

## USO DE MÉTODOS ALTERNATIVOS NA TOXICIDADE *IN VITRO* DE ÓLEOS ESSENCIAIS DA MATA ATLÂNTICA

**Natália Mencacci Esteves-Pedro<sup>1</sup>** (nataliapedro@usp.br), **Patricia Santos Lopes<sup>2</sup>**, **Bianca da Silva Sufi<sup>3</sup>**, **Andrea Cecília Dorion Rodas<sup>1</sup>**, **Monica Beatriz Mathor<sup>3</sup>**, **Olga Zazuco Higa<sup>3</sup>**, **Daniel Perez Vieira<sup>3</sup>**, **Kayo Okazaki<sup>3</sup>**, **Paulo Roberto Hrihorowitsch Moreno<sup>1</sup>**, **André Rolim Baby<sup>1</sup>**, **Aurea Cristina Lemos Lacerda<sup>1</sup>**, **Telma Mary Kaneko<sup>1</sup>**

1- Universidade de São Paulo - USP

2- Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP

3- Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares/ Comissão Nacional de Energia Nuclear – IPEN/CNEN

### RESUMO

Os óleos essenciais de plantas encontradas no rico bioma da Mata Atlântica, têm se apresentado como candidatos à utilização em formulações cosméticas como fragrâncias ou, devido ao seu potencial de atividade como promotor de permeação cutânea e conservante. Entretanto, para o seu uso deve ser avaliada a segurança por meio de testes toxicológicos. A 7<sup>th</sup> Amendment of the European Cosmetics Directive 2003/15/EC exige a substituição dos animais nos testes de toxicidade em cosméticos por métodos alternativos (MA), até março de 2013. Adicionalmente, centros internacionais de pesquisa e validação como *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD), *European Centre for Validation of Alternative Methods* (ECVAM), *The European Cosmetics Association* (COLIPA), e *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods* (ICCVAM), recomendam a utilização de MA validados. Com essa diretriz, o objetivo do trabalho foi avaliar a segurança de óleos essenciais de plantas da Mata Atlântica utilizando os testes recomendados pela OECD, tais como, citotoxicidade (OECD/GD 129), fototoxicidade (OECD 432) e micronúcleo *in vitro* (OECD 487). Nos ensaios de citotoxicidade com MTS/PMS na linhagem de fibroblastos murinos BALB/c 3T3 (número ATCC CCL-163), os óleos essenciais da *Pimenta pseudocaryophyllus*, quimiotipos Cananéia e Cataia, apresentaram respectivamente, os valores de concentração que inibem 10% de células desafiadas (IC<sub>10</sub>) em 24 horas: 0,378 e 0,310 mg/mL. Na avaliação da fototoxicidade desses óleos essenciais em células BALB/c 3T3, todos apresentaram PIF (*Photo Irradiation Fator*) menor que 2, portanto, não fototóxicos. Em relação ensaio do micronúcleo *in vitro* na linhagem CHO-K1 (número ATCC CCL-61), os óleos essenciais não foram potencialmente genotóxicos. Conclui-se que os óleos essenciais quimiotipos Cananéia e Cataia foram considerados seguros quando utilizados nas concentrações inferiores a 0,31 mg/mL, apresentaram-se não fototóxicos em concentrações menores ou igual a 0,1 mg/mL e não potencialmente genotóxicos 0,1 mg/mL, portanto podem ser considerados candidatos à ingredientes de formulações cosméticas.

**Palavras-chave:** óleos essenciais; segurança de cosméticos; métodos alternativos; toxicidade *in vitro*.

## 1. INTRODUÇÃO

Historicamente, o início da discussão sobre o uso de animais em ensaios toxicológicos e eficácia foi com a publicação do livro *Principles of Human Experimental Technique* em 1959, seguida dos movimentos de proteção aos animais. A partir deste episódio, fica estabelecido o princípio dos 3R's que correspondem a: *Refinement* ou Refinamento promove o alívio ou minimização da dor e o estresse dos animais; *Reduction* ou Redução responsável pela diminuição no número de animais utilizados para obter a mesma qualidade de informações dos testes clássicos *in vivo*; e *Replacement* ou Substituição estabelece que, um determinado objetivo seja alcançado sem o uso de animais vertebrados vivos. Baseado nesse conceito surge o termo “métodos alternativos” (ANVISA, 2003; RUSSEL e BURCH, 2009; RENAMA, 2013).

Com relação à validação de métodos alternativos, diversas instituições internacionalmente renomadas são referências, tais como: a pioneira *European Committee for Validation of Alternative Methods* (ECVAM); *Cosmetic, Toiletries and Frangrance Association* (CTFA); *The European Cosmetics Association* (COLIPA); *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods* (ICCVAM); e *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD). Dentre os diversos métodos alternativos validados e realizados em linhagens celulares eucariontes, estão: fototoxicidade; teste do micronúcleo *in vitro*; e citotoxicidade (ANVISA, 2003).

Como marco regulatório dos métodos alternativos, destaca-se a 7<sup>th</sup> *Amendment to the Cosmetics Directive 2003/15/EC* que, proíbe o uso de animais a partir do ano de 2013 em testes para ingredientes e/ou produtos cosméticos. A Diretiva assegurava, portanto, a circulação na Comunidade Europeia de produtos cosméticos livres de experimentação animal, e com segurança garantida aos consumidores. Considerando a importância dos produtos e ingredientes brasileiros no mercado europeu de cosméticos, o tema métodos alternativos à experimentação animal, vem sendo aplicado por meio de leis e decretos. Recentemente no Brasil, houve a criação do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) responsável pelo credenciamento das instituições que utilizem animais em seus trabalhos, e a criação da Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA) que certifica e a valida novos métodos alternativos. O processo de validação dos métodos alternativos propostos e/ou desenvolvidos pela RENAMA ocorrerá no âmbito do Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos, BraCVAm (ANVISA, 2003; EC, 2003; BRASIL, 2009; BRASIL, 2012).

Destaca-se que a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), elaborou o Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos que, recomenda o uso de métodos alternativos validados na avaliação da segurança de produtos acabados e ingredientes cosméticos. Utilizados como ingredientes em formulações cosméticas, os óleos essenciais são compostos complexos voláteis de odor característico, lipossolúveis e formados a partir do metabolismo secundário de plantas aromáticas. Do ponto de vista farmacológico, a literatura descreve seu elevado potencial biológico como promotor de permeação e nas atividades antibacteriana e antifúngica (ANVISA, 2003; BAKKALI *et al.*, 2008; FANG *et al.*, 2004; BROCHINI e LAGO, 2007).

A atividade antimicrobiana e outras ações farmacológicas são propriedades encontradas em óleos essenciais de plantas da Mata Atlântica. Os quimiotipos provenientes do óleo essencial *Pimenta pseudocaryophyllus*, popularmente conhecida como Cataia, Craveiro e Louro do mato, exibiram alta atividade antimicrobiana, com valores em torno de 0,04 mg/mL para a Concentração Inibitória Mínima, CIM. A comprovação dessa atividade antimicrobiana possibilita a utilização destes óleos essenciais como conservantes naturais, em substituição aos conservantes de origem sintética que, podem apresentar reações tóxicas ao

usuário. Dessa forma, a seleção definitiva do agente conservante deve ter um compromisso entre eficácia antimicrobiana e compatibilidade com o produto acabado, além da segurança ao consumidor avaliada por testes toxicológicos (LAHLOU, 2004; LIMA, *et al.*, 2006; CUSTÓDIO, *et al.*, 2010; PINTO; KANEKO; PINTO, 2010).

Nos estudos das propriedades toxicológicas e farmacológicas dos óleos essenciais, a lipossolubilidade confere dificuldades de dispersão em meios hidrofílicos (LAHLOU, 2004). Na obtenção de amostras para os ensaios em linhagens celulares eucariontes, em que os meios de cultura são hidrofílicos, a dispersão dos óleos deve ser realizada em agentes que confirmam ausência de citotoxicidade, evitando desta forma, resultados falso-positivos.

Pelo exposto, vislumbra-se a avaliação *in vitro* da toxicidade dos óleos essenciais provenientes da *Pimenta pseudocaryophyllus*, baseado em métodos alternativos validados de citotoxicidade (OECD/GD 129, 2010), fototoxicidade (OECD 432, 2004) e micronúcleo *in vitro* (OECD 487, 2010). Considerando, portanto, a possibilidade de incorporação desses óleos em formulações cosméticas e farmacêuticas com eficácia e segurança.

## 2. OBJETIVOS

Avaliação da segurança dos óleos essenciais da *Pimenta pseudocaryophyllus* e seus quimiotipos Cananéia e Cataia, candidatos a em uso cosméticos, por meio dos testes de citotoxicidade, fototoxicidade e micronúcleo *in vitro*, baseando-se em métodos alternativos validados recomendados pela *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD).

## 3. MATERIAIS e MÉTODOS

### 3.1 Extração dos óleos essenciais da *Pimenta pseudocaryophyllus*

Os óleos essenciais da *Pimenta pseudocaryophyllus* foram extraídos por hidrodestilação (SIMÕES *et al.*, 2007) das folhas provenientes de plantas da região de Mata Atlântica, dando origem aos quimiotipos: Cananéia, da Ilha de Cananéia; e Cataia, do Morro da Cataia na cidade de Cajati. Uma exsicata de cada população está depositada no Instituto de Botânica do Estado de São Paulo sob os números Moreno 34 (Ilha de Cananéia) e Moreno 253 (Morro da Cataia). A análise da composição química do óleo essencial foi realizada por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massa, CG/SM.

### 3.2 Dispersão do óleo essencial

A dispersão dos óleos essenciais no meio de cultura foi obtida com o tensoativo polissorbato 20 (EHL 16,7), segundo a teoria do equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL), descrita por Griffin (1949).

### 3.3 Cultura de células eucariontes

A linhagem celular BALB/c 3T3 derivada de fibroblastos de camundongos (número ATCC CCL-163) foi utilizada nos ensaios de citotoxicidade e fototoxicidade. O meio de cultura foi o DMEM (*Dubelcco's Modified Eagle Medium*) suplementado com 10% (v/v) de DBS (*Donnor Bovine Serum*), antibiótico-antimicótico (penicilina 100 UI, estreptomicina 100 mg/mL e anfotericina 0,025 mg/mL) e 4 mM de glutamina (ATCC, 2013a).

A linhagem celular CHO-K1 (número ATCC CCL-61), utilizada no ensaio MNvit, corresponde as células do ovário de hamster chinês (ATCC, 2013b). O meio de cultivo foi o RPMI-1640 suplementado com 10% (v/v) de FBS (*Fetal Bovine Serum*), antibiótico, antimicótico e glutamina nas mesmas concentrações do meio para BALB/c 3T3 (RODAS *et al.*, 2008).

Os ensaios foram realizados em condições assépticas segundo o *OECD Principles on Good Laboratory Practice* (OECD, 1998). A incubação celular foi realizada em estufas a 37°C em atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub>, até atingirem a subconfluência de aproximadamente 85%. O processo de descolamento celular ocorreu pela ação da solução de tripsina 0,05% (m/v) / EDTA 0,02% (m/v) em tampão fosfato de pH 7,4 (ICCVAM, 2006).

### 3.4 Teste de citotoxicidade

Foram realizados cinco ensaios independentes. As concentrações dos quimiotipos foram determinadas com o valor de CIM 0,04 mg/mL e os fatores de diluição 2,15, 1,47, e 1,21, segundo o *APPENDIX F - Decimal Geometric Concentration Series* (NIH, 2001). Foram semeadas 10.000 células BALB/c 3T3 por poço, em placas de 96 (área de 0,28 cm<sup>2</sup>) e incubadas por 24 horas. Em seguida foram adicionadas as amostras e após 24 horas de incubação, o meio de cultura foi retirado, os poços lavados com solução de tampão (PBS) para então ser adicionada a solução de MTS (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium*) / PMS (*phenazine methosulfate*) em meio de cultura e incubação por 3 horas. A medida de absorbância (Abs) foi realizada no comprimento de onda de 490 nm em espectrofotômetro (NIH, 2001; ICCVAM, 2006; OECD/GD 129, 2010).

O cálculo da IC<sub>10</sub>, concentração que inibe 10% de células desafiadas, foi realizado pelo programa *Phototox*<sup>®</sup> (2008). É importante ressaltar que foi verificada a interferência do polissorbato 20 no crescimento celular, testando-o nas mesmas concentrações e condições das amostras. Foi considerada a ausência de interferência quando a viabilidade celular foi de no mínimo 90% (NIH, 2001; CASTELL, GOMEZ-LECHÓN, PONSODA, 2000).

### 3.5 Teste de fototoxicidade

O ensaio foi realizado em no mínimo três experimentos independentes para as amostras: óleos essenciais, quimiotipos Cananéia e Cataia; lauril sulfato de sódio (LSS), como controle negativo ou não fototóxico; e o óleo essencial de bergamota como controle positivo, descrito como potencialmente fototóxico (OECD 432, 2004; KEJLOVÁ, *et al.*, 2007).

As concentrações testadas foram entre 0,005 e 0,1 mg/mL, calculadas pelo fator de diluição 1,47 e preparadas, imediatamente antes da sua utilização ao abrigo da luz, em tampão acrescido de cálcio e magnésio (PBS+). Foram semeadas 15.000 de células BALB/c 3T3 por poço em placas de 96, sendo duas placas por amostra, uma exposta a luz UVA e outra mantida ao abrigo. Após 24 horas de incubação, o meio de cultura foi trocado pelas amostras, e as placas incubadas por uma hora. Em seguida, foram posicionadas na câmara de fototoxicidade em temperatura ambiente por 75 minutos, período correspondente a dose de 5 J/cm<sup>2</sup>. Após a exposição, os poços foram lavados com PBS+ seguida da adição de meio de cultura. As placas foram incubadas em estufa por 22-24 horas, foi adicionada a solução de MTS/PMS e lida sua Abs como no item 3.4 (OECD 432, 2004; INVITTOX, 2008).

Os resultados da Abs foram submetidos ao programa *Phototox*<sup>®</sup> (2008) que determinou o fator de *Photo Irradiation Fator* (PIF), sendo assim possível classificar as amostras em: não fototóxicas para PIF < 2; provavelmente fototóxica para 2 < PIF < 5; ou fototóxica para PIF > 5 (SPIELMANN *et al.*, 1998).

Na análise estatística, realizada no programa *GraphPad Prism 5*, foi aplicada a análise de variância, One-way ANOVA, e teste Bonferroni para determinação de diferenças estatísticas entre os grupos de amostras. O nível de significância ( $\alpha$ ) foi de 5%, quando o valor- *p* for de  $p < 0,05$  há uma diferença estatisticamente significativa entre as amostras, contrariamente, quando  $p \geq 0,05$  não há diferença estatisticamente significativa (FESTING, 2001).

### 3.6 Teste do micronúcleo *in vitro* (MNvit)

O procedimento e a análise dos resultados foram realizados segundo o guia internacional OECD 487 (2010). A concentração de cada amostra compreendeu valores menores que a  $IC_{10}$ , calculada no ensaio de citotoxicidade. Foram semeadas 20.000 células CHO-K1 por poço na placa de 6 (9,6 cm<sup>2</sup>) e incubadas por 48 horas. Em seguida, foram adicionadas, com e sem ativação da solução de cofator S9, as amostras: quimiotipos Cananéia (0,125 mg/mL) e Cataia (0,103 mg/mL); os controles positivos, benzopireno (3 µg/mL), mitomicina C (0,5 µg/mL) e colchicina (0,08 µg/mL); o controle negativo, solução de NaCl (15 µg/mL); o controle do polissorbato 20 (2 µg/mL); e o controle de células. Após 4 horas de incubação, os poços foram lavados com PBS, seguida da adição da solução de citocalasina B em meio de cultura e incubação por 20 horas. Em seguida as células foram descoladas, centrifugadas, lavadas com NaCl 0,9% (m/v), hipotonizadas com a solução de metanol-ácido acético glacial (3:1) e gotejadas em lâminas histológicas posicionadas sobre banho-maria a 65°C. Após secagem, as lâminas foram coradas com Giemsa a 5% (v/v).

As lâminas foram analisadas ao microscópio óptico (na objetiva de 40 x) por meio da contagem das células mononucleadas, binucleadas e multinucleadas, além dos micronúcleos presentes nas células binucleadas. O término da contagem celular foi considerado, quando contabilizadas 1000 células binucleadas. Assim, foi possível determinar a frequência de micronúcleo, o índice de proliferação do bloqueio da citocinese (*Cytokinesis-Block Proliferation Index*, CBPI) e o índice de replicação (*Replication Index*, RI). A análise estatística foi realizada conforme descrito no item 3.5.

## 4. RESULTADOS e DISCUSSÃO

Os óleos essenciais da *Pimenta pseudocaryophyllus* obtidos por hidrodestilação apresentaram um rendimento médio de 2,7074% para o quimiotipo Cananéia e 1,1546% para o quimiotipo Cataia. Na análise por CG/SM da composição química dos quimiotipos, destacou-se a presença de eugenol, 31,5% na Cananéia e 17,9% na Cataia, essa diferença na composição ocorreu devido à origem do local de coleta da espécie vegetal. Ressalta-se que, o eugenol possui atividades antisséptica, analgésica e antimicrobiana (COSTA, 2000; CUSTÓDIO, 2010; JAGANATHAN e SUPRIYANTO, 2012).

A dispersão dos óleos essenciais quimiotipos Cananéia e Cataia em polissorbato 20 e meio de cultura, se apresentou estável e límpida à vista desarmada permitindo a sua utilização nos ensaios de fototoxicidade, MNvit e citotoxicidade. Adicionalmente a baixa toxicidade dessa classe de tensoativo era conhecida (Final Report [...], 1984).

Os resultados de Abs obtidos no ensaio de citotoxicidade foram utilizados para o obtenção da curva de viabilidade celular (Figura 1) e para o cálculo da  $IC_{10}$ , sendo 0,378 mg/mL para Cananéia e 0,310 mg/mL para Cataia. Assim, é observado que o valor da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 0,04 mg/mL dos óleos essenciais apresentou viabilidade maior que 90% para as células Balb/c 3T3, portanto não citotóxica. O polissorbato 20 se apresentou seguro, pois, todas as concentrações testadas apresentaram viabilidade celular acima de 90% (Figura 1C).

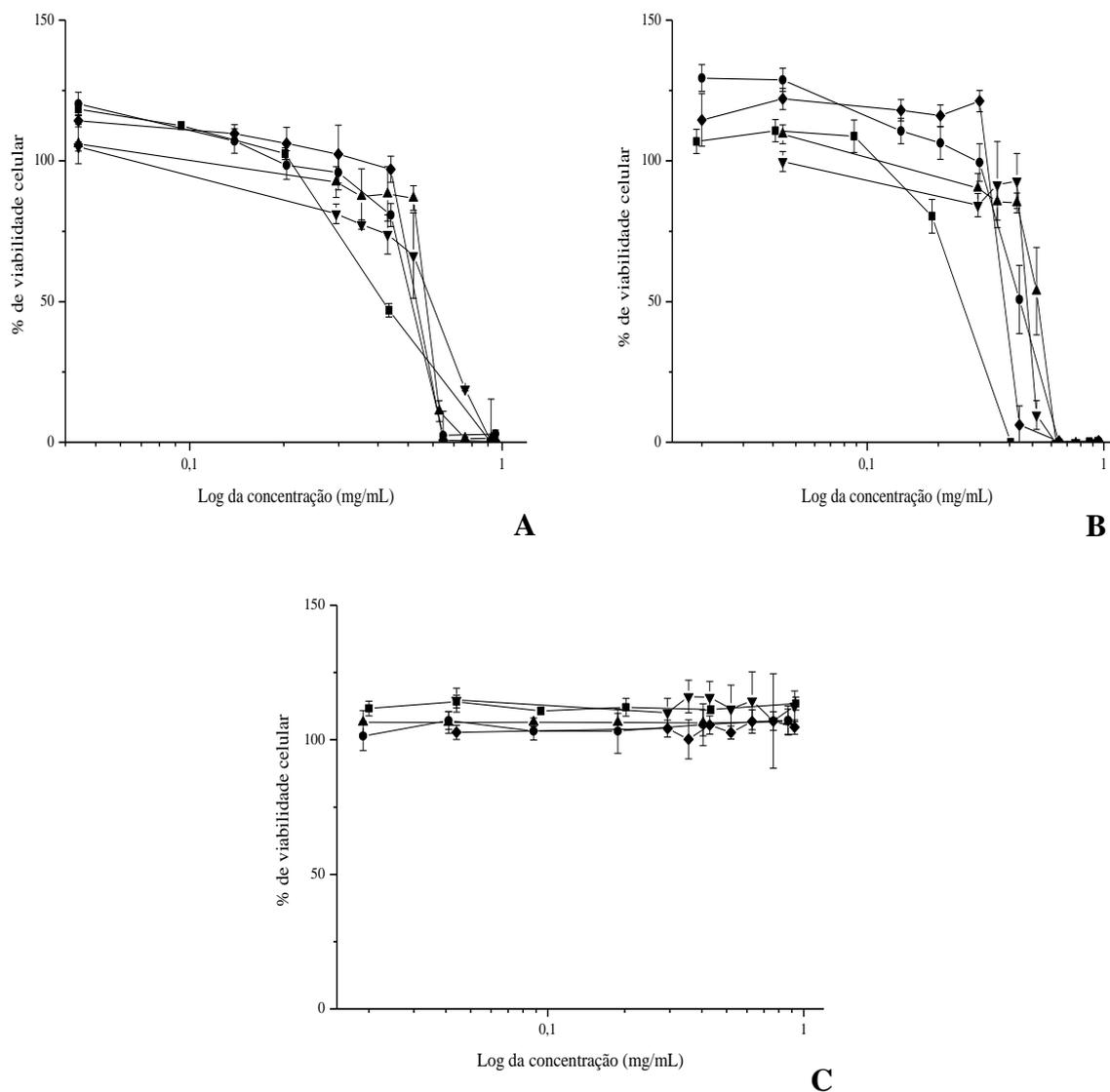


Figura 1 – Curva de viabilidade celular pelo log da concentração (mg/mL) dos óleos essenciais da *Pimenta pseudocaryophyllus* quimiotipos Cananéia (A) e Cataia (B), e o polissorbato 20 (C)

No ensaio de fototoxicidade o óleo de bergamota, controle positivo, apresentou o PIF médio de 2,53, classificado como provavelmente fototóxico segundo OECD 432 (2004). O controle negativo LSS resultou no PIF médio de 1,11, considerado não fototóxico. Foram também classificados não fototóxicos os quimiotipos Cananéia e Cataia, que apresentaram PIF menor que 2. Entretanto, com relação à análise estatística, apenas o PIF do óleo essencial da bergamota foi estatisticamente diferente com valor de  $p < 0,05$ .

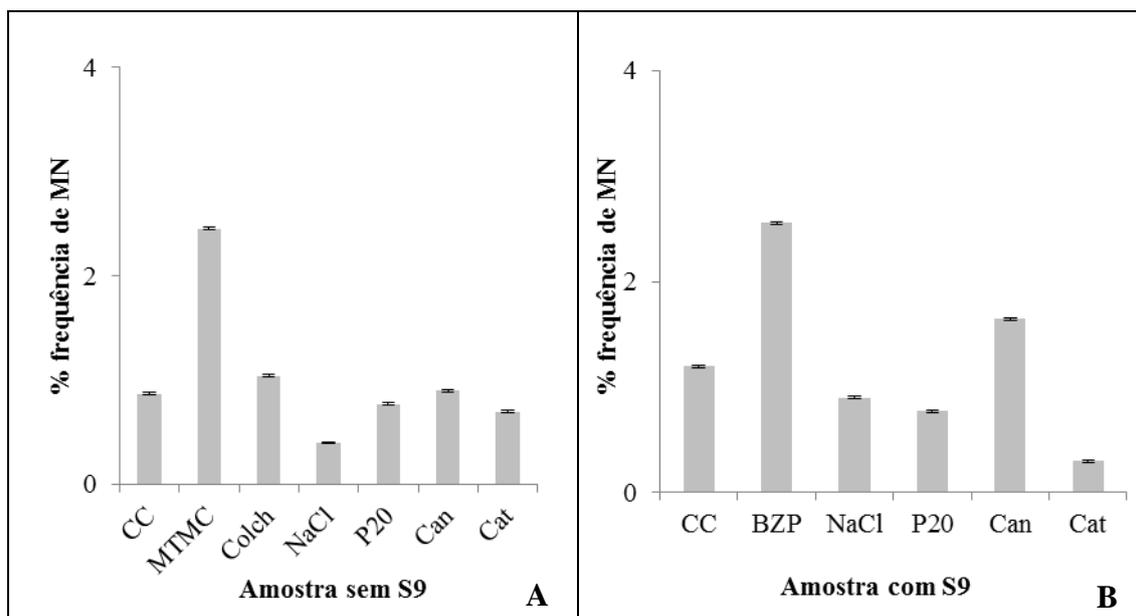
A avaliação do potencial genotóxico das amostras foi realizada por meio do ensaio MNvit que resultou em valores de CBPI, RI e frequência de micronúcleo. Como as células CHO-K1 possuem capacidade metabólica endógena inadequada, fez-se necessário o uso de S9, cofator pós-mitocondrial como sistema metabolizador exógeno (DOHERTY *et al.*, 1996).

O CBPI compreende ao número médio de ciclos que cada célula sofre após exposição à citocalasina B, substância responsável pela formação de células binucleadas. A média do valor de CBPI entre as amostras sem S9 foi de 2, enquanto que nas amostras com S9 a média foi de 2,4. Demonstrando que, houve mais de um ciclo celular nas culturas testadas, conseqüentemente, mais de uma citocinese, fase da mitose, aumentando a probabilidade de

formação de células binucleadas, nas quais são contabilizados os micronúcleos (FENECH, 1993; OECD 487, 2010). Com relação à análise estatística, apenas o controle positivo colchicina apresentou diferença estatisticamente significativa, com valor de  $p < 0,05$ .

O RI é relação entre células binucleadas e multinucleadas pelo total de células que se encontram em processo de divisão. Quanto maior o seu valor, menor será a citotoxicidade da amostra devido a menor porcentagem de células citostáticas (%Cit). Ao subtrair o RI por 100, obtêm-se a %Cit, assim resultados acima de  $50 \pm 5\%$  correspondem a possíveis danos cromossômicos, considerado como efeito secundário à citotoxicidade. Baseado nessa análise, os valores de RI nas amostras, com e sem S9, foram superiores a 50 e não apresentaram estatisticamente diferença significativa ( $p \geq 0,05$ ). A porcentagem de células citostáticas foram inferiores a 50%, garantindo dessa forma, a integridade celular durante o ensaio (OECD 487, 2010).

Na Figura 2, observa-se que o quimiotipo Cananéia (Can) com S9 (Figura 2B) não apresentou expressivo aumento na porcentagem da frequência de micronúcleo (%FM), quando comparado ao controle de células (CC). Entretanto, ao se comparar com o controle positivo benzopireno (BZP) a %FM foi menor. Os quimiotipos Cananéia e Cataia (Cat) sem S9, e Cataia com S9 foram potencialmente não genotóxicos com baixa %FM. A condução do experimento foi considerada adequada, pois os controles positivos, mitomicina C (MTMC), colchicina (COLCH) e benzopireno (BZP) apresentaram a %FM elevada, quando comparados ao controle de células (CC). Adicionalmente, o controle negativo NaCl e o controle do polissorbato 20 (P20) resultaram em %FM abaixo do CC.



CC controle de células/ MTMC mitomicina C/ Colch colchicina/ NaCl cloreto de sódio/ P20 polissorbato 20/ BZP benzopireno/ Can Cananéia/ Cat Cataia

Figura 2 - Porcentagem da frequência de micronúcleo (%FM) dos óleos essenciais da *Pimenta pseudocaryophyllus* quimiotipos Cananéia e Cataia em células CHO-K1 expostas às amostras sem S9 (A) e com S9 (B)

Os óleos essenciais quimiotipos Cananéia e Cataia foram considerados seguros quando utilizados nas concentrações abaixo da  $IC_{10}$  0,378 mg/mL para Cananéia e 0,310 mg/mL para Cataia, resultaram em viabilidade celular acima de 90%. Na avaliação da fototoxicidade ambos os quimiotipos apresentaram PIF menor que 2, portanto, não

fototóxicos. Em relação ao teste do MNvit, os óleos essenciais não foram potencialmente genotóxicos, com exceção do quimiotipo Cananéia com S9. Assim, esses resultados sugerem que com relação à segurança, esses óleos essenciais são atóxicos quando avaliados por métodos alternativos validados. Adicionalmente, há a possibilidade do uso desses óleos essenciais como conservante natural em formulações cosméticas, uma vez que as concentrações inibitórias mínimas (CIM) para micro-organismos encontradas foram de 0,04 mg/mL.

## 5. CONCLUSÃO

Os óleos essenciais quimiotipos Cananéia e Cataia foram não citotóxicos em concentrações inferiores a 0,31 mg/mL, não fototóxicos em concentrações menores ou igual a 0,1 mg/mL e potencialmente não genotóxicos em 0,1 mg/mL, sugerindo-os como candidatos a ingredientes em formulações cosméticas.

## REFERÊNCIAS

- ATCCa. American Type Culture Collection. Disponível em: <<http://www.atcc.org/Products/All/CCL-163.aspx#7301B7F956944F8382B6192957C08A3B>>. Acesso em: 22 fev. 2013.
- ATCCb. American Type Culture Collection. Disponível em: <<http://www.atcc.org/Products/All/CCL-61.aspx#357C3571006A4259B64650D34DF19048>>. Acesso em: 20 fev. 2013.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos, maio 2003. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/guia/guia\\_cosmeticos\\_final\\_2.pdf](http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/guia/guia_cosmeticos_final_2.pdf)>. Acesso em: 20 fev.2013.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.
- BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Portaria nº 491, de 3 de julho de 2012. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil União**, 05 jul. 2012. Nº 129, seção 1, p.19.
- BRASIL. Presidência da República, Casa Civil, Subchefia para Assuntos Jurídicos. Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009. Disponível em: <[http://www.mct.gov.br/upd\\_blob/0204/204755.pdf](http://www.mct.gov.br/upd_blob/0204/204755.pdf)>. Acesso em: 20 jan.2012.
- BROCHINI, C.B.; LAGO, J.H.G. Aplicação de técnicas cromatográficas e espectrométricas como ferramentas de auxílio na identificação de componentes de óleos voláteis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 2, p. 266-270, 2007.
- CASTELL, J. V.; GOMEZ-LECHÓN, M. J.; PONSODA, X. *In Vitro* toxicity testing. In: DOYLE, A., GRIFFITHS, J. B. **Cell and Tissue Culture for Medical Research**. New York: Willey-Liss, 2000. cap. 5.6, p. 403-409.
- COSTA, P. R. R. Safrol e eugenol: estudo da reatividade química e uso em síntese de produtos naturais biologicamente ativos e seus derivados. **Química Nova**, v. 23 (3), p. 357-369, 2000.
- CUSTÓDIO, D. L.; BURGO, R. P.; MORIEL, B., BARBOSA, A. M.; REZENDE, M. I.; DANIEL, J. F. S.; PINTO, J. P.; BIANCHINI, E.; FARIA, T. J. Antimicrobial

Activity of Essential Oils from *Pimenta pseudocaryophyllus* and *Tynanthus micranthus*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.53, n. 6, pp. 1363-1369, 2010.

DOHERTY, A.T.; ELLARD, S.; PARRY, E.M.; PARRY, J.M. An investigation into the activation and deactivation of chlorinated hydrocarbons to genotoxins in metabolically competent human cells. **Mutagenesis**, 11, 247-274, 1996.

EC (2003). *7<sup>th</sup> Amendment to the Cosmetics Directive 2003/15/EC*. Disponível em: <[http://ec.europa.eu/consumers/sectors/cosmetics/files/doc/antest/\(2\)\\_executive\\_summary\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/consumers/sectors/cosmetics/files/doc/antest/(2)_executive_summary_en.pdf)>. Acesso em: 20 jan. 2010.

FANG, J.Y.; LEU, Y.L.; HWANG, T.L.; CHENG, H.C. Essential oils from sweet basil (*Ocimum basilicum*) as novel enhancers to accelerate transdermal drug delivery. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 11, p.1819-1825, 2004.

FENECH, M. The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. **Mutation Research**, 285, p. 35-44, 1993.

FESTING, M.F.W. Guidelines for the design and statistical analysis of experiments in papers submitted to *ATLA*. **ATLA**, v. 29, p. 427-446, 2001.

Final Report on the Safety Assessment of Polysorbates 20, 21, 40, 60, 61, 65, 80, 81, and 85. **International Journal of Toxicology**, v. 3, p. 1-82, 1984.

GRIFFIN, W.C. Classification of Surface-Active Agents by "HLB". **Journal of The Society of Cosmetic Chemists**, v. 1, p. 311-326, 1949.

ICCVAM. Peer review panel report: The use of in vitro basal cytotoxicity test methods for estimating starting doses for acute oral systemic toxicity testing. **Research Triangle Park: National Toxicology Program**, n. 07-4519, nov. 2006.

INVITTOX protocol: ©ECVAM DB-ALM - 3T3 NRU Phototoxicity Assay. **INVITTOX** n. 78, p. 5-18, 2008.

JAGANATHAN, S. K.; SUPRIYANTO, E. Antiproliferative and Molecular Mechanism of Eugenol-Induced Apoptosis in Cancer Cells. **Molecules**, v.17, p.6290-6304, 2012.

KEJLOVÁ, K.; JÍROVA, D; BENDO VÁ, H.; KANDÁROVÁ, H.; WEIDENHOFFER, Z.; KOLÁŘOVÁ, H.; LIEBSCH, M. Phototoxicity of bergamot oil assessed by in vitro techniques in combination with human patch tests. **Toxicology in Vitro**, v. 21, p.1298–1303, 2007.

LAHLOU, M. Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. **Phytotherapy Research**, v.18, p. 435-448, 2004.

LIMA, M.E.L.; CORDEIRO, I.; YOUNG, M.C.M.; SOBRA, M.E.G.; MORENO, P.R.H. Antimicrobial activity of the essential oil from two specimens of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum (Myrtaceae) native from São Paulo state – Brazil. **Pharmacologyonline**, v.3, p. 589-593, 2006.

NIH Publication. Guidance document on using in vitro data to estimate in vivo starting doses for acute toxicity, n. 01-4500, ago. 2001.

OECD 432, Organization for Economic Co-operation and Development. Guideline for Testing of Chemicals 432: *In vitro* e 3T3 NRU phototoxicity test, abr. 2004.

OECD 487, Organization for Economic Co-operation and Development. Guideline for Testing of Chemicals 487: *In Vitro* Mammalian Cell Micronucleus Test (MNvit), jul. 2010.

OECD, Organization for Economic Co-operation and Development. OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance monitoring, n.1, jan. 1998

OECD/ GD 129, Organization for Economic Co-operation and Development. Guideline for Testing of Chemicals – Guidance Document 129: Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests, jul. 2010.

PHOTOTOX<sup>®</sup>: Statistical Software Phototox Version 2.0 for OECD Test Guideline 432. Disponível em: <<http://www.oecd.org/env/ehs/testing/33968900.pdf>>. Acesso em: 19 fev. 2008.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; PINTO, A.F. Ensaio toxicológicos de inocuidade. In: \_\_\_\_\_. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. São Paulo: Atheneu Editora, 2010. ed. 3, p. 697-772.

RENAMA, Rede Nacional de Métodos Alternativos. Disponível em: <<http://renama.org.br/2012/09/metodos-alternativos/>>. Acesso em: 16 jan. 2013.

RODAS, A.C.D.; MAIZATO, M.J.S.; LEIRNER, A.A.; PITOMBO, R.N.M.; POLAKIEWICZ, B.; BEPPU, M.M.; HIGA, O.Z. Cytotoxicity and genotoxicity of bovine pericardium preserved in glycerol. **Artificial Organs**, v.32, p. 272-276, 2008.

RUSSEL, W.M.S; BURCH, R.L. An abridge version of: The Principles of Humane Experimental Technique. In: BALLS, M. **The Three Rs and the Humanity Criterion**. Nottingham: Frame, 2009. p. 1-111

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Óleos voláteis. In: \_\_\_\_\_. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFS, 2007. ed. 6, p. 469-495.

SPIELMANN, H.; BALLS, M.; DUPUIS, J.; PAPE, W.J.W.; PECHOVITCH, G.; DE SILVA, O.; HOLZHÜTTER, H.G.; CLOTHIER, R.; DESOLLE, P.; GERBERICK, F.; LIEBSCH, M.; LOVELL, W.W.; MAURER, T.; PFANNENBECKER, U.; POTTHAST, J. M.; CSATO, M.; SLADOWSKI, D.; STEILING, W.; BRANTOM, P. The international EU/COLIPA phototoxicity validation study: results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test. **Toxicology In Vitro**, v.12, p. 305-327, 1998.