveis. Essas ferramentas estão em fase de desenvolvimento e validação. A interpretação dos resultados deve ser feita com muita cautela, não podendo substituir modelos *in vitro* e/ou *in vivo*. Para avaliação de segurança, ainda não é possível realizar todos os testes através de métodos alternativos, pois não existem

testes desenvolvidos e validados conforme apontados nos resultados. Sendo assim, ainda há necessidade da utilização de cobaias para realização dos de alguns métodos como, por exemplo, sensibilização, toxicidade sistêmica e mutagenicidade.

Qualquer metodologia, *in vivo* ou *in vitro* necessita de uma validação formal para que possa ser utilizada de forma a atender o seu objetivo específico. Isso faz com que o desenvolvimento e disponibilização de métodos alternativos sejam relativamente morosos. O prazo estimado atualmente para validação e aceitação de um método leva em torno de 10 anos. Por esse motivo, encontramos na literatura métodos válidos, que ainda não passaram, necessariamente, por um processo completo de validação, mas existe uma quantidade suficiente de dados científicos para mostrar sua relevância e confiabilidade (PAUWELS e ROGIERS, 2004) e os métodos validados que já passaram por estudo colaborativo e tem sua metodologia e seus critérios bem definidos e aceitos oficialmente (BALLS *et al*, 1995; ICCVAM, 1997; OECD, 2005). Desta forma, a compreensão dos testes de segurança já validados ou em fase de validação, será útil como guia para sugestão de um protocolo para testes de eficácia *in vitro* para cosméticos.

O desenvolvimento e validação de métodos alternativos ao uso de animais foram encontrados como uma das prioridades para a indústria cosmética. Porém, para que possam ser utilizados pelos órgãos reguladores esses métodos precisam ser reprodutíveis e predizer os efeitos de um cosmético durante o uso normal de um consumidor. Dentre os métodos alternativos encontrados na literatura, nenhum teste de eficácia encontra-se validado e poucos testes de segurança encontram-se aceitos mundialmente, comprovando a necessidade de grande investimento dos governos e instituições de pesquisa para que haja a substituição total do uso de animais.

Diante dos métodos alternativos encontrados na literatura, podemos constatar que a primeira avaliação para um proposto ativo com ação antienvhecimento será baseada em sua solubilidade. Diante dessa característica o próximo ensaio poderá ser realizado em monocamada de células ou em modelos de pele equivalente de acordo com a finalidade que se deseja. Os ensaios em monocamada ficam limitados a substâncias hidrossolúveis, restringindo essa avaliação. Já os compostos com características lipofílicas, em que a solubilidade não é alcançada com a incorporação de DMSO ou tensoativos em quantidades subtóxicas, precisam ser avaliados em modelos de pele humana tri-dimensional, isto é, em modelos de pele equivalente ou de pele reconstruída.

Já existe no mercado disponível para compra kits com epiderme humana para avaliação de produtos cosméticos ou medicamentos com uso tópico. Alguns já validados pela

OECD para irritação cutânea, tais como o Episkin<sup>®</sup>, Skinethic<sup>®</sup>, Epiderm<sup>®</sup> e EST 1000 (GROEBER, 2011).

Os modelos que utilizam o kit com epiderme humana reconstruída são os com a abordagem mais promissora para avaliação de eficácia em cosméticos. Os modelos de pele tri-dimensional apresentam vantagens importantes em comparação com as culturas de células em monocada e modelos de epiderme na avaliação de eficácia: (i) a possibilidade de cultivo por um tempo maior permite a aplicação repetida de cremes contendo bioativos e (ii) a similaridade com a pele humana preservando a interação entre a derme e epiderme. Estas similaridades incluem marcadores de diferenciação de queratinócitos, tais quais: filagrina e transglutaminase assim como proteínas da lamina basal (laminina, colágeno tipo IV) e proteínas de matriz extracelular como a elastina.

A eficácia de bioativos selecionados é determinada por parâmetros chaves, como por exemplo, o estímulo à síntese de colágeno na derme e modelos de pele equivalentes, comparados a vitamina C um controle positivo (SCHLOTMANN, 2001).

O perfil de qualidade de um produto cosmético engloba eficácia e segurança de seu uso, a estabilidade da formulação e o aspecto sensorial. Conforme citado anteriormente, clinicamente, as principais alterações moleculares e celulares no envelhecimento são visíveis através de rugas, aspereza, redução da elasticidade entre outros (SÜDEL, 2005). Podemos também citar outras alterações funcionais, tais como: aumento do pH da superfície da pele, aumentando sua susceptibilidade a infecção, diminuição da percepção neurosensorial à dor, aumentando o risco de injúria térmica, declínio do conteúdo de lipídios reduzindo a eficácia de alguns medicamentos tópicos e as reações alérgicas e irritantes ficam lentas e menos intensas o que compromete a pele envelhecida na sua capacidade de reparar danos e feridas (FARAGE 2008). Esses aspectos foram utilizados como referência para avaliação de novos ativos com ação antienvhecimento.

As técnicas de biofísica da pele foram encontradas como técnicas amplamente empregadas na avaliação do efeito de formulações de uso tópico, principalmente por possibilitar a avaliação de produtos em suas reais condições de uso, ou seja, diretamente na pele humana (GONÇALVES & CAMPOS, 2009). Estas técnicas consistem no estudo das características biológicas, mecânicas e funcionais da pele, por meio da medição de determinadas variáveis, por métodos não invasivos cientificamente comprovados. Existe grande número de variáveis que podem ser consideradas como indicativas do estado em que se encontra a pele em relação à sua integridade e qualidade, em especial da epiderme, que podem ser mensuradas com simplicidade de operação, por meio dessas técnicas (REUTHER

*et al.*, 2007). Exemplos claros são as análises da umectação cutânea, do teor de gordura (ou sebo), do valor de pH da superfície cutânea, da medida da perda transepidérmica de água e avaliação do relevo cutâneo (EGAWA *et al.*, 2002). Além disso, é ainda possível monitorar as condições das camadas mais profundas, como a derme, por meio da determinação das propriedades mecânicas da pele. O potencial de aplicação dessa tecnologia tornou-se imenso, sendo possível abordar aspectos como a análise e caracterização do estado funcional da superfície da pele, a quantificação e caracterização de certas afecções cutâneas e análise dos efeitos terapêuticos ou cosméticos (GONÇALVES, 2009). Porém estas técnicas são eficazes para avaliação do produto cosmético final, já com os ativos propostos incorporados ao veículo final, tais como: géis, sérum, cremes ou loções. Para avaliação inicial de eficácia para o proposto ativo os testes ficam restritos a ensaios *in vitro* ou em ou cobaias.

Como dito, o objetivo deste trabalho foi selecionar metodologias para descoberta de novos ativos com ação antienvhecimento através de métodos alternativos ao uso de cobaias. Seguindo essa premissa os testes *in vitro* encontrados avaliaram parâmetros observados no envelhecimento tais como: desidratação, diminuição da barreira cutânea, estímulo à produção de colágeno e elastina, inibição da síntese de melanina, inibição do dano causado ao DNA e avaliação do efeito imunoprotetor.

No início da avaliação do proposto ativo com ação antienvhecimento, ainda não é possível prever sua ação. Recentemente Swinney e Anthony (2011) classificaram as metodologias de descoberta de novas drogas em três grandes categorias:

- Descoberta de substâncias biológicas: Metodologia que visa à descoberta de enzimas ou grandes peptídeos para reposição de vias metabólicas deficientes como insulina e eritropoetina.
- Descoberta por triagem fenotípica - Metodologias que avaliam um efeito sem a preocupação imediata de avaliar o mecanismo de ação da substância.
- Descoberta por alvo definido - Metodologias que utilizam ensaios enzimáticos para identificação de substâncias.

De fato cada uma destas metodologias de trabalho possui vantagens e desvantagens. A principal vantagem de se usar metodologias que envolvem alvo definido é a certeza do mecanismo de ação de substâncias. Já para na descoberta por fenótipo não há uma pré-seleção de substâncias definida pela falta de ação sobre determinado alvo. Desta forma, substâncias podem ter a atividade esperada sem que atue diretamente no alvo.

Os testes *in vitro* selecionados fornecem resultados através de reações enzimáticas, como por exemplo, bloqueio da tirosinase, enzima chave na síntese dos pigmentos de

melanina ou estímulo à síntese de proteína presentes na matriz extracelular, como o colágeno, por exemplo. Para cada teste *in vitro* selecionado, pelo menos uma evidência *in vivo*, isto é através da avaliação clínica em voluntários foi selecionada para ratificar a eficácia observada inicialmente. Sendo assim, optamos por selecionar métodos de possibilitem a descoberta de substâncias com atividade antienvhecimento por fenótipo.

Dentre os testes observados para avaliação da eficácia de novas substâncias no que tange a hidratação, as referências encontradas avaliam a expressão de filagrina, uma proteína sintetizada por queratinócitos e liberada para o meio extracelular. Nesse ambiente são degradadas em aminoácidos que são modificados exercendo efeito higroscópico. Mutações no gene da filagranina que acarretam na perda de sua função é a causa primária de algumas doenças relacionada a intensa desidratação da pele, como por exemplo a ictiose vulgaris, dentre outras patologias (OVAERE, 2009). Outro teste selecionado para avaliação da eficácia hidratante de um proposto ativo foi a expressão de aquaporinas-3. Estudos recentes mostraram que as aquaporinas são proteínas de transporte de membrana que formam canais permeáveis à água, glicerina e uréia e também participam da via de hidratação do estrato córneo e epiderme (PERDEDA, 2010). Outra técnica observada para a avaliação do efeito hidratante foi a espectroscopia de Raman. A espectroscopia de Raman foi identificada como um equipamento completo, pois permite a avaliação *in vivo* e *in vitro*. Além disso, comparado as avaliações *in vivo*, principalmente a que utiliza o Corneometer<sup>®</sup>, técnica mais utilizada, o Raman possui a vantagem de não sofrer interferência da glicerina substância comum nas formulações com a finalidade de hidratação. Apesar de todas as vantagens o equipamento possui custo elevado e apenas 2 unidades disponíveis no Brasil. Os demais equipamentos citados para avaliação *in vivo* tais como: a análise por infravermelho e a ressonância magnética nuclear, apesar da vantagem de serem técnicas não invasivas também esbarram na dificuldade de acesso a esses equipamentos. Sendo assim, o Corneometer<sup>®</sup>, o qual se baseia nas diferenças entre a constante dielétrica da água e de outras substâncias apresenta a vantagem de não sofrer a interferência de sais ou produtos químicos aplicados sobre a pele, associado a avaliação da perda de água transepidérmica com o Evaporimeter<sup>®</sup> mostrando-se a associação de métodos de escolha para avaliação do efeito hidratante de formulações tópicas (GONÇALVES).

Para avaliação *in vitro* do efeito redutor de rugas e linhas de expressão os métodos encontrados baseiam-se na quantificação de colágeno produzido após incorporação do ativo ao meio de cultura, tanto para monocamadas de células de fibroblastos quanto para modelos de pele equivalentes ou em modelos de pele produzidos em escala industrial. Os modelos

produzidos em escala industrial possuem algumas vantagens em relação a outros modelos de laboratório desenvolvidos para usos individuais:

- Disponibilidade para um número grande de amostras permitindo uma avaliação rápida e homogênea de um grande número de produtos. No caso de modelos de laboratório a limitação das amostras de biópsia dos quais os queratinócitos são isolados não permite uma produção em grande escala;

- A redução dos custos globais pela redução da infraestrutura necessária para a cultura de células para os usuários;

- O uso de modelos e protocolos padronizados garante a reprodutibilidade e relevância dos resultados aumentando sua utilidade para avaliar a qualidade e segurança de produtos cosméticos.

Apesar das vantagens apontadas acima, este modelo não permite a avaliação quantitativa precisa, sendo necessária a realização do teste em monocamadas de células realizada com cultura de fibroblastos, sendo essa técnica recomendada para avaliação do aumento da síntese de colágeno, principal marcador biológico para avaliação do parâmetro melhoria de rugas e linha de expressão (PAOLINO, 2010). Para ratificar os resultados obtidos *in vitro*, sugere-se a realização do teste clínico, ou seja *in vivo*, com voluntários, utilizando Visiocan<sup>®</sup> ou Visia<sup>®</sup> ou lentes e câmeras de qualidade que forneçam boas imagens para análise através de softwares específicos.

Os danos causados pelo sol correspondem a cerca de 80% dos sinais faciais observados no envelhecimento. Sendo assim, prevenir esses danos representa um mecanismo antienvhecimento (BAUMANN, 2004). Os trabalhos encontrados na literatura avaliam o efeito fotoprotetor dos ativos através da dose mínima eritematógena (DME). Na presença desses ativos fotoprotetores, tais como ácido ferúlico, vitamina C e Vitamina E, se faz necessária um número maior de DME para visualização do eritema, comprovando seu efeito fotoprotetor. Diante desses experimentos sugere-se que esses ativos sejam incorporados nas formulações de fotoprotetores com objetivo de ampliar sua ação fotoprotetora e prevenir os danos causados pela radiação solar. No trabalho publicado por Lin e colaboradores além de exercer ação fotoprotetora esses ativos preveniram a formação de dímeros de timidina observados através de testes de imunohistoquímica (LIN, 2005).

Já é bem conhecido que a radiação UVB é mais energética, porém menos penetrante que a radiação UVA. Portanto a radiação UVB irá afetar preferencialmente a superfície da pele enquanto que a radiação UVA irá afetar a pele em camadas mais profundas (MIRANDA, 2010). Para avaliar o efeito fotoprotetor Bernerd e Asselineau realizaram experimentos com

modelos de pele equivalente após exposição UVA e UVB. A radiação UVB afetou preferencialmente a epiderme produzindo alterações envolvendo o DNA e a via de diferenciação dos queratinócitos. O efeito mais óbvio da exposição UVB foi o aumento do número de queratinócitos apoptóticas, reconhecidos facilmente histologicamente e também chamadas de células de queimadura, ou em inglês "sun burn cells" (SBC), que constituem o principal marcador também *in vivo* dos danos causados pelo UVB. A radiação UVA afetou preferencialmente os componentes da derme induzindo a apoptoses de fibroblastos superficiais nos quais os queratinócitos não parecem ser afetados sugerindo um diferencial de resistência dessas duas células a radiação UVA. Os experimentos com pele equivalente permite avaliar o efeito fotoprotetor de moléculas que não possuem restrições para a avaliação através de espectrofotometria, não acarretam sensibilização como citado em alguns testes *in vivo* acima ou necessitam de equipamentos caros, de difícil acesso ou manuseio e não faz uso de cobaias. Além disso, permitem a avaliação das radiações UVA e UVB, sendo, portanto, o método de escolha para avaliação do efeito fotoprotetor (BERNERD, 2008).

Para ratificar o efeito fotoprotetor, é importante a avaliação *in vivo*. Dentre as metodologias citadas nos resultados, três encontram-se aceitas pela legislação brasileira: uma para avaliação da proteção UVB e outras duas para avaliação da proteção UVA (ANVISA, 2012). A avaliação do efeito protetor da radiação UVB é obtida através da obtenção do FPS e para avaliação da proteção UVA através da obtenção do fator de proteção UVA, metodologia realizada *in vitro* e outra *in vivo* obtida através do PPD (ANVISA, 2012). As técnicas *in vivo* necessitam da aprovação por um comitê de ética obedecendo a Resolução CNS (conselho nacional de saúde) n.196, de 10 de outubro de 1996, onde todos os projetos de pesquisa envolvendo humanos devem obedecer às recomendações dessa resolução através de protocolos de trabalhos validados para a obtenção de dados confiáveis e condizentes com a realidade. Por esse motivo, torna-se o processo de avaliação preliminar inviável, pois além da necessidade do comitê, se faz necessária a captação dos voluntários e acompanhamento por profissionais de várias áreas incluindo um médico dermatologista. Por esses motivos, para avaliação primária da eficácia fotoprotetora sugere-se métodos mais acessíveis aos laboratórios de pesquisa, tais como, a análise através do espectrofotômetro para proteção UVB, análise imunohistoquímica de dímeros de timidina após exposição da radiação UV, ou a avaliação em modelos de pele equivalente.

Conforme abordado anteriormente, o estímulo da radiação UV induz ainda a expressão de eicosanóides, tais como prostaglandina E2 (PGE2); citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, TNF- $\alpha$  e quimiocinas (IL-8); e fatores de crescimento. De todos os mediadores inflamatórios



produzidos pelas células da pele, PGE<sub>2</sub>, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  ativam um número suficiente de mecanismos efetores, levando à vasodilatação e à degranulação de mastócitos, ocasionando prurido, ardor e demais sinais neurossensoriais da inflamação cutânea. Estas alterações bioquímicas na fisiopatologia da derme ativam enzimas de degradação proteica, especialmente as metaloproteinases, que degradam colágeno, elastina e outras macromoléculas da matriz extracelular. Portanto a atividade imunoprotetora torna-se alvo de ação para produtos ativos com ação antienvhecimento. Dos testes encontrados na literatura podemos destacar a avaliação em biópsia de pele do RNAm de mediadores pró-inflamatórios (IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- $\alpha$ ) por PCR (MURRAY, 2008). Esta é uma técnica precisa, sensível e de baixo custo, tornado viável a aplicação de PCR em biópsias de pele para avaliação de mediadores inflamatórios.

Como citado anteriormente, as manchas também fazem parte de um dos sinais do envelhecimento. Em algumas culturas como no Japão a pele clara e uniforme permanece como referência de beleza. Já existe disponível no mercado kits (Melanoderme<sup>®</sup>) para avaliação da eficácia, estabilidade e citotoxicidade de agentes despigmentantes. O teste dura 3 dias e baseia-se na inibição da síntese de melanina. A melanina sintetizada é extraída e medida a 490nm no leitor de microplacas. Como complemento a esta metodologia sugere-se o uso da coloração Fontana Masson para modelos de pele equivalente para visualização dos pontos de hiperpigmentação (Yoon, 2003).

O parâmetro flacidez pode ser avaliado *in vivo* através das propriedades mecânicas da pele que possui comportamento viscoelástico, apresentando tanto características elásticas quanto plásticas (GONÇALVES, 2009). Para avaliação *in vitro*, a redução da flacidez é determinada pelo aumento da síntese das fibras elásticas. Poucos testes de eficácia para avaliar esse parâmetro *in vitro* foram encontrados. Os testes *in vitro* ficam resumidos a ensaios de imunohistoquímica para elastina, colágeno tipo I e fibrilina-1 (principal constituinte das microfibrilas dos tecidos elásticos) com modelos de pele equivalente (LACROIX, 2007). Avaliação *in vivo* encontrada resume-se basicamente a aplicação de dois equipamentos: Cutometer<sup>®</sup> para avaliar a elasticidade, e o Elastometer<sup>®</sup>, para avaliação da firmeza (capacidade da pele de resistir à posição original depois de pressão)

Para avaliação do efeito protetor ao DNA nenhuma técnica *in vivo*, isto é, nenhuma avaliação clínica foi encontrada. Os ensaios encontrados avaliam a formação de dímeros de timidina ou pirimidina após fotoexposição através de testes por imunohistoquímica.

Desta forma, acreditamos que o uso de modelos de pele equivalentes e experimentos *ex vivo* podem ser utilizados como testes preliminares de eficácia para cosméticos com finalidade antienvelhecimento.

## 7. CONCLUSÃO

Por ser uma classe recente, a legislação que regulamenta o registro de cosmecêuticos não existe. Considerando como cosmético, baseado no levantamento bibliográfico realizado acerca das técnicas de avaliação de segurança e eficácia priorizando métodos alternativos encontrados na literatura, conclui-se que nenhum teste de eficácia encontra-se validado e poucos testes de segurança encontram-se aceitos mundialmente, comprovando a necessidade de grande investimento dos governos e instituições de pesquisa para que haja desenvolvimento e validação de novos métodos alternativos visando a substituição total do uso de cobaias.

## 8. REFERÊNCIAS

- ABBOT, A. More than a cosmetic change. **Nature**. v. 438, p.10, 2005.
- ADLER S.; BASKETTER D.; CRETON, S.; et al. Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. **Arch Toxicol**. v.85, n.5, p.367-485, 2011.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFI, M.; ROBERTS, K.; VATSON, D. **Molecular Biology of the Cell**. 2nd ed. Galtand Publishing, New York.
- BALLS, M.; BLAAUBOER, B. J.; FENTEM, J. H.; et al. Practical aspects of the validation of toxicity test procedures. **ATLA**, v. 23, p. 129-147, 1995.
- BALIN, A.K.; KLIGMAN, A.M. Aging and the Skin. **Raven Press**, New York, 1989.
- BAREL, A. O.; PAYER M.; MAIBACH H. I. **Handbook of cosmetic science and technology**. Taylor & Francis e-Library, 2005. Disponível em: <books.google.com.br/>. Acesso em: 10 jul. 2011.

- BARJA, G. Free radicals and aging. **Trends in Neurosciences**. v.27, n.10, Oct, 2004.
  
- BEAUSEJPUR, C. M.; KRTOLICA, A.; GALIMI, F.; NARITA, M.; LOWE, S.W.; YASWEN, P. and CAMPISI, J. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. **EMBO J**. v.22, p.4212–4222, 2003.
  
- BECKMAN, K.B. and BRUCE N.A. The Free Radical Theory of Aging Matures. **Physiol. Rev**. v.78, p.547–581, 1998.
  
- BERNERD, F. and ASSELINEAU, D. An organotypic model of skin to study photodamage and photoprotection in vitro **J Am Acad. Dermatol**. v. 58, n.5, 2008
  
- BONINA, F.; PUGLIA, C.; VENTURA, D.; AQUINO, R.; TORTORA, S.; SACCHI, A.; SAIJA, A.; TOMAINO, A.; PELLEGRINO, M. L. and De CAPRARIIS, P. In vitro antioxidant and in vivo photoprotective effects of a lyophilized extract of *Capparis pinosa* L. buds. **J. Cosmet.Sci**. v.53, p.321-335, nov/dec, 2002.
  
- BRADY, C.A.; JIANG, D., MELLO, S.S. Distinct p53 transcriptional programs dictate acute DNA-damage responses and tumor suppression. **Cell**. v.13, n.145, p.571-83, 2011.
  
- BRINCAT, M. P.; BARON, Y.M. and GALEA, R. Estrogens and the skin. **Climacteric**. v.8, p.110–123, 2005.
  
- BRASIL. Decreto n.79.094, de 5 de janeiro de 1977. O Ministério da Saúde submete ao sistema de vigilância sanitária os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, produtos de higiene, saneantes e outros. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis>>. Acesso em: 24 nov. 2011.
  
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos. 2012. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/92f15c004e219a73a96dbbc09d49251b/Guia\\_cosmeticos\\_grafica\\_final.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/92f15c004e219a73a96dbbc09d49251b/Guia_cosmeticos_grafica_final.pdf?MOD=AJPERES)>. Acesso em: 15 set. 2013.
  
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n.211 de 14 de julho de 2005. Ficam estabelecidas a Definição e a Classificação de Produtos de Higiene Pessoal, cosméticos e Perfumes, conforme Anexos I e II desta Resolução. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis>>. Acesso em: 06 jul. 2011.

- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC N° 332 de 01 de dezembro de 2005. As empresas fabricantes e/ou importadoras de Produtos de Higiene Pessoal Cosméticos e Perfumes, instaladas no território nacional deverão implementar um Sistema de Cosmetovigilância, a partir de 31 de dezembro de 2005. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis>> . Acesso em: 06 jul. 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução Resolução RDC N° 30 de 1° de junho de 2012. Aprova o Regulamento Técnico Mercosul sobre Protetores Solares em Cosméticos e dá outras providências. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis>> . Acesso em: 10 fev. 2013.
- BUCKINGHAM, E.M.; KLINGELHUTZ, A.J. The role of telomeres in the ageing of human skin. **Exp Dermatol.** v.20, n.4, p.297-302, 2011.
- CAMPISI, J.; DI FAGAGNA, D. F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. **Nat Rev Mol Cell Biol.** v.8, n.9, p.729-40, 2007.
- CAMPISI J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. **Cell.** v.25, n.4, p.513-22, 2005.
- CASPERS, P. J.; LUCASSEN, G. W., and PUPPELS, G. J. Combined In Vivo Confocal Raman Spectroscopy and Confocal Microscopy of Human Skin. **Biophysical Journal.** v.85, n.1, p.572–580, 2003.
- CHANG, E. & HARLEY, C. B. Telomere length and replicative aging in human vascular tissues. **Proc. Natl Acad. Sci. USA.** v.92, p.11190–11194, 1995.
- CHIU, P.; CHAN, C.; LIN, H.; CHIU, H. The clinical anti-aging effects of topical kinetin and niacinamide in Asians: a randomized, double-blind, placebo-controlled, split-face comparative trial. **Journal of Cosmetic Dermatology.** v.6, p. 243–249, 2007.
- CHOI, C.W. et al. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant Science** v.163, p.1161-1168, 2002.
- COLIPA. Working together to replace animal testing. Disponível em: <<http://www.colipa.eu/publications-colipa-the-european-cosmetic-cosmetics-association/alternatives-to-animal-testing.html?view=item&id=68%3Aworking->

together-to-replace-animal-testing&catid=43%3Aalternatives-to-animal-testing>.  
Acesso em: 19 nov. 2011.

- DACRUZ, S.M. e AANGELIS, L.H. Alternativas aos testes de segurança de cosméticos em animais. **Pós em revista**. Disponível em: <posemrevista.files.wordpress.com/2012/06/pdf-e5-s31.pdf>. Acesso em: 27 jan. 2013.
- DYKES, P.J. What are meters measuring? **International Journal of Cosmetic Science**, v.24, p.241-245, 2002.
- DRAELOS, Z. D. Cosmeceuticals: undefined, unclassified, and unregulated. **Clin Dermatol**. v.27, n.5, p.431-434, 2009
- EGAWA, M., HIRAO, T. and TAKAHASHI, M. In vivo Estimation of Stratum Corneum Thickness from Water Concentration Profiles Obtained with Raman Spectroscopy. **Acta Derm Venereol**. v.87, p. 4–8, 2007.
- FARAGE, M.A.; MILLER, K. W.; MAIBACH, H. I. **Textbook of Aging Skin**, Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010.
- FARAGE M.A.; MILLER, K. W.; ELSNER, P.; MAIBACH, H. I. Functional and physiological characteristics of the aging skin. **Aging Clinical and Experimental Research**. v.20, n.3, p.195-200, 2004. Disponível em: <<http://ukpmc.ac.uk/abstract/MED/18594185>>. Acesso em: 26 set. 2012.
- FENSKE, N.A. and LOBER, C.W. Structural and functional of normal aging skin. **Journal of American Academy of Dermatology**. v.15, p. 571-585, 1986.
- GILLIES, R.; MOYAL, D.; FORESTIER, S. and KOLLIAS, N. Non-invasive in vivo determination of UVA efficacy of sunscreens using diffuse reflectance spectroscopy. **Photodermatol. Photoimmunol. Photomed**. 19:190-194, 2003.
- GONÇALVES, G. M. S.; CAMPOS, P. M. B. G. M. Aplicação de métodos de biofísica no estudo da eficácia de produtos dermocosméticos. **Jornal brasileiro de ciências farmacêuticas**. v.45, n.1, jan/mar, 2009.
- GROEBER, F.; HOLEITER, M.; HAMPEL, M.; HINDERER, S. and SCHENKE-LAYLAND, K. Skin tissue engineering – *In vivo* and *in vitro* applications. **Advanced drug delivery reviews**. v.128, p.352-366, 2011.

- GUTERIDGE, J.M.C. Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. **Chemico-biological interactions**. v.9, p. 133-140, 1994.
- HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. **Free Radicals in Biology and Medicine**, fourth ed. Oxford University Press, 2007.
- HARATAKE, A.; UCHIDA, Y.; MIMURA, K. Intrinsically aged epidermis display diminish UVB-induced alterations in barrier function associated with decreased proliferation. **J. Invest. Dermatol.** v.108, p.319-323,1997.
- Harman, D., Free radical theory of aging. *Mutation Research/DNAging*. v..275, no.3-6, p.257-266, 1992.
- HAYFLICK, L. The limited in vitro life time of human diploid cell strains. **Exp. Cell Res.** v.37, p. 614–636, 1965.
- HENDRIKSEN, C.F.M. A short history of the use of animals in vaccine development and quality control. **Dev. Biol. Stand.** v. 86, p. 3-10, 1996.
- ICCVAM. Validation and regulatory acceptance of toxicological test methods: a report of the ad hoc Interagency Coordinating Committee of Alternative Methods. 1997. **National Institutes of Health (NIH) Publication**. n. 97, p.3981, 1997.
- IVERSEN, O.H. & SCHJOELBERG, A.R. Age related changes of epidermal cell kinetics in the hairless mouse. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*.46:135-143,1984
- JEYAPALAN, J. C.; FERREIRA, M.; SEDIVY, J. M. & HERBIG, U. Accumulation of senescent cells in mitotic tissue of aging primates. **Mech. Ageing Dev.** V.128, p.36–44, 2007.
- KAREL, J.O. and YANNIAS, J.A. Contact dermatitis to cosmetics, fragrances, and botanicals *Dermatologic Therapy*, v. 17, p.264–271, 2004.
- KLIGMAN, A.K. Cosmeceuticals: do we need a new category? *Cosmeceuticals: Drugs vs. Cosmetics*. **New York: Marcel Dekker**, p.1–7, 2000.

- KOHEN, R. Skin antioxidants: their role in aging and in oxidative stress - New approaches for their evaluation. **Biomed & Pharmacother.**; v.53, p.181-92, 1999.
- LACORIX, S.; BOUEZ, C.; VIDAL, S.; CENEZIO, V.; REYMERMIE, C.; JUSTIN, V.; VICANOVA, J. and DAMOUR, O. Supplementation with a complex of active nutrients improved dermal and epidermal characteristics in skin equivalents generated from fibroblasts from young or aged donors. **Biogerontology**. v.8, p.97–109, 2007.
- LEE, Y.; JE, Y.; LEE, S.; LI, Z.J.; CHOI, K.; KWON, Y.; SOHN, K.; IM, M.; SEO, Y.J. and LEE. Changes in Transepidermal Water Loss and Skin Hydration according to Expression of Aquaporin-3 in Psoriasis. **Ann Dermatol**. v.24, n.2, 2012.
- LOPRIENO, N.; BRUNER, L.H.; CARR, G.J.; CHAMBERLAIN, M.; COTTIN, M., DE SILVA, O. and KATO, S. Alternatives in Cosmetics Testing. **Toxic. In vitro**. v.9, n.6, p.827-838, 1995.
- MAKRANTONAKI & ZOUBOULIS. Molecular Mechanisms of Skin Aging. **Ann. N.Y. Acad. Sci**. v.1119, p.40–50, 2007.
- MCCALLION, R. and PO, L.W. A Dry and photo-aged skin: manifestations and management. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*. v.18, p.15-32, 1993.
- MILLIKAN, L.E. Cosmetology, cosmetics, cosmeceuticals: definitions and regulations. **Clin. Dermatol.**, Philadelphia, v.19, p.371-374, 2001.
- MIRANDA, A. F., KENNETH, W. M., HOWARD, I. M. **Textbook of aging skin**. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg 2010
- MOISEEVA, O., MALLETTE, F. A., MUKHOPADHYAY, U. K., MOORES, A. & FERBEYERE, G. DNA damage signaling and p53-dependent senescence after prolonged -interferon stimulation. **Mol. Biol. Cell** 17, 1583–1592, 2006.
- MURRAY, J.C.; BURCH, J.A.; STREILEIN, R.D.; IANNACCHIONE, M.A.; HALL, R.P. and PINNELL, S.R. A topical antioxidant solution containing vitamins C and E stabilized by ferulic acid provides protection for human skin against damage caused by ultraviolet irradiation. **J. Am. Acad. Dermatol**. v.59, n.3, 2008.
- NEWBURGER, A. E. Cosmeceuticals: myths and misconceptions. **Clin Dermatol**. v.27, n.5, p.446-52, 2009.

- OECD. Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment. Paris, France: **Organisation for Economic Co-operation and Development**.v.14, n.34, p.96, 2005.
- OVAERE, P.; LIPPENS, S.; VANDELABEELE, P. and DECLERCQ, W. The emerging roles of serine protease cascades in the epidermis. **Trends in Biochemical Sciences**. v.34, n..9, 2009.
- PANICH, U.; TANGSUPA-A-NAN, V.; ONKOKSOONG, T.; KONGTAPHAN, K.; KASETSINSOMBAT, K.; AKARESEREENONT, P.; WONGKAJORN SILP, A. Inhibition of UVA-mediated melanogenesis by ascorbic acid through modulation of antioxidant defense and nitric oxide system. **Arch Pharm Res**. v.34, n.5, p.811-20, 2011.
- PAUWELS, M., ROGIERS, V. Safety evaluation of cosmetics in the EU: Reality and changes for the toxicologist. **Toxicol. Letters**, v. 151, p. 7-17, 2004.
- PEREDA, M.D.C.; DIEAMANT, G.C.; EBERLIN, S.; WERKA, R.M.; COLOMBI, D.; QUEIROZ, M.L.S. and DI STASI, L.C. Expression of differential genes involved in the maintenance of water balance in human skin by Piptadenia colubrina extract. **Journal of Cosmetic Dermatology**. v.9, p.35–43, 2010.
- PRESGRAVE, O.A.F.; CALDEIRA, C. e GIMENES, I. Métodos Alternativos ao uso de animais: uma visão atual. II Congresso brasileiro de bioética e bem estar animal. **Ciênc. vet. tróp.**, Recife-PE, v.13, sup.1, p. 106 - 117, 2010
- PRICE, J. S.; WATERS, J.G.; DARRAH, C.; PENNINGTON, C.; EDWARDS, D.R.; DONELL, S.T.; CLARK, I.M. The role of chondrocyte senescence in osteoarthritis. **Aging Cell** v.1, p.57–65, 2002.
- RISPIN, A.S.; STIEZEL, K. Ensuring quality of in vitro alternative test methods. **ALTEX** 23. Sup. 278-83, 2006.
- RODIER F. and CAMPISI, J. Four faces of cellular senescence. **J Cell Biol**. v.21, p.547-56, 2011.
- ROGUET, R.; COHEN, C. and LECLAIRE, J. Use of standardized reconstructed epidermis kit to assess in vitro the tolerance and the efficacy of cosmetics. **International Journal of Cosmetic Science**, 22:409-419(2000).



- SAKAI, S. et al. Hyaluronan Exists in the Normal Stratum Corneum. **The Journal of Investigative of Dermatology**. v.114, p.1184-1187, 2000.
- SATOR, P.G. Skin treatments and dermatological procedures to promote youthful skin. **Clinical Interventions in Aging**. v.1, p.51–56, 2006.
- SCHROEDER, P.; HAENDELER, J. and KRUTMANN, J. The role of near infrared radiation in photoaging of the skin **Experimental Gerontology**. v.43, p.629–632, 2008.
- SÜDEL, K. M.; VENZKE, K.; MIELKE, H; BREITENBACH, U.; MUNDT, C.; JASPER, S.; KOOP, U.; SAUERMENN, K.; KNUBMANN-HARTIG, E.; MOLL, I.; GERCKEN, G.; YOUNG, A. R.; STÄB, F.; WENCK, H. and GALLINAT, S. Novel Aspects of Intrinsic and Extrinsic Aging of Human Skin: Beneficial Effects of Soy Extract. **Photochemistry and Photobiology**. v.81, p.581–587, 2005.
- TAGAMI, H. Functional characteristics of the stratum corneum in photoaged skin in comparison with those found in intrinsic aging. **Arch. Dermatol. Res**. v.300, sup.1–6, 2008
- Tracking system for alternatives test methods review (TSAR). **European Commission**. Disponível em: <<http://tsar.jcr.ec.europa.eu/>>. Acesso em: 28 jun. 2011.
- TRAUTINGER, F. Mechanisms of photodamage of the skin and its functional consequences for skin ageing. **Clinical and Experimental Dermatology**. v.26, p.573-577, 2001.
- U. S. United States Patents Publication. CROWTHER, J. M.; BLENKIRON, P.; MATTS, P.J. and SIEG, A. **Confocal Raman spectroscopy for dermatological studies**. US n.7862507, 28 Aug 2006, 4 Jan 2011
- VASILE, E.; TOMITA, Y.; BROWN, L. F.; KOCHER, O. & DVORAK, H. F. Differential expression of thymosin -10 by early passage and senescent vascular endothelium is modulated by VPF/VEGF: Evidence for senescent endothelial cells in vivo at sites of atherosclerosis. **FASEB J**. v.15, p.458–466, 2001.
- VARANI J.; DAME, M. K.; RITTIE, L.; FLIGIEL, S.E.G.; KANG, S.; FISHER, G.J.; VOORHEES, J.J. Decreased Collagen Production in Chronologically Aged Skin Roles of Age-Dependent Alteration in Fibroblast Function and Defective Mechanical Stimulation. **American Journal of Pathology**, v. 168, n.6, 2006.

- VERDIÉR-SÉVRAIN, S. & BONTÉ, F. Skin hydration: a review on its molecular mechanisms. *Journal of Cosmetic Dermatology*. v.6, n.2, p.75–82, 2007.
- WEIGHARDT, F. Alternative testing. **Household and personal care today**. n.2, p.6, 2009. Disponível em: <[http://hpctoday.teknoscience.com/pdf/Weighardt\\_AlterTesting\\_HPC2-09.PDF](http://hpctoday.teknoscience.com/pdf/Weighardt_AlterTesting_HPC2-09.PDF)>.
- WITKOWSKI, J.A., PARISH, L.C. You've come a long way baby: a history of cosmetic lead toxicity. **Clin. Dermatol.**, Philadelphia, v. 19, p.3.
- WOLF, R., WOLF, D., TUZUN B., TUZUN, Y. Contact dermatitis to cosmetics. **Clin. Dermatol.**, Philadelphia, v. 19, p.502-515, 2011.
- ZEMTSOV, A. Human in vivo skin <sup>31</sup>P magnetic resonance spectroscopy. **Skin Research and Technology**. v.3: p.85-87, 1997.
- ZHANG, H. & COHEN, S. N. Smurf2 up-regulation activates telomere-dependent senescence. **Genes Dev**. v.18, p. 3028–3040, 2004.