

Testes de eficácia de produtos cosméticos repelentes de insetos

Legislação no Brasil | Metodologias de Eficácia |
Fatores que influenciam o tempo de repelência



Breve Histórico

- Nos últimos anos houve uma evolução nos métodos e necessidades.
- Testes com animais (1920) e Testes *in vitro* – membranas alimentadoras com sangue – apresentam pouca correlação em relação aos testes com humanos. Porque os mosquitos são atraídos pelo ácido láctico, octenol, compostos que nossa pele produz, combinados com a transpiração e o dióxido de carbono que expelimos é o que atrai os mosquitos para picar as pessoas.
- Preocupação cada vez maior com padronização de testes com voluntários humanos, de laboratório e/ou de campo: evolução na nossa legislação definindo os “Guidelines” a serem empregados.



Legislação nacional

- CATEC no.02 – de 11/12/2006: DEET
- CATEC no.02 – de 23/12/2009: DEET e outras substâncias e, estabelece requisitos de: Segurança (mínimo de 3 estudos toxicológicos) e Eficácia da ação repelente, no produto acabado.
- Consulta pública no. 3 – 08/02/2011 a 16/03/2011: proposta de Resolução que dispõe sobre os requisitos técnicos para concessão de registro de produtos cosméticos repelentes de insetos.



Legislação nacional

RESOLUÇÃO - RDC Nº - 19, DE 10 DE ABRIL DE 2013:

- Dispõe sobre os requisitos técnicos mínimos para a concessão de registro de produtos cosméticos repelentes de insetos e dá outras providências.
- Comprovação da eficácia (Art. 4º do Capítulo II) pelos métodos da:
 - ✓ Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América (EPA);
 - ✓ Organização Mundial de Saúde (OMS);
 - ✓ ou outras metodologias validadas e reconhecidas internacionalmente.



Legislação nacional

- Comprovação de segurança de produtos cosméticos repelentes de insetos a empresa deverá apresentar, no ato da solicitação do registro, no mínimo, os seguintes estudos realizados no produto acabado:
 - ✓ I - irritação cutânea primária e acumulada
 - ✓ II - sensibilização cutânea; e
 - ✓ III - fotossensibilização.



Legislação nacional

Além de cumprir os requisitos previstos nesta RDC no.19 (2013) deverá cumprir as demais legislações específicas de produtos cosméticos.

- **RESOLUÇÃO - RDC No. 7, DE 10 DE FEVEREIRO DE 2015:**
 - ✓ Dispõe sobre os requisitos técnicos para a regularização de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes e dá outras providências:
 - ✓ Repelente Cosmético – Grau risco 2 – sujeito a Registro.



Métodos padronizados para testar repelentes de insetos

- EPA – “Environmental Protection Agency” – Product Performance Test Guidelines:
- OPPTS 810.3700: Insect repellents to be applied to human skin

PA 712-C-10-001, July 7, 2010

- WHO – “World Health Organization”:
- Guidelines for efficacy testing of mosquito repellents for human skin

WHO/HTM/NTD/WHOPES/2009.4



Metodologia da EPA – OPPTS 810.3700 (2010)

- **Escopo e propósito:** avaliar a eficácia de produtos repelentes de insetos e outros artrópodes; aplicável a formulações líquidas, loções e spray de uso direto sobre a pele.
- **Exigências relacionadas:**
 1. Requerimento de informação de consentimento da FIFRA (Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act) ;
 2. Regulamento da EPA de proteção aos sujeitos humanos da pesquisa
 3. Estudo deve ser realizado em BPL ou outro sistema de qualidade que garanta as boas práticas de laboratório.



Metodologia da WHO (2009)

- **Escopo e propósito:** avaliar a eficácia de produtos repelentes de insetos e outros artrópodes que se alimentam com sangue; aplicável a formulações e pesquisas de formulações de uso direto sobre a pele.
- **Exigências relacionadas:**
 - ✓ Seguir as exigências para registro de pesticidas, incluindo repelentes, determinadas por autoridades nacionais competentes.
 - ✓ Os materiais devem ter segurança toxicológica definida.
 - ✓ Os estudos de eficácia repelente devem seguir boas práticas de laboratório e, devem estar de acordo com a legislação Nacional de Ética para Pesquisa com Seres Humanos.



Legislação Nacional de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

- Legislação Brasileira sobre Bioética – RESOLUÇÃO Nº 466, DE 12 DE DEZEMBRO DE 2012.

Define as exigências éticas fundamentais para execução de pesquisas com seres humanos, que implica em garantir:

- ✓ Autonomia do sujeito da pesquisa
- ✓ Beneficência – máximo de benefícios e o mínimo de riscos aos sujeitos participantes da pesquisa
- ✓ A não maleficência – danos devem ser evitados
- ✓ Justiça e equidade – objetivo sócio humanitário ou benefícios para humanidade
- ✓ Visa a assegurar os direitos e deveres que dizem respeito aos participantes da pesquisa, à comunidade científica e ao Estado.



Legislação nacional de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

Legislação Brasileira sobre Bioética – Resolução 466/12.

Detalha todas as exigências éticas para uma pesquisa expressas no:

- Consentimento livre esclarecido (TCLE)
- Na previsão de riscos e benefícios e,
- No protocolo de pesquisa

- Regulamenta a estruturação e funcionamento dos Comitês de Ética em Pesquisa – CEPs e da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP/MS.



Legislação nacional de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

CEP: colegiado interdisciplinar e independente, criado para defender os interesses dos sujeitos da pesquisa em sua integridade e dignidade e, contribuir no desenvolvimento da pesquisa segundo padrões éticos.

- ✓ Avalia os Projetos de Pesquisa.
- ✓ Torna-se co-responsável pelo seu desenvolvimento.
- ✓ É Institucional e tem por função avaliar projetos de outras instituições que não tenham CEP constituída.



Legislação nacional de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - Documentação

- Protocolo de Pesquisa = Projeto de Pesquisa + documentos necessários para análise do projeto, que incluem, mas, não se limitam:
 - ✓ Folha de rosto
 - ✓ Próprio projeto de pesquisa
 - ✓ TLCE = Termo de Consentimento Livre Esclarecido
 - ✓ Considerações administrativas e éticas: Declaração de responsabilidades (pesquisadores, patrocinador, do responsável pela instituição de pesquisa, entre outras).
 - ✓ *Curriculum vitae* dos pesquisadores
 - ✓ Registro no SISNEP (Sistema Nacional de Informações Sobre Ética em Pesquisa envolvendo Sere Humanos) via Plataforma Brasil – recebe CAAE (número de Certificado de Apresentação para Apreciação Ética).



Procedimentos de Laboratório

Determinações e tipos de produtos

EPA

- Estimativa da dose – resposta
- Tempo de proteção contra mosquitos ou moscas (que picam) – produtos formulados
- Estudos de Campo

WHO

- Dose efetiva – material técnico
- Tempo de proteção completa ou repelência contra mosquitos – material técnico e produtos formulados
- Estudos de Campo



Procedimentos de Laboratório

Espécies de insetos (preferencialmente)

EPA

- Mosquitos:
 - ✓ *Aedes aegypti*
 - ✓ *Anopheles* sp (*A. albimanus*)
 - ✓ *Culex quinquefascitus*
- Mosca de estábulo:
 - ✓ *Stomoxys calcitrans*

WHO

- Mosquitos:
 - ✓ *Aedes aegypti*
 - ✓ *Anopheles* sp (*A. albimanus*, *A. stephensi*, *A. gambiae*)
 - ✓ *Culex quinquefascitus*
- Mosca de estábulo:
 - ✓ *Stomoxys calcitrans*

Procedimentos de Laboratório

Espécies de de significância para SP/BR

- Cuidados na escolha de *Anopheles*:
 - Devem ser endêmicas, representativa(s) para a nossa Saúde Pública;
 - Espécies colonizadas – que possam se reproduzir no laboratório.
-
- ✓ *Anopheles gambiae*: transmissor primário da malária no sul da África – no Brasil 1930 a 1940 – problema de saúde pública.
 - ✓ *Anopheles stephensi* - é o principal mosquito vector de malária nas áreas urbanas da Índia.
 - ✓ *Anopheles albimanus* - É o mais importante vetor da malária no litoral do Golfo do México e na região do Caribe.



Procedimentos de Laboratório

Espécies de insetos de significância para SP/BR

- No Brasil, cinco espécies são consideradas como vetores principais da malária:
 - ✓ *Anopheles* (Nyssorhynchus) *darlingi* – Root, 1926 (Amazônia)
 - ✓ *Anopheles* (Kerteszia) *cruzi* – Dyar & Kanab, 1908 *
 - ✓ *Anopheles* (Kerteszia) *bellator* – Dyar & Knab, 1908 *
- *malária de bromélias – Vale do Ribeira /SP

Colonizadas (FIOCRUZ)

- ✓ *Anopheles* (Nyssorhynchus) *albitarsis*– LynchArribalzaga, 1878 (região oriental da América dos sul)
- ✓ *Anopheles* (Nyssorhynchus) *aquasalis* – Curry, 1932 (litoral)



Procedimentos de Laboratório

Condições de criação/manutenção dos Mosquitos:

EPA

- Fêmeas adultas, 5 a 10 dias
- Condições padronizadas de criação:
 - ✓ Temperatura: $27^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$
 - ✓ Umidade relativa: 70-90%
- Não alimentadas com sangue, somente com solução de açúcar
- Alimentação suspensa 12 a 24 horas antes do teste
- Uso único e individual

WHO

- Fêmeas adultas, 5 a 7 dias, pós-emergência
- Condições padronizadas de criação:
 - ✓ Temperatura: $27^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$
 - ✓ Umidade: 70-90%
- Não alimentadas com sangue, somente com solução de açúcar
- Alimentação suspensa 12 horas antes do teste, se aplicável
(depende do horário em que a espécie pica)
- Uso único e individual

Procedimentos de Laboratório

Quantidade de mosquitos/gaiola

EPA

- No mínimo 200 mosquitos fêmeas por gaiola de $\approx 61 \times 61 \times 61$ cm (equivalente a 1 inseto por 1.160 cm^3)

WHO

- Cerca de 200-250 mosquitos fêmeas por gaiola de 35 a 40 cm de lado – estimativa do tempo de proteção completa
- Cerca de 50 a 150 mosquitos fêmeas – estimativa da dose

Procedimentos de Laboratório - gaiolas :

- Gaiolas com luvas; retangular ou quadradas , com uma ou duas aberturas para manguitos
- Gaiolas maiores podem ser usadas (EPA)
- Individuais/voluntários





*II Seminário sobre Repelentes
06 de abril de 2017*

*Conselho Regional de Química – IV Região
Comissão de Cosméticos*



Procedimentos de Laboratório - EPA e WHO

Condições ambientais para teste

Espécie de mosquito específica:

- Luminosidade
- Temperatura ($21^{\circ} \pm 8^{\circ}\text{C}$)
- Umidade (55-85%)
- Gás carbonico (evitar inalar na gaiola)



Procedimentos de Laboratório - EPA e WHO

Voluntários/Área tratada e preparo

- Preferencialmente: ambos os sexos (18-65 anos)
- 12 horas antes do teste, evitar álcool, café e não usar cremes, qualquer tipo de perfumes.
- Ante-braço (do pulso ao cotovelo), previamente lavado com detergente neutro e álcool 70%.
- Quantidade aplicada: 1 g ou 1 mL para 600 cm²
- Uso de luvas protegendo a mão durante o teste.



Procedimentos de Laboratório – EPA e WHO

Controles/ Pré-requisitos

- Controle negativo:

um a dois sujeitos durante o teste.

- Controle positivo (recomendável):

DEET, 20% em etanol

Atratividade/repelência natural:

- Pré-teste com voluntários:
 - ✓ mínimo de 5 pousos em 60 segundos ou menos (EPA)
 - ✓ 30 segundos ou até ocorrência de 10 pousos (WHO)

Procedimentos de Laboratório - EPA e WHO

Teste

EPA

- Aproximadamente após 30 minutos da aplicação do produto, usando luvas nas mãos, expõe-se o antebraço tratado a intervalos/tempo de exposição pré-definidos
- Exemplo: a cada 30 minutos por 5 minutos

WHO

- Após 30 minutos da aplicação do produto, usando luvas nas mãos, expõe-se o antebraço tratado a intervalos/tempo de exposição pré-definidos
- Exemplo: a cada 30 - 60 minutos por 3 minutos

Procedimentos de Laboratório

“End points” WHO/EPA

- Pousos e/ou sondagens podem significar o final do teste de eficácia repelente.
- No entanto, pouso nem sempre está associado com a sondagem, então, registros em separado de cada comportamento são necessários.
- Um repelente pode ser eficaz na redução da atividade de picar, mas não de pousar. Alternativamente, ele pode ser eficaz em termos de conter pousos, mas os mosquitos que pousam podem todos picar.
- Ambos os cenários são importantes na determinação da eficácia repelente.



Procedimentos de Laboratório

“End points” WHO/EPA

- Com mosquitos, o final do teste de repelência pode ser tanto pousos quanto picadas como eventos que demonstram a falha em repelir.
- Normalmente, adota-se o conceito de “primeiro evento confirmado”:
- Exemplo:
 - ✓ Um evento confirmado quer dizer que um pouso ou uma picada seguido por outro evento similar dentro dos 30 minutos ou na próxima exposição.



Procedimentos de Laboratório

Expressão do Resultados

- Tempo de Proteção Completa é calculado como o número de minutos corridos entre o tempo da aplicação do repelente e o primeiro evento confirmado (pouso ou picada).
- A maioria dos estudos de repelentes está completo em 8 horas ou menos.
- O número de voluntários incluídos deve ser suficiente para permitir uma análise estatística.
- A mediana do TPC e o intervalo de confiança podem ser estimados a partir da análise da função Kaplan–Meier. (número de voluntários deve ser maior; exemplo dado pelo “Guide WHO” envolve 48 voluntários).



Procedimentos de Laboratório

Expressão do Resultados - EPA

- Os protocolos devem incluir uma descrição completa, explicação e justificativa dos métodos estatísticos propostos para analisar ambos os resultados, de determinação de dose e de teste de repelência, tendo em conta os objetivos do estudo e variáveis específicas.
- O plano de análise estatística deve prever uma distribuição normal dos resultados dos testes.
- Quando os resultados são normalmente distribuídos, pode-se relatar a média do TPC entre todos os indivíduos tratados com seu erro padrão.
- Quando os dados não se encaixam numa distribuição normal-típica de repelência, avaliar a possibilidade de transformá-los para se ajustarem a uma distribuição que possa ser empregado um método paramétrico de análise.



FATORES QUE INFLUENCIAM O TEMPO DE REPELÊNCIA

- Por definição um repelente é uma substância química volátil que induz os artrópodes a se moverem na posição contrária a sua fonte. Um repelente ideal deve proteger a pessoa do maior número de insetos que picam, por um longo período de tempo e não causar reações adversas.
- Os humanos atraem os mosquitos também quando estão usando um repelente, no entanto, os mosquitos são repelidos bem próximo a pele por causa dos compostos voláteis que emanam do repelente dependendo de seu ponto de fusão, também influenciado pela taxa de evaporação da pele e, conseqüentemente, a distância com que o mosquito permanece.
- Geralmente esta barreira estende-se de poucos centímetros da pele após a aplicação imediata do repelente que requer que o composto seja aplicado uniformemente nas áreas da pele a serem expostas.



FATORES QUE INFLUENCIAM O TEMPO DE REPELÊNCIA

- ✓ Tipo de formulação: creme, loção, aerosol, óleos, "steaks oleosos"
- ✓ Componentes da formulação: fragrancias
- ✓ Espécies de mosquitos
- ✓ Fatores ambientais/externos: temperatura do ar, umidade e velocidade do vento; em climas quentes e úmidos ou com ventos em velocidade alta a eficácia do tempo de repelência é geralmente menor e re-aplicações frequentes são necessárias (padronizados nos testes em gaiolas)
- ✓ A perda da eficácia é determinada pela taxa de evaporação dos repelentes e pela penetração percutânea (tipo de pele pode estar relacionado, como peles mais secas tendem a ter maior proteção com uso de repelentes)
- ✓ Os repelentes perdem facilmente sua eficácia quando lavados, quando esfregados pelo contato com a roupa ou objetos; o suor além de atrair os mosquitos, dilui o repelente e reduz a eficácia dos compostos.
- ✓ Os produtos contendo álcool permeiam mais profundamente na pele resultando em perda mais rápida da eficácia.



“Arm-in cage Tests” – EPA e WHO

- Os experimentos em laboratório seguindo os procedimentos do teste de repelência:
 - ✓ Expõe os antebraços contra espécies de mosquitos em separado
 - ✓ Padroniza as condições de modo a minimizar as variáveis tais como velocidade do vento, temperatura e umidade
 - ✓ São mais seguros que os testes de campo porque utilizam mosquitos criados sob condições específicas que não transmitem doenças
 - ✓ Emprega voluntários humanos sem histórico de doenças dermatológicas, alergia a mosquitos ou a substâncias repelentes
 - ✓ Expõe seus antebraços tratados a um número definido de mosquitos fêmeas, adultos, criados sem alimentação com sangue, em gaiolas de tamanho conhecido e em condições ambientais favoráveis ao comportamento de picar
 - ✓ Expõe uma pequena área do antebraço aos mosquitos usando luvas e por tempo e intervalos de tempo pré-definidos
- O número de voluntários a ser empregado não é definido, porém, considerando a variável humana, quanto maior o número de voluntários melhor será a determinação do tempo de proteção completa.
Considerando as questões bioéticas e recomendações da literatura:
 - ✓ Um mínimo de 5 voluntários se o tempo de repelência esperado for de 1 a 4 horas;
 - ✓ Um mínimo de 10 voluntários se o tempo de repelência esperado for de 5 ou mais horas.



Obrigada pela atenção!

Dra. Marcia R.T. de Camargo Ranzani

marciaranzani@asrlaboratorio.com.br

(19) 3486-2112

