
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)

**EFEITOS DOS CORANTES PRESENTES NA TINTURA CAPILAR PRETA SOBRE
CÉLULAS DE BEXIGA HUMANA.**

MICHELE PERISATTO BERRETA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Campus de Rio Claro, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de Biologia Celular e Molecular.

Rio Claro
2018

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)**

**EFEITOS DOS CORANTES PRESENTES NA TINTURA CAPILAR PRETA SOBRE
CÉLULAS DE BEXIGA HUMANA.**

MICHELE PERISATTO BERRETA

ORIENTADORA: Profa. Dra. Maria Aparecida Marin Morales

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Campus de Rio Claro, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de Biologia Celular e Molecular.

Rio Claro
2018

574.88 Berreta, Michele Perisatto
B533e Efeito dos corantes presentes na tintura capilar preta
sobre células de bexiga humana. / Michele Perisatto Berreta. -
Rio Claro, 2018
98 f. : il., figs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientadora: Maria Aparecida Marin Morales

1. Biologia molecular. 2. Tinturas capilares. 3. Corantes
azo. 4. Ensaio do cometa. 5. Linhagem celular 5637. 6.
Peróxido de hidrogênio. 7. Teste do micronúcleo. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: EFEITOS DOS CORANTES PRESENTES NA TINTURA CAPILAR PRETA SOBRE CÉLULAS DE BEXIGA HUMANA.

AUTORA: MICHELE PERISATTO BERRETA

ORIENTADORA: MARIA APARECIDA MARIN MORALES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. **MARIA APARECIDA MARIN MORALES**
Departamento de Biologia / IB Rio Claro



Profa. Dra. **DANIELA MORAIS LEME**
Departamento de Genética / Universidade Federal do Paraná



Prof. Dr. **FRANCO DANI CAMPOS PEREIRA**
Instituto de Ciências da Saúde / Universidade Paulista

Rio Claro, 23 de fevereiro de 2018

*Aos meus queridos e amados pais,
Oscar e Eliana, por serem minha
inspiração e motivação diária e de
quem tenho tanto orgulho.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos pais, Oscar e Eliana, por sempre me motivarem, nunca me deixarem desistir e serem meu exemplo de pessoas a se espelhar. Vocês acreditaram em mim e na minha capacidade, estiveram sempre do meu lado me apoiando e são os grandes responsáveis pelas minhas conquistas. Tenho orgulho de poder dizer quão maravilhosos meus pais são.

Ao meu namorado, Gabriel, que aguentou meu mau humor e momentos de chatice, e, ainda assim, sempre esteve ao meu lado e também nunca me deixou desistir. Você sabe o quanto essa jornada foi difícil e, por isso, agradeço toda a paciência, carinho e risadas.

À minha família jundiaiense, Rose, Amauri, Gustavo e Nathália que sempre me acolheram muito bem e me fazem sentir como parte da família. Agradeço a vocês por todo o carinho, conselhos, amizade e momentos que tenho o prazer de poder passar com vocês.

À minha orientadora e amiga Marin, que aceitou o desafio de me orientar a seis anos atrás e, mesmo após esse tempo, sempre encontra um jeito de me surpreender e maravilhar com sua sabedoria. Você acreditou e confiou em mim mesmo sabendo da rotina pesada que eu teria, e sou imensamente grata a isso. Sem você, não teria chegado tão longe. Você é um exemplo de profissional e de pessoa.

Aos amigos e colegas mutagênicos, Adriana, Camila, Cleiton, Cristina, Dânia, Fernanda, Franco, Jaqueline, Jorge, Lais, Letícia Bulascoshi, Letícia Gigeck, Letícia Gonçalves, Letícia Rocha, Márcia, Maria Tereza, Maria Paula, Matheus, Mileni, Nádia, Raphael, Raquel, Samantha, Tamara, Thays e William, alguns longe, outros perto, por todo o convívio, pelas conversas e risadas, por toda a ajuda (às vezes, até de última hora).

Às amigas Andrea, Débora, Jéssica, Laila e Tatiane, por fazerem parte dessa jornada, por toda a convivência (mesmo que à distância), pelo carinho, apoio, conversas e conselhos. Sei que posso sempre contar com vocês e, por isso, agradeço.

Aos amigos “à distância” Aira, Andréa, Luis e Mariana, que me acompanharam desde a graduação (ou antes), por todas as conversas (às vezes semestrais ou anuais), incentivo, momentos de alegria (e de tristeza). Vocês fazem parte disso, e são amigos que vou levar para a vida.

Aos amigos Cris e Gérson, do departamento de Biologia, que sempre me ajudaram e por todas as conversas e risadas.

À Capes, pelo apoio financeiro.

A todos que, de alguma forma, colaboraram para a realização deste trabalho.

“We are at the very beginning of time for the human race. It is not unreasonable that we grapple with problems. But there are tens of thousands of years in the future. Our responsibility is to do what we can, learn what we can, improve solutions and pass them on.”

Richard P. Feynman

RESUMO

Fazer uso de tinturas capilares é uma prática amplamente difundida por todo o mundo e, por isso, motivo de debate sobre os impactos que elas podem conferir à saúde humana. Essa preocupação se deve, além do fato das tinturas serem constituídas por diversos compostos, também por algumas delas possuírem corantes azo que são compostos que, ao serem reduzidos, liberam aminas aromáticas, que podem ser ainda mais tóxicas que os compostos originais. Tanto os corantes quanto seus derivados podem ser absorvidos pela pele e alcançar órgãos como a bexiga, onde podem representar um risco para o desenvolvimento de câncer. Frente a essa problemática, esse estudo teve como objetivo avaliar, na linhagem de células de bexiga (5637), a citotoxicidade, genotoxicidade, mutagenicidade e o potencial de indução de estresse oxidativo dos corantes Arianor Cherry Red, Arianor Sienna Brown e Arianor Ebony, utilizados na formulação da tintura capilar preta. Para avaliar a citotoxicidade pelo teste da resazurina, foram testadas concentrações entre 20 a 1,25 mg/L do corante Cherry Red, 400 a 18,75 mg/L do Sienna Brown, 3.200 a 3,75 mg/L do Ebony, 100 a 0,16 % dos corantes associados entre si e 0,31 a 0,03 % dos corantes associados entre si e com peróxido de hidrogênio. Dessas concentrações, foram escolhidas três com viabilidade celular acima de 80 % por tratamento: Cherry Red: 5,0, 2,5 e 1,2 mg/L; Sienna Brown: 100, 50 e 25 mg/L; Ebony: 10, 7,5 e 5 mg/L; associação entre corantes: 0,31, 0,26 e 0,16 %; e associação com peróxido de hidrogênio: 0,08, 0,06 e 0,04 %. Essas concentrações foram utilizadas para avaliar a genotoxicidade, mutagenicidade e as atividades antioxidativas das células. Pelo ensaio do cometa foi observado que todos os tratamentos tiveram efeito genotóxico significativo sobre as células de bexiga. Esse efeito foi confirmado pelo teste do MN em que foi observado um número significativo de pontes, para quase todos os tratamentos (com exceção da concentração de 5 mg/L do Cherry Red, 0,16 % da associação e 0,08 e 0,04 % da associação com peróxido de hidrogênio) e valores significativos de brotos para todos os tratamentos testados. O teste do MN ainda mostrou que foi encontrado um número significativo de micronúcleos para todos os tratamentos testados, indicando que todos eles têm potencial mutagênicos sobre as células de bexiga. Ainda pelo teste do MN foi possível observar que todos os tratamentos reduziram significativamente os índices de divisão celular. As defesas antioxidantes das células foram avaliadas pela atividade da enzima SOD e pelos níveis de GSH e TBARs. Os níveis enzimáticos da SOD foram significativamente maiores, em relação ao controle negativo, para a concentração de 1,25 mg/L do Cherry Red e para todas as associações com e sem peróxido de hidrogênio. Os níveis de GSH mostraram-se significativamente maiores para as concentrações de 5 e 1,25 mg/L do Cherry Red, 10 mg/L do Ebony, 0,16 % da associação e 0,06 e 0,04 % da associação com peróxido de hidrogênio e significativamente menores para as concentrações de 50 e 25 mg/L do Sienna Brown. Os níveis de TBARs foram estatisticamente maiores apenas para as concentrações de 50 mg/L do Sienna Brown, 10 e 7,5 mg/L do Ebony e 0,04 % da associação de corantes com peróxido de hidrogênio. Esses resultados indicam que, de forma geral, os corantes estudados têm potencial de danificar as células, tanto na ausência como na presença de peróxido de hidrogênio. Os efeitos tóxicos, genotóxicos, mutagênicos e indutores de estresse oxidativos foram observados para concentrações muito mais baixas que as presentes nas tinturas capilares. Essa ação danosa pode ser devida tanto a presença de estruturas azo como de aminas aromáticas derivadas da redução desses corantes. Os

resultados desse estudo, além de trazer informações para uma melhor compreensão dos mecanismos de ação dos corantes, servem de alerta para consumidores e profissionais da área da estética, que se expõem, diariamente, a esses compostos.

Palavras-chave: corantes azo, ensaio do cometa, estresse oxidativo, linhagem celular 5637, peróxido de hidrogênio, teste da resazurina, teste do micronúcleo.

ABSTRACT

Hair dyeing is a widespread worldwide practice and because of this, the reason of the discussion about the impacts that the hair dyes may have over human health. This concern is since some dyes have azo compounds which, after being reduced, release aromatic amines that can be even more toxic than the original compounds. Both the dyes and its derivatives can be absorbed by skin and reach organs, like the bladder, where they may present a risk for cancer development. Due to this problem, this study aimed to assess, on the bladder cell line (5637), the cytotoxicity, genotoxicity, mutagenicity and the stress oxidative induction potential of the dyes Arianor Cherry Red, Arianor Sienna Brown e Arianor Ebony used in the black hair dye formula. To evaluate the cytotoxicity by the resazurina assay, 10 concentrations of Cherry Red, 10 of Sienna Brown, 22 of Ebony, 17 of mixture of the dyes and 12 of the mixture of dye and hydrogen peroxide were tested. Among these concentrations, three of each treatment with cell viability of 80 % or more were chosen: Cherry Red: 5.0, 2.5 e 1.2 mg/L; Sienna Brown: 100, 50 e 25 mg/L; Ebony: 10, 7.5 e 5 mg/L; dye mixture: 0.31, 0.26 e 0.16 %; e dye mixture with hydrogen peroxide: 0.08, 0.06 e 0.04 %. These concentrations were used to assess the genotoxicity, mutagenicity and the antioxidant activity of the cells. The comet assay showed that all treatments had a significant genotoxic effect over the bladder cells. This effect was confirmed by the MN test which showed significant values for bridge, to almost all treatments, and significant values for nuclear buds to all tested treatments. The MN test also presented a high number of micronuclei to all tested treatments, indicating that all of them have a mutagenic potential over the cells. It was observed by the MN test that all treatments significantly decreased the cell division index. The antioxidant defenses of the cell were evaluated by the activity of the enzyme SOD and by the levels of GSH and TBARs. The enzymatic levels of SOD were significantly higher, in relation to the negative control, to the concentrations of 1.25 mg/L of Cherry Red and to all concentrations of the dye mixture, with and without hydrogen peroxide. GSH levels showed significantly higher to the concentrations of 5 and 1.25 mg/L (Cherry Red) 10 mg/L (Ebony), 0.16 % (dye mixture) and 0.06 e 0.04 % (dye mixture with hydrogen peroxide) and significantly lower to the concentrations of 50 and 25 mg/L (Sienna Brown). TBARs levels were statistically higher only for the concentrations of 50 mg/L (Sienna Brown), 10 and 7,5 mg/L (Ebony) e 0,04 % (dye mixture with hydrogen peroxide). These results indicate that, in general, the studied dyes have the potential to damage cell, both in the presence or absence of the hydrogen peroxide. The toxic, genotoxic, mutagenic and oxidative stress inductor effects were observed to concentrations much lower than the one present in the hair dyes. This harmful action may be due to both the presence of azo structures and aromatic amines derived from the reduction of these dyes. The results of this study, besides bringing information to a better comprehension of the action mechanisms of the dyes, serve as an alert to consumers and professionals that get exposed, daily, to these compounds.

Palavras-chave: azo dyes, cell line 5637, comet assay, hydrogen peroxide, micronucleus test, oxidative stress, resazurina assay.

LISTA DE ABREVIATURAS

BDCP	Black Dye Commercial Product
CHO-K1	Células de ovário de hamster chinês
CN	Controle Negativo
CO ₂	Dióxido de carbono
CP	Controle Positivo
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTNB	Ácido dinitrobenzóico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPIs	Equipamentos de proteção individual
GSH	Glutathiona reduzida
GSSH	Glutathiona oxidada
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico
HCl	Ácido clorídrico
HepG2	Células de hepatocarcinoma humano
ICDN	Índice Citotóxico de Divisão Nuclear
KCl	Cloreto de potássio
kHz	Quilohertz
mA	Miliampere
MDA	Malondialdeído
MMS	Methyl methanesulfonate (metano sulfonato de metila)
MN	Micronúcleo
MTT	Brometo de 3-(4,5dimetiltiazil-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NaCl	Cloreto de Sódio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
O ₂	Oxigênio molecular
O ₂ ^{•-}	Ânion superóxido
OH [•]	Radical hidroxila
PBS-EDTA	Tampão fosfato salino com EDTA
PPD	Parafenilenodiamina
PTD	2,5-diaminotolueno
ROS	Reactive species of oxygen (espécies reativas de oxigênio)
SBF	Soro bovino fetal
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloacético
Tris	Tris aminometano
UV	Ultravioleta
V	Volt

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	10
2. OBJETIVOS GERAIS	13
2.1. Objetivos específicos	13
3. REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1. Histórico das tinturas.....	14
3.2. As tinturas capilares.....	15
3.3. Alerta sobre o uso de tinturas capilares.....	17
3.4. O uso de cultura celular	19
3.5. Testes de citotoxicidade com resazurina	20
3.6. O ensaio do cometa	21
3.7. Teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese.....	22
3.8. Estresse oxidativo	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1. Material químico.....	25
4.2. Material biológico	25
4.2.1. <i>Manutenção e uso da linhagem celular 5637</i>	25
4.3. Ensaio da resazurina	26
4.4. Ensaio do cometa	26
4.5. Ensaio do micronúcleo com bloqueio da citocinese.....	28
4.6. Avaliação da atividade das enzimas antioxidantes	28
4.6.1. <i>Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)</i>	29
4.6.2. <i>Avaliação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH)</i>	29
4.6.3. <i>Determinação da peroxidação lipídica (TBARS)</i>	30
5. RESULTADOS	31
Artigo 1: Cito- genotoxicidade de corantes de cabelo para células de bexiga humana.	32
Artigo 2: Avaliação dos efeitos da mistura de corantes usada em tinturas capilares, com e sem associação com peróxido de hidrogênio, sob células de bexiga humana.	63
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	89
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91

1. INTRODUÇÃO GERAL

O uso de tinturas capilares é uma prática comum em todo o mundo e o impacto que elas proporcionam à saúde humana se tornou um assunto de grande interesse de estudo e discussão. Um dos motivos dessa preocupação deve-se ao fato dessas tinturas terem em sua constituição a presença de corantes sintéticos, principalmente os pertencentes à classe dos corantes azo ($R-N=N-R'$), que apresentam alta toxicidade (NOVOTNÝ et al., 2006; GIORGETTI et al., 2011). Esses corantes, ao sofrerem biotransformação durante a detoxificação celular, podem formar aminas aromáticas que são ainda mais tóxicas que os compostos originais (UMBUZEIRO et al., 2005; CHUNG, 2016). Estudos mostram que tanto os corantes azoicos quanto as aminas aromáticas produzidas pela metabolização dos corantes são carcinogênicas, pois são compostos capazes de interferir e modificar a molécula do DNA (YAHAGI et al., 1975).

A células presentes na epiderme têm a capacidade de reduzir os corantes azo (BRÜSCHWEILER; MERLOT, 2017), formar metabólitos que podem ser absorvidos pela pele (KORINTH et al., 2013) e alcançar órgãos como a bexiga (ANDREW et al., 2004). Alguns autores encontraram tanto componentes de tinturas capilares como os seus derivados em urina de pessoas que fazem uso desses cosméticos (HOWES; BLACK, 1983; YOURIC; BRONAUGH, 2000). Assim, a bexiga torna-se um alvo de vulnerabilidade para ação tóxica desses compostos. Resultados semelhantes foram encontrados nos estudos realizados por Nohynek et al. (2015), onde os autores encontraram parafenildiamina, um composto presente em tinturas capilares, na urina de usuários desses cosméticos. Estudos realizados por Kogevinas et al. (2003) mostraram que, na população masculina do oeste da Europa, 1 entre 20 cânceres de bexiga podem ser atribuídos a atividades ocupacionais. Alguns estudos epidemiológicos mostram que pessoas que se expõem às tinturas capilares, como cabeleireiros, barbeiros e esteticistas, apresentam um risco maior de desenvolver câncer de bexiga (CZENE et al., 2003; ZHANG et al., 2004). Mulheres que fazem uso de tinteira permanente também apresentam risco de carcinogenicidade de bexiga, como mostrado por Gago-Dominguez et al. (2001). Os autores apontam para um fator de risco 2,1 vezes maior, em comparação com mulheres que não fazem uso desses produtos. Um estudo publicado recentemente por Hadkhale et al. (2017) também mostrou que cabeleireiros do Canadá e cabeleireiras dos países nórdicos apresentam um alto risco de desenvolver câncer de bexiga.

Frente às evidências apontadas anteriormente sobre os prováveis efeitos tóxicos das tinturas capilares, fica clara a necessidade de estudos que melhor avaliem os corantes que as compõem, para que se possa ter uma melhor compreensão dos efeitos desses corantes sobre os constituintes celulares, inclusive sobre o material genético. Essas informações permitiriam o estabelecimento de níveis de segurança para o uso de tinturas, não só para consumidores, mas também para profissionais da área da cosmetologia.

O presente estudo avaliou, por meio de diversos bioensaios realizados com células de uma linhagem de bexiga humana (linhagem 5637), os efeitos dos corantes utilizados na formulação da tintura de cabelo preta. Os ensaios *in vitro*, realizados com culturas celulares, possuem a vantagem de serem desenvolvidos sob condições ambientais controladas, usar células com características estáveis e expor as células em diferentes fases do ciclo celular (RABELLO-GAY 1991). Outras vantagens desses bioensaios são a utilização de pequenas amostras de células, o que evita o uso e sacrifício de animais na pesquisa (CARVALHO, 1993).

O potencial citotóxico de diversos compostos pode ser avaliado pelo teste da resazurina, que é um corante que não apresenta ação tóxica para as células (VAN TONDER et al., 2015). Esse teste é muito eficiente para avaliar compostos que possuem cor pois, a resazurina, quando metabolizada, se transforma em resofurina, e emite fluorescência rosa (O'BRIEN et al, 2000; RAMPERSAD, 2012), por isso a leitura deste teste é feito em fluorímetro.

Os danos no DNA, causados por corantes capilares, podem ser estimados pelo ensaio do cometa. Este teste é capaz de detectar baixos níveis de danos e pode ser aplicado em cultura celular, necessitando uma pequena quantidade de células para análise (COLLINS, 2004). Esse ensaio baseia-se em lisar a membrana das células, submetendo o nucleóide a uma corrente elétrica. Quando houver danos no DNA, haverá a migração de fragmentos na lâmina, cujo arraste lembra a figura de um cometa.

A avaliação do potencial mutagênico em culturas celulares é feita por meio do ensaio do micronúcleo (MN). Nesse ensaio, o material genético que foi perdido do núcleo celular, por quebras cromossômicas que originaram fragmentos acêntricos, ou por perda de cromossomos inteiros, que não se ligaram aos fusos mitótico, formam micronúcleos, que podem ser observados após um ciclo de divisão (FENECH, 2000). Para assegurar que houve um ciclo celular nas células analisadas, usa-se

citocalasina B, uma substância que impede a citocinese, mas não a cariocinese, tendo como resultado, uma célula com dois núcleos e os eventuais micronúcleos que foram induzidos pelo agente testado (FENECH, 2000).

Um outro parâmetro importante na avaliação da ação de xenobiontes sobre culturas celulares é a análise dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas células, após a exposição das mesmas ao agente investigado.

As ROS são moléculas que possuem elétrons livres ou não pareados, isso conferem a elas uma alta instabilidade elétrica. Mesmo tendo uma meia vida muito curta, elas podem reagir com qualquer composto que possa doar ou compartilhar elétron para sua estabilização. Quando elas reagem com componentes celulares, podem gerar moléculas que induzem danos às células. Quando os níveis de espécies reativas aumentam muito, são acionados os sistemas de defesa antioxidante enzimáticos e não enzimáticos das células, para eliminar as ROS do meio (CESARATTO et al., 2004).

Existem duas fontes de ROS nas células: as endógenas, que são induzidas naturalmente pelos subprodutos do metabolismo aeróbio das células e as exógenas, geradas por ação de agentes externos à célula. Esses xenobiontes desequilibram o sistema celular e causam danos às macromoléculas, como o DNA (KRYSTON et al., 2011). O acúmulo de danos oxidativos ocorre por ineficiência do sistema de reparo ou por reparo incompleto das células. As ROS de origem exógenas podem ser perigosas para o sistema celular e dar início a processos de carcinogênese (KRYSTON et al., 2011).

2. OBJETIVOS GERAIS

Este estudo teve como objetivo investigar os possíveis efeitos danosos de três corantes envolvidos na formulação da tinta capilar preta (Arianor Cherry Red, Arianor Siena Brown e Arianor Ebony) e estimar seus potenciais citotóxicos, genotóxicos, mutagênicos e de causar estresse oxidativo sobre uma linhagem celular humana de câncer de bexiga (linhagem 5637).

2.1. Objetivos específicos

- Avaliar o potencial citotóxico dos corantes, individualmente e em associação (com e sem a presença de peróxido de hidrogênio), por meio do ensaio da resazurina;
- Avaliar o potencial genotóxico dos corantes, individualmente e em associação (com e sem a presença de peróxido de hidrogênio), por meio do ensaio do cometa;
- Avaliar o potencial mutagênico dos corantes, individualmente e em associação (com e sem a presença de peróxido de hidrogênio), por meio do teste do micronúcleo;
- Avaliar o potencial dos corantes induzirem estresse oxidativo em células mantidas em cultura, individualmente e em associação (com e sem a presença de peróxido de hidrogênio), por meio de ensaios que avaliam os níveis de atividade da enzima SOD, níveis da proteína GSH e níveis de TBARS;
- Fornecer informações sobre os efeitos que esses corantes têm sobre as células e as possíveis consequências que podem causar para a saúde humana;
- Contribuir com informações sobre o perigo do uso e manipulação desses corantes, isto é, perigos para consumidores e para profissionais da área de cosmetologia.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Histórico das tinturas

O tingimento de cabelo e a pintura de diferentes partes do corpo são manifestações visuais das culturas, desde as mais antigas até as recentes. Na antiga cultura do povo chinês, a cerca de 3.000 anos A.C., a pintura das unhas era uma forma de representação social, sendo que cada cor representava uma classe social diferente (CHAUDHRI; JAIN, 2009).

Uma das formas mais antigas de ornamentação corporal é o tingimento dos cabelos (THOMPSON, 1957). Para a pigmentação capilar, são utilizados corantes naturais, vegetais e minerais. Nos achados do Antigo Egito, de civilização datada de cerca de 3.000 anos A.C., existem claras evidências do uso de sais inorgânicos como formas de pigmentação, bem como muitos corantes feitos com animais e vegetais (LOYSON, 2011). A henna (*Lawsonia inermis*), por exemplo, era uma das plantas utilizadas na pigmentação dos cabelos das múmias do antigo Egito (KAZANDJIEVA et al., 2007), como também para o tingimento de barba dos homens muçulmanos (BENAIGES, 2007). Já na cultura romana, a descoloração dos cabelos foi introduzida quando as escravas gaulesas, que eram loiras, chegaram a Roma. As mulheres romanas, que tinham cabelos castanho escuro, gostaram da tonalidade clara dos cabelos das escravas e, aí, passaram a descolorir os seus cabelos (CORBETT, 2000). O processo de descoloração era feito pela aplicação de uma pasta feita com a mistura de cinzas de madeira de faia e gordura de cabra (BENAIGES, 2007). A cultura de descoloração e tingimento dos cabelos continuou crescendo durante as épocas renascentista e barroca. O peróxido de hidrogênio só foi sintetizado em 1818, por Louis-Jacques Thenard, e demorou alguns anos para ser usado como agente descolorante, sendo, na época, conhecido como “Água da Juventude” (WOLFRAM, 2016).

No século XIX, uma solução aquosa de acetato de chumbo, acrescida de enxofre suspenso, era comercializada para restaurar a cor dos cabelos acinzentados. Foi nesse mesmo século que a mudança de cor dos cabelos e perucas se tornou usual, caracterizando-se em um setor comercial de extrema importância. Já na segunda metade do século XIX, houve um grande avanço na indústria de corantes têxteis, porém não foi possível usar esses corantes para a formulação de tinturas capilares, devido ao tamanho molecular desses corantes (CORBETT, 2000). Em 1883, Erdmann e Monnet, baseando-se nas observações feitas por August W.

von Hoffman em 1863, patentearam tinturas capilares usando parafenilenodiamina (PPD) e 2,5-diaminotolueno (PTD), com peróxido de hidrogênio (LEWIS et al., 2013).

Nos anos de 1907 e 1908, o químico e fundador da empresa *L'Oréal Group* Eugène Paul Louis Schueller criou e patenteou uma tintura denominada *Oréal* dando início à comercialização da primeira marca de tintura capilar (L'ORÉAL'S HISTORY, 2018). Em 1931, Lawrence Gelb, empresário e químico americano, trouxe de Paris diversos pacotes de tinturas capilares e criou um produto simples de ser aplicado e confiável quanto a cor, que passou a ser denominado Miss Clairol. Essa marca se tornou sucesso nos Estados Unidos e, a fim de aumentar a distribuição do produto, a empresa passou a fazer a comercialização em mercados e farmácias (WOLFRAM, 2016).

Atualmente, há uma estimativa de que cerca de 50 a 80 % das mulheres dos Estados Unidos, da União Europeia e do Japão têm seus cabelos tingidos (IARC, 2010). No Brasil, cerca de 26 % da população faz uso de tinturas de cabelo, sendo que desses, 85 % são mulheres e 15 % homens (INMETRO, 2017).

3.2. As tinturas capilares

De acordo com Choi (2013), o termo corante pode ser definido por um composto em solução que tem a capacidade de alterar ou dar cor a um substrato. Tanto os corantes como os pigmentos são utilizados como agentes colorantes, mas, de acordo com o dossiê técnico elaborado por Veloso (2012), a diferença básica entre eles está na solubilidade em água e/ou em solventes orgânicos, sendo os pigmentos insolúveis e os corantes solúveis nesses compostos. Como já comentado anteriormente, foi o advento de corantes têxteis sintéticos que impulsionou a criação de corantes para uso nas tinturas capilares. De acordo com Guerra-Tapia e Gonzalez-Guerra (2014), as tinturas podem ser classificadas como tinturas vegetais, minerais ou metálicas e sintéticas, classificação esta, baseada na duração da cor.

As tinturas vegetais derivam de plantas, por exemplo a henna, usada desde o antigo Egito, para mudar a tonalidade da cor (SAMPATHKUAR; YESUDAS, 2009) e a camomila, para a descoloração dos cabelos (VITA, 2009). Guerra-Tapia e Gonzalez-Guerra (2014) apontam que as tinturas vegetais não são tóxicas e são capazes de alterar a tonalidade da cor apenas por um curto período de tempo.

A formulação das tinturas minerais (ou metálicas) é feita, por exemplo, com sais de chumbo, bismuto ou prata, que promovem, gradualmente, a coloração capilar

(LIND et al., 2005). O escurecimento ou clareamento do cabelo, feitos por essas tinturas, podem durar por semanas ou meses, porém elas têm um alto potencial tóxico, não devendo ser usadas em associação com peróxido de hidrogênio (GUERRA-TAPIA; GONZALEZ-GUERRA, 2014).

Dentre as tinturas sintéticas, temos três diferentes tipos: as tinturas temporárias, as tinturas semipermanentes e as tinturas permanentes. As tinturas temporárias são corantes diluídos em meio aquoso, que reagem com as fibras presentes na cutícula do fio de cabelo (OLIVEIRA et al., 2014). Esse tipo de reação gera ligações extremamente fracas e o efeito acaba sendo facilmente removido em poucas lavagens (GUERRA-TAPIA; GONZALEZ-GUERRA, 2014).

As tinturas semipermanentes correspondem a apenas 10% das disponíveis no mercado (DRAELOS, 2005). Essas tinturas podem persistir por algumas semanas, uma vez que o corante se liga ao cabelo por meio de interações polares fracas ou de Van der Waals (OLIVEIRA et al., 2014). Existem dois tipos de tinturas semipermanentes: as não oxidativas e as oxidativas. As tinturas não oxidativas são muito utilizadas para melhorar a cor dos cabelos ou para suavizar o amarelado dos fios acinzentados. Esse tipo de tintura não é capaz de clarear a cor, pois não possuem agentes descolorantes na sua formulação (GUERRA-TAPIA; GONZALEZ-GUERRA, 2014). Já as tinturas semipermanentes oxidativas possuem 2% de peróxido de hidrogênio na formulação, além de alguns agentes alcalinizantes, que permitem que elas tenham um maior poder de coloração (GUERRA-TAPIA; GONZALEZ-GUERRA, 2014).

As tinturas permanentes são as mais amplamente utilizadas no mundo, correspondendo a 80% do mercado mundial de tinturas. Esse consumo é devido à sua versatilidade, facilidade de aplicação e longa duração da cor (GUERRA-TAPIA; GONZALEZ-GUERRA, 2014; OLIVEIRA et al., 2014). Essas tinturas possuem peróxido de hidrogênio, que atua como agente oxidante; amônia ou monoetanolamina; agentes alcalinizantes; além de intermediários primários, como p-diaminas e p-aminofenóis; e agentes acopladores, m-aminofenol, resorcinol ou 1-naftol (GUERRA-TAPIA; GONZALEZ-GUERRA, 2014).

A formação da cor se dá em ambiente alcalino, por uma reação de oxidação dos intermediários primários pelo peróxido de hidrogênio. Esses compostos intermediários reagem, então, com os acopladores e formam as moléculas de cores complexas, que se difundirão pela cutícula do fio de cabelo (FRANÇA et al., 2015).

Esse processo de coloração é irreversível, podendo ser eliminada apenas com o corte dos fios do cabelo (GUERRA-TAPIA; GONZALEZ-GUERRA, 2014).

As tinturas sintéticas são constituídas principalmente por anilinas. Os diferentes corantes utilizados podem ser classificados de acordo com os seus grupos químicos em: acridinas, antraquinóides, azos, cianinas, diarilmetanos, ftalocianinas, nitros, nitrosos, quinonas-imina, tiazoletriarilmetanos e xantinas (BAFANA et al., 2011). Dentre esses, os corantes azo, que recebem o nome devido a ligação azo que possuem ($R-N=N-R'$), são produzidos em maior volume, por serem de simples produção, terem grande diversidade estrutural e oferecem uma grande variedade de cor (BAFANA et al., 2011; NGUYEN; SALEH, 2016). Os corantes azos primeiramente produzidos foram a *Aniline Yellow*, por C. Mene em 1861, e o *Bismarck Brown*, por Martius em 1963 (BAFANA et al., 2011). A reação para produção dos corantes azo usado atualmente é a diazotização, na qual aminas aromáticas reagem com ácido nitroso e formam sais diazônico que, por fim, sofrem acoplamento diazótico com compostos aromáticos ativados, como anilinas e fenóis (MORRIS; TRAVIS, 1992). De acordo com Morris e Travis (1992), essa reação foi realizada pela primeira vez na Alemanha (1875), por Caro e Witt, na Fábrica de Anilina e Soda de Baden (BASF).

3.3. Alerta sobre o uso de tinturas capilares.

A grande maioria dos corantes atualmente utilizados em tinturas capilares possuem ligações azo em suas moléculas (SUN et al., 2017). De acordo com Yahagi et al. (1975), esses corantes são reconhecidamente carcinogênicos e, após sua metabolização, formam muitos derivados que também apresentam ação carcinogênica, por promoverem alterações severas na estrutura do DNA. Os corantes azo podem ser reduzidos em contato com a pele, seja pelas bactérias ali presentes ou pelas próprias células da epiderme que possuem atividade azoredutase (COLLIER et al., 1993; BRÜSCHWEILER; MERLOT, 2017). Dessa forma, grande parte das aminas aromáticas, com potencial mutagênico e/ou carcinogênico, liberadas nessa reação de redução podem ser absorvidas pela pele (KORINTH et al., 2013; BRÜSCHWEILER; MERLOT, 2017).

Muitos estudos têm sugerido um aumento da incidência de câncer, devido ao uso das tinturas capilares permanentes (LOWRY et al., 1980; CERNIGLIA et al., 1986; ANDREW et al., 2004; KOUTROS et al., 2011; KIM et al., 2016). Por esta razão, alguns estudos epidemiológicos investigaram a incidência de vários tipos de

câncer em pessoas que fazem uso de tinturas capilares ou em profissionais expostos a esses químicos (NOHYNEK et al., 2004; KIM et al., 2016).

De acordo com a divulgação da IARC (1993) e de pesquisadores como Lowry et al. (1980) e Cerniglia et al. (1986), as tinturas capilares estão sendo associadas com um risco aumentado de câncer bexiga em cabeleiros (1,6 para homens e 1,1 para mulheres). Guo et al. (2014) afirmam que, mulheres com determinados genótipos, que usam tinturas capilares desde 1980, ou antes, têm um risco aumentado de adquirirem Linfoma Não Hodgkin. Ainda, segundo os mesmos autores, esse risco é devido a polimorfismos dos genes associados com reparo do DNA.

Um estudo de meta-análise realizado na Finlândia revela que o aumento no uso de tinturas capilares pode causar um impacto na saúde pública, devido ao risco associado a desenvolvimento de câncer de mama (HEIKKINEN et al., 2015). Bolt; Golka (2007) sugerem também que existe ainda um risco maior de carcinogenicidade de bexiga relacionado com exposição a colorações mais escuras, correlacionado com a presença de uma maior concentração de intermediários primários na sua composição

Apesar dos muitos estudos que comprovam o aumento dos riscos de câncer com a exposição a tinturas capilares, outros autores afirmam não terem encontrado comprovação para esse fato (KELSH et al., 2008, KOUTROS et al., 2011; TURATI et al., 2014). O estudo realizado por Vedel-Krogh et al. (2016), por exemplo, mostra que o uso de tinturas capilares não influenciou na morbidade ou mortalidade das mulheres estudadas. Porém, os mesmos autores, ao realizarem uma análise sensível, constataram um aumento de risco de melanoma. Towle et al. (2017), ao estudar a relação do uso de tinturas de cabelo com o risco de leucemia, observaram que, os resultados combinados não indicavam risco significativo de indução da doença. No entanto, ao separar por característica de exposição, gênero, tempo de uso e tipo de tintura utilizada, eles observaram uma associação estatisticamente significativa entre uso de tinturas e o risco de leucemia. Tanto os autores Vedel-Krogh et al. (2016) quanto Towle et al. (2017) concordam que os motivos dessa incoerência são desconhecidos e que mais estudos devem ser realizados para que se possa esclarecer os reais riscos associados à utilização de tinturas capilares.

Além da preocupação com os riscos das tinturas capilares para a saúde dos consumidores, existe ainda uma grande preocupação com a saúde dos profissionais que se expõe a elas. Lind et al. (2017) mostraram que os cabeleiros ficam

expostos aos corantes das tinturas durante diferentes etapas do processo de coloração, como no preparo da mistura, na aplicação dessa mistura, nas lavagens para a retirada do excesso da mistura e, até mesmo, pela manipulação dos cabelos tingidos, durante o corte dos cabelos. Apesar da existência de Equipamentos de Proteção Individual (EPIs), como luvas e máscaras, estudos mostram que há uma falta de esclarecimentos sobre a necessidade do uso desses EPIs por estes profissionais, bem como de informações sobre a utilização correta dos mesmos ou até mesmo pela utilização de EPIs impróprios para essa finalidade (ANTELMÍ et al., 2015; ORESKOV et al., 2015). Assim, da mesma forma que os consumidores correm riscos pelo uso das tinturas capilares, os profissionais da área de cosmetologia também correm, pois eles se expõem, até mais frequentemente a esses químicos, cujos componentes podem ser absorvidos pela pele e atingir órgãos, como a bexiga.

3.4. O uso de cultura celular

A técnica de cultivo celular engloba um conjunto de técnicas que possibilita a manutenção de células ou tecidos fora do organismo vivo, sem que eles percam suas propriedades fisiológicas, bioquímicas e genéticas. Essa técnica foi estabelecida em 1885 pelo embriologista alemão Wilhelm Roux, que conseguiu isolar e manter, *in vitro*, células de um embrião de galinha, por vários dias, em uma solução salina aquecida (ALBERTS et al., 2002).

Durante a primeira metade do século XX, acreditava-se que as células de cultura primária, ou seja, células oriundas de um fragmento de tecido obtido por desagregação mecânica ou enzimática (MORAES et al., 2005), poderiam ser cultivadas infinitamente, se permanecessem sob condições ambientais corretas (HAYFLICK; MOORHEAD, 1965). No entanto, depois de um número de divisões, conhecido como limite de Hayflick, as células entravam em senescência replicativa (HAYFLICK; MOORHEAD, 1965), limitando assim a sua sobrevivência em definitivo.

A subcultivo de células humanas por tempo indefinido, só foi possível em 1951, quando o pesquisador George Gey do Hospital Johns Hopkins, em Baltimore – EUA, isolou células de carcinoma cervical humano de uma paciente (SCHERER et al., 1953). Essa linhagem celular imortalizada, denominada HeLa, é ainda amplamente utilizada em laboratórios do mundo todo (OHNISHI et al., 2002).

Desde o estabelecimento das técnicas, a cultura de celular é muito utilizada para o estudo do comportamento de células, criação de vacinas, mapeamento

genético e tratamento de doenças degenerativas, por apresentar semelhanças com o sistema humano (RIBEIRO et al, 2003). Os ensaios com cultura celular permitem o controle das condições ambientais, como pH, temperatura, concentração de CO₂, o que limita erros por essas variáveis; são reprodutíveis; sensíveis a xenobiontes e podem ser realizados em períodos mais curtos que os testes *in vivo* (ROGERO et al., 2003). Além disso, por terem grande semelhança com os sistemas *in vivo*, podem substituir ensaios realizados com organismo-teste inteiros, evitando assim o sacrifício de vários animais (CARVALHO, 1996).

3.5. Testes de citotoxicidade com resazurina

A citotoxicidade é a propriedade tóxica ou danosa de uma substância sobre uma célula viva, que pode causar mudanças na morfologia, integridade estrutural e metabolismo, até induzir a morte da própria célula (PARBOOSING et al., 2017). Assim, os testes de citotoxicidade são importantes na avaliação de compostos químicos, para determinar se eles têm influência na proliferação celular ou até mesmo se são capazes de causar a morte das células. Estes testes precisam ser confiáveis, rápidos, eficientes e não devem interferir na ação do composto a ser testado (O'BRIEN et al, 2000).

Os ensaios de citotoxicidade, colorimétricos ou fluorimétricos, são amplamente utilizados em testes *in vitro*. Um exemplo de teste colorimétrico comumente utilizado é o teste do MTT, descrito inicialmente por Mossmann (1983). O MTT (brometo de 3-(4,5dimetiliazil-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) é um sal tetrazólio solúvel em água que, quando metabolizado pela enzima succinato desidrogenase presente na membrana interna da mitocôndria, é reduzido a formazan, um produto de coloração roxa (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006). Assim, apenas células que permaneceram vivas, após serem expostas à um xenobionte, têm capacidade de acumular e reduzir o MTT (STOKERT et al., 2012). Apesar de possuir um padrão de excelência para testar a citotoxicidade, van Tonder et al. (2015) relatam que os resultados do teste do MTT podem sofrer muitas interferências, uma vez que a formação dos cristais depende da taxa metabólica e número de mitocôndrias. Os mesmos autores ainda citam que inibidores de glicólise também são capazes de interferir na redução do MTT.

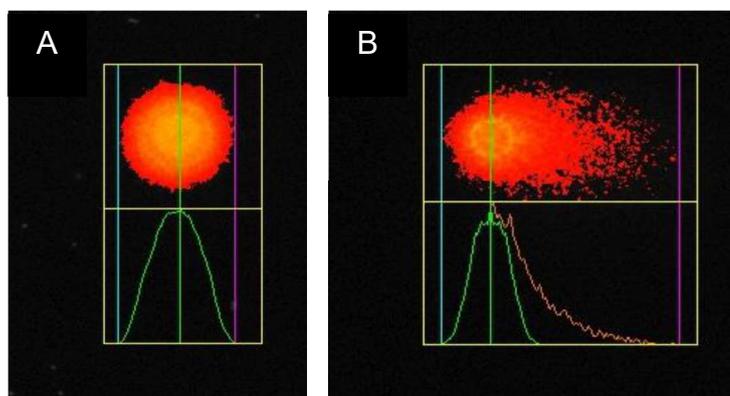
O teste da resazurina (ou Alamar Blue), que pode ser tanto colorimétrico como fluorimétrico, apresenta uma maior sensibilidade quando analisado fluorometricamente (VAN TONDER et al., 2015). A resazurina é um corante azul não fluorescente que,

quando entra nas células saudáveis, é reduzido por atividade de enzimas mitocondriais e citoplasmáticas e se transforma em resorufina, um corante fluorescente de cor rosa (O'BRIEN *et al*, 2000; RAMPERSAD, 2012). A conversão da resazurina em resorufina aparenta ser substrato-específica de forma que inibidores de glicólise, por exemplo, não afetam essa conversão (VAN TONDER *et al.*, 2015). A resorufina pode, ainda, após um período prolongado de incubação, ser reduzida a uma forma não fluorescente e sem cor, denominada dihidroresufina (RAMPERSAD, 2012). Apenas células viáveis tem a capacidade de reduzir a resazurina. Além disso, van Tonder *et al.* (2015) apontam para a vantagem da resazurina não ser tóxica para as células.

3.6. O ensaio do cometa

Também conhecido como Eletroforese em Gel de Célula Única, o ensaio do cometa é um teste quantitativo, visual e rápido para avaliar os danos causados no DNA das células eucarióticas (BURLINSON *et al.*, 2007). Os primeiros cientistas a utilizar essa técnica foram Rydberg e Johanson (1978), cujo protocolo foi adaptado para células de mamíferos por Östling e Johanson (1984) (COTELLE; FÉRARD, 1999). O ensaio se baseia em incorporar as células em agarose e colocá-las sobre uma lâmina para que possam ser lisadas. Após a lise, o DNA pode migrar sobre a lâmina, impulsionado por uma corrente da eletroforese (TICE *et al.*, 2000). Se houver algum tipo de quebra na estrutura do DNA, os fragmentos derivados desta quebra serão arrastados pela corrente elétrica em direção ao ânodo, formando uma imagem semelhante a um cometa (COLLINS, 2004).

Figura 1: Imagens do ensaio do cometa com a linhagem celular 5637 coradas com GelRed®.



A: Representação de um nucleóide sem danos; B: Representação de um nucleóide com fragmentos de DNA formando a cauda. Fonte: Foto tirada pela autora utilizando o software Comet Assay IV (INSTEM® – Filadélfia, EUA).

Os parâmetros mais comumente utilizados na análise do cometa são comprimento de cauda, intensidade de cauda e momento de cauda (HARTMANN et al., 2003; COLLINS, 2004). Apesar de muito utilizado, Collins (2004) não recomenda o uso do parâmetro comprimento de cauda. Para o autor, não há uma linearidade entre o comprimento da cauda e a dose das substâncias testada, pois existe um limite máximo de aumento do comprimento da cauda, mesmo que o dano no DNA continue aumentando. O momento da cauda é definido como o produto do comprimento da cauda e a fração do DNA que migrou (HARTMANN et al., 2003). Esse parâmetro, porém, também não é linear em relação à dose (COLLINS, 2004, DEHON et al., 2008)) e, por depender do comprimento de cauda, pode gerar resultados imprecisos. Por fim, o parâmetro intensidade de cauda nos dá uma relação da frequência de quebras que ocorreu no DNA, permitindo distinguir o nível de dano, pela porcentagem de DNA presente na cauda do cometa (COLLINS, 2004).

Este teste ganhou popularidade por ser um teste muito sensível, capaz de detectar baixos níveis de dano no DNA de células individuais (SINGH et al, 1988), por requerer pouca quantidade de células, além de possibilitar sua aplicação em qualquer fase do ciclo de divisão celular (FAIRBAIRN et al., 1995; PAVLICA et al., 2001). Tice et al. (2000) ainda citam que o ensaio do cometa é utilizado em genética toxicológica para diferenciar a indução de genotoxicidade e citotoxicidade, diferenciar carcinógenos genotóxicos de não genotóxicos, como ensaio de rastreamento com potencialidade de alto rendimento e como parte de uma bateria de ensaios *in vivo/in vitro* para aprovações regulatórias.

3.7. Teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese

O micronúcleo (MN) é uma pequena massa de cromatina que aparece durante a divisão celular e é oriundo de fragmentos de cromossomos acêntricos ou de cromossomos inteiros que não foram incorporados ao núcleo principal (SCHMIDT, 1976; FENECH; MORLEY, 1985). Ao final da divisão, quando o envoltório nuclear se reorganiza ao redor da cromatina nuclear, esses fragmentos acêntricos/cromossomos não são incorporados no núcleo, mas são envolvidos por membrana, assumindo uma morfologia de pequenos núcleos, denominados de MN (FENECH, 2000). Os MNs são contabilizados apenas em células binucleadas, como certificação de que essas células passaram por um ciclo de divisão (EL-ZEIN et al., 2008). As células binucleadas são obtidas por adição de citocalasina B ao meio, substância esta que

impede a polimerização da actina, responsável pela citocinese, mas não inibe a divisão nuclear da célula (CARTER, 1967; CHEONG et al., 2013). É possível, por meio desta técnica, verificar se um determinado agente é capaz de causar danos irreversíveis ao material genético da célula e avaliar se ele apresenta ou não potencial mutagênico (FENECH; MORLEY, 1985). Esse teste também nos permite observar a formação de pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares (CHEONG et al., 2013), bem como células em processo de necrose e apoptose (FENECH, 2000).

As pontes nucleoplasmáticas são ligações que podem ser observadas entre os núcleos de uma célula binucleada (FENECH, 2000). Acredita-se que elas são formadas, quando os centrômeros de cromossomos dicêntricos são puxados para polos opostos da célula e não se rompem ao final da divisão. O envoltório nuclear, que envolve o núcleo, envolverá também esse prolongamento, conferindo uma morfologia de pontes entre os dois núcleos da célula (FENECH, 2006). Outro mecanismo de formação de MNs é pela formação de brotos nucleares (FENECH, 2006, FERNANDES et al., 2007). Shimizu et al. (1998) observaram que havia uma amplificação de genes em culturas de células de mamíferos que cresciam sob fortes condições seletivas, sendo esse DNA amplificado localizado em sítios específicos e eliminados durante a fase S.

Pelo teste do MN, ainda é possível contabilizar células em processo de morte celular. Uma célula necrótica possui citoplasma pálido com vários vacúolos ou com perda de citoplasma, membrana citoplasmática danificada ou irregular e estrutura nuclear parcialmente intacta (FENECH, 2000). Já as células em processo de apoptose apresentam fragmentação nuclear com citoplasma e membrana citoplasmática intactos (FENECH, 2000).

O teste do micronúcleo, também conhecido como ensaio do “citoma” (FENECH, 2006), permite também estimar o índice citotóxico de divisão nuclear (FENECH, 2000), por meio de um cálculo adaptado do método estabelecido por Eastmond e Tucker (1989). Isso é feito através de uma equação que leva em conta células que possuam um, dois, três e quatro núcleos, além da contabilização de células em processo de morte celular. Pelo cálculo estabelecido por Fenech (2000), é possível obter um parâmetro para comparação dos efeitos que os agentes avaliados têm sobre a cinética de divisão celular.

3.8. Estresse oxidativo

O metabolismo aeróbio, realizado principalmente pela mitocôndria, produz, como subproduto, espécies reativas de oxigênio (ROS), como os ânions superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxila (OH^{\cdot}) (RAHAL et al., 2014). Essas espécies são reativas com componentes celulares e precisam ser eliminadas das células pelos sistemas de defesa antioxidantes enzimáticos, como superóxido dismutase (SOD), e não enzimáticos, como a glutatona reduzida (GSH) (CESARATTO et al., 2004).

O equilíbrio entre a produção e a eliminação de ROS pode ser perturbado por diversos fatores, como exposição à radiação UV, metabolismo de drogas ou até mesmo patógenos (GILL; TUTEJA, 2010; RAHAL et al., 2014). Esses agentes aumentam os níveis intracelulares de ROS, podendo causar danos aos componentes celulares (GILL; TUTEJA, 2010). Assim, os mecanismos de eliminação de danos oxidativos celulares é controlado pelas defesas antioxidantes, que limitam os níveis de espécies reativas dentro das células (SHAMI; MOREIRA, 2004). Não havendo eficiência dessas defesas, é possível que haja o desenvolvimento de várias doenças, como o câncer, uma vez que as ROS formadas são capazes de causar quebras nas fitas de DNA, por alterações nas ligações das bases púricas e pirimídicas (RAHAL et al., 2014).

As ROS também são capazes de causar peroxidação lipídica, um dos mecanismos mais danosos às células, pois pode levar à formação de hidroperóxidos e aldeídos, que danificam a membrana celular e, como consequência, causam a morte da célula (HALLIWELL, 1987; GILL; TUTEJA, 2010). Os hidroperóxidos e aldeídos, como o malondialdeído (MDA), são espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs), que podem ser quantificados pelo método desenvolvido por Buege e Aust (1978). A enzima SOD, que também participa do sistema de defesa antioxidante, apresenta metal (cobre ou zinco, manganês ou ferro) na sua estrutura e é responsável por catalisar a reação de dismutação do $O_2^{\cdot-}$ em O_2 e H_2O_2 (MCCORD; FRIDOVICH, 1969; GILL; TUTEJA, 2010). A GSH é um agente antioxidante não enzimático que, para proteger a célula de um agente estressor, sofre oxidação para transformar o xenobiótico, ajudando na sua eliminação (JOSEPHY; MANNERVIK, 2006). Ao se estabelecer um desequilíbrio entre a forma oxidada da GSH (GSSH) e a GSH, há a ação da enzima glutatona redutase sobre a GSSH, reduzindo esse tripeptídeo a GSH, e normalizando o sistema protetor (HUBER et al., 2008).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Material químico

Os corantes testados neste estudo foram o Arianor Cherry Red (composto por Basic Red 51 – CAS no. 77061-58-6) e Arianor Sienna Brown (composto por Basic Brown 17 – CAS no. 68391-32-2) e o Arianor Ebony, que é uma mistura de cinco outros corantes: Basic Blue 99 (CAS no. 68123-13-7), Basic Brown 16 (CAS No. 26381-41-9), Basic Yellow 57 (CAS No. 68391-31-1), Basic Red 76 (CAS no. 68391-30-0) e Acid Violet 43 (CAS no. 4430-18-6). Todos os corantes foram gentilmente cedidos, na forma de pó, pela empresa Sensient Cosmetic Technologies Brasil, São Paulo, Brasil.

O peróxido de hidrogênio (água oxigenada), na concentração igual à 6 % (20 volumes), utilizado nos ensaios, foi adquirido em uma farmácia da cidade de Rio Claro-SP.

4.2. Material biológico

Foi utilizado como organismo-teste a linhagem celular 5637, derivada de carcinoma de bexiga humana. Esta linhagem foi gentilmente cedida pela Profa. Dra. Cláudia Aparecida Rainho do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) de Botucatu. As células foram mantidas em cultura no laboratório de Mutagênese do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro.

4.2.1. Manutenção e uso da linhagem celular 5637

As células de bexiga humana (linhagem 5637) permaneceram estocadas em nitrogênio líquido, até o momento da sua utilização nos experimentos. O cultivo dessas células foi realizado em frascos de cultura de 25 cm², mantidos em temperatura e nível de CO₂ controlados, 37 °C e 5 % respectivamente. Foi utilizado o meio DMEM (Meio de Eagle modificado por Dulbecco – Gibco/Cultilab), 2.200 mg/L de NaHCO₃, 3.500 mg/L de glicose e 0,1% de solução de antibiótico-antimicótico (penicilina 10.000 U.I./mL / estreptomicina 10 mg/mL, Cultilab), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF).

Inicialmente, os tubos criogênicos contendo a linhagem celular foram descongelados em 10 mL de meio de cultura com soro. Quando as células atingiam aproximadamente 80 % de confluência, o meio foi descartado e as células lavadas

duas vezes com 5 mL de PBS-EDTA (tampão fosfato-salino). Em seguida, foram submetidas à ação de 0,5 mL de Tripsina-EDTA 0,25 % por 5 minutos. Decorrido esse tempo, foram adicionados 1,5 mL de meio com soro, para inativar a tripsina. As células foram, então, transferidas para novos frascos de cultura contendo 5 mL de meio suplementado. Esse procedimento foi realizado duas vezes, antes de se iniciar os experimentos com a linhagem, com o objetivo de garantir que todo seu metabolismo fosse reativado. Após garantir uma boa quantidade de células, foram realizados os ensaios deste estudo.

4.3. Ensaio da resazurina

A exposição das células às diferentes concentrações dos corantes (individualmente, em associação e em associação com peróxido de hidrogênio) foi feita em placas de 96 poços, nas quais foram semeadas $2,34 \times 10^4$ células da linhagem celular 5637 (células cancerosas de bexiga humana) por poço em 200 μ L de meio completo, de acordo com o protocolo descrito por RISS et al. (2016) com algumas modificações. Nos poços das colunas 1 e 7 das placas não foram semeadas células para serem usados como teste branco do experimento. Depois de um período de 24 horas de incubação em estufa de CO₂ (5 % e a 37 °C), o meio de cada poço foi substituído por um meio de cultura novo (sem SBF) contendo os tratamentos, preenchendo um volume final de 200 μ L por poço. Para o controle negativo, foi adicionado somente meio de cultura sem soro e, como controle positivo, meio de cultura sem soro com Triton X-100 a 1 %. Nos demais poços da placa, foram adicionadas as diferentes concentrações das misturas dos corantes.

Os tratamentos permaneceram nos poços por um período de três horas e, posteriormente, foram retirados e adicionou-se 200 μ L de solução de resazurina 44 μ M (CAS No. 62758-13-8) diluída em meio de cultura sem soro. A placa permaneceu incubada por quatro horas e, após esse período, as placas foram lidas no leitor de microplaca (Aparelho Infinite® 200 Pro - Tecan), em comprimento de onda de excitação de 560 nm e de emissão de 590 nm.

4.4. Ensaio do cometa

O ensaio do cometa foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Tice et al. (2000), com algumas modificações. Após o término do período de exposição aos tratamentos (três horas), os frascos foram lavados duas vezes com PBS-EDTA e as

células foram soltas dos frascos com 500 µL de Tripsina-EDTA (0,25 %), a qual foi inativada, após 5 minutos, com 1,5 mL de meio suplementado. As células foram homogeneizadas, transferidas para tubos de centrífuga e centrifugadas por 10 minutos à 1500 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o pellet foi homogeneizado.

Para o prosseguimento do ensaio do cometa, foi avaliada a viabilidade celular, por meio do método do Azul de Tripán, por meio das concentrações pré-estabelecidas no ensaio de resazurina. Neste teste, 10 µL da suspensão celular foram misturadas com 10 µL de Azul de Tripán. Na sequência, foram analisadas 100 células, para quantificar o percentual de células viáveis (brancas) e não viáveis (azuis). As concentrações que mantiveram uma viabilidade celular maior ou igual à 80% foram usadas no ensaio do cometa.

Em lâminas, previamente cobertas com agarose comum, receberam 20 µL de suspensão celular misturada com 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão (37 °C). Na sequência, as lâminas foram cobertas com lamínulas e resfriadas a uma temperatura de 6 °C, por 20 minutos. Em seguida, as lamínulas foram extraídas e as lâminas submetidas a solução de lise (1 mL de Triton X-100, 10 mL de DMSO e 89 mL de solução de lise estoque – NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM com pH ajustado para 10, com auxílio de solução aquosa de NaCl 5M), onde permaneceram por, no mínimo, 1 hora a 6 °C. Após este procedimento, as lâminas foram colocadas em uma cuba de eletroforese e cobertas com solução tampão (NaOH 300mM, EDTA 1mM, pH < 13), por 20 min, para a desnaturação do DNA. A corrida de eletroforese foi realizada por 20 minutos a uma corrente de 40 V e 300 mA (~0,8 V/cm). Em seguida, as lâminas foram neutralizadas com tampão (0,4 M tris-HCl, pH 7,5) e fixadas com etanol absoluto. Após secas, foram guardadas à 4 °C, até o momento da análise.

Para realizar a análise, as lâminas foram coradas com 50 µL de solução de GelRed®, cobertas com lamínula e, imediatamente analisadas em microscópio de fluorescência Leica DM 4000B (filtro de excitação de 515-560 nm e filtro de barreira de 590 nm), em um aumento de 400 vezes. Foram analisados 50 nucleóides por lâmina, não sobrepostos e escolhidos aleatoriamente, totalizando 300 nucleóides por tratamento (COLLINS, 2004). A dimensão dos danos foi avaliada pelo programa Comet Assay IV (INSTEM® – Filadélfia, EUA).

4.5. Ensaio do micronúcleo com bloqueio da citocinese

Para o ensaio do MN, foram semeadas, em cada frasco de cultura, 1×10^6 células em 5 mL de meio suplementado com SBF. Para a obtenção de células binucleadas, ao término da exposição aos tratamentos (três horas), o meio de cultura foi substituído por um novo meio, onde foram adicionados 50 μ L de citocalasina B (300 μ g/mL) em 5 mL de meio completo, por um período de 24 horas. Após a colheita, as células foram tratadas com solução hipotônica (KCl 0,075 M) e duas gotas de formol 40 %, sendo, posteriormente, centrifugadas a 1500 rpm por cinco minutos. O sobrenadante foi descartado, e o pellet foi fixado em solução fixadora de Carnoy (3 partes de etanol absoluto: 1 parte de ácido acético glacial).

Antes da confecção das lâminas, elas foram lavadas e mantidas em água destilada a 4 °C. Em seguida, a suspensão celular foi gotejada sobre lâminas contendo um filme de água gelada. Depois de secas a temperatura ambiente, as lâminas foram coradas com reativo de Schiff e contra coradas com Giemsa 5 %, por cinco minutos. Foram analisadas 2.000 células binucleadas por réplica (com delimitações citoplasmáticas e nucleares íntegras e com núcleos de tamanhos similares, não sobrepostos e com mesmo padrão e intensidade de coloração), totalizando 6.000 células por tratamento. Também foram analisadas 500 células adicionais por lâmina, para serem usadas na obtenção do Índice Citotóxico de Divisão Nuclear (ICDN), onde foram contabilizadas células com um, dois, três e quatro núcleos e células em processo de apoptose e necrose, cujos valores obtidos foram aplicados na fórmula apresentada a seguir, proposta por Fenech (2000):

$$ICDN = \frac{(Ap + Nec + 1N + (2 \times 2N) + (3 \times 3N) + (4 \times 4N))}{500}$$

onde:

ICDN = Índice Citotóxico de Divisão Nuclear;

Ap = células apoptóticas;

Nec = células necróticas;

1- 4N = células viáveis com 1 a 4 núcleos.

4.6. Avaliação da atividade das enzimas antioxidantes

Para os ensaios de avaliação de estresse oxidativo, foram semeadas 1×10^6 células em cada frasco de cultura de 25 cm², contendo 5 mL de meio DMEM

suplementado com SBF, onde permaneceram, por um período de 48 horas, para estabilização. Na sequência, após três horas de tratamento com as concentrações dos corantes, as células foram lavadas com 5 mL PBS-EDTA gelado duas vezes, retiradas dos frascos com o auxílio de *scraper*, e transferidas para tubos criogênicos, onde foram armazenados em nitrogênio líquido até a posterior análise.

Para o desenvolvimento dos ensaios, as amostras foram descongeladas em gelo e, posteriormente, sonicadas duas vezes por 10 segundos cada, no aparelho QSonica Sonicators (modelo Q55), amplitude 20 kHz. A seguir, a solução de cada tubo criogênico foi transferida para microtubos, os quais foram dispostos em centrífuga refrigerada (Centrifuge 5430R – eppendorf®), e centrifugados, por 10 minutos a 10.000 rpm (4 °C). O sobrenadante foi utilizado nos ensaios de estresse oxidativo.

4.6.1. Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

A atividade da enzima superóxido dismutase foi avaliada de acordo com o método proposto por Marklund e Marklund (1974), com algumas modificações. Em uma placa de 96 poços, foram misturados, em cada poço, 20 µL de tampão Tris-HCl 25 mM (EDTA 20mM, pH 8,5), 20 µL do sobrenadante obtido e 20 µL de pirogalol 15 mM. A placa foi incubada à temperatura ambiente (25 °C), por 10 minutos, e a reação foi interrompida pela adição de 20 µL de HCl 1N. A atividade da SOD foi medida em leitor de microplaca (Aparelho Infinite® 200 Pro – Tecan), em comprimento de onda de 440 nm, expressa em unidade de absorvância/minuto.

4.6.2. Avaliação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH)

Os níveis de GSH dos tratamentos foram avaliados por meio do método descrito por Habig et al. (1974), com algumas modificações. Inicialmente, as proteínas das amostras, foram precipitadas misturando, em microtubos, 200 µL da amostra com 200 µL de TCA (ácido tricloroacético) a 20 % contendo 1 µM de EDTA. Essa solução permaneceu em repouso por cinco minutos. Decorrido esse tempo, os microtubos foram centrifugados em centrífuga refrigerada, por cinco minutos à 4000 rpm e a 4 °C. Em uma placa de 96 poços, foram adicionados, por poço 100 µL do sobrenadante 100 µL de tampão (fosfato 0,1 M e pH 7,4) e 20 µL de DTNB 10 mM (Reagente de Ellman). A absorvância foi monitorada em leitor de microplaca (Aparelho Infinite® 200

Pro –Tecan), em comprimento de onda de 410 nm, em dois momentos distintos (logo após a adição do DTNB e após 15 minutos da exposição).

4.6.3. Determinação da peroxidação lipídica (TBARS)

Os níveis de peroxidação lipídica foram determinados de acordo com o método descrito por Buege e Aust (1978), com algumas adaptações. Foram adicionados em tubos de ensaio, 700 µL da amostra, 1 mL de TBA (ácido tiobarbitúrico à 1 % diluído em solução de NaOH 50 mM), 10 µL de NaOH 10 M e 500 µL de solução de H₃PO₄ a 20 %. Essa mistura foi colocada em banho-maria por 15 minutos. Decorrido esse tempo, foi adicionado 1 ml de N-Butanol, os tubos de ensaio foram agitados para homogeneização da mistura. Logo em seguida, os tubos foram centrifugados à 3400 rpm, por cinco minutos, para separação da fase orgânica, e 250 µL do sobrenadante foram colocados em cada um dos poços das placas de Elisa. A placa foi lida em leitor de microplaca (Aparelho Infinite® 200 Pro - Tecan) em comprimento de onda de 535 nm.

5. RESULTADOS

Os resultados dessa pesquisa estão apresentados em forma de artigo, como segue:

Artigo 1: Cito- genotoxicidade de corantes de cabelo para células de bexiga humana.

Michele Perisatto Berreta; Letícia Cristina Gonçalves; Maria Aparecida Marin-Morales.

Artigo 2: Avaliação dos efeitos de tinturas capilares, com e sem peróxido de hidrogênio, sob células de bexiga humana.

Michele Perisatto Berreta; Letícia Cristina Gonçalves; Maria Aparecida Marin-Morales.

Artigo 1: Cito- genotoxicidade de corantes de cabelo para células de bexiga humana.

Michele Perisatto Berreta¹; Letícia Cristina Gonçalves¹; Maria Aparecida Marin-Morales^{1*}.

¹UNESP – Univ Estadual Paulista, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Av. 24-A, 1515, CEP 13506-900, Rio Claro, São Paulo, Brasil.

* Autor correspondente. Tel.: + 55 19 3526-4143; Fax: +55 19 3536-0009
e-mail: mamm@rc.unesp.br

RESUMO

Com o crescente uso de tinturas capilares, as indústrias vêm buscando formulações que sejam cada vez mais eficientes na fixação da cor e, assim, muitas tinturas de cabelo passaram a conter em sua composição corantes mais potentes, como os corantes azo. Contudo, eles têm sido citados como agentes de alto potencial carcinogênico, principalmente relacionados ao câncer de bexiga. Frente a essa preocupação, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos de três corantes presentes na formulação da tintura capilar preta (Arianor Cherry Red, Arianor Sienna Brown e Arianor Ebony) pelo teste da resazurina (citotoxicidade), ensaio do cometa (genotoxicidade), teste do micronúcleo (mutagenicidade) e pela avaliação dos níveis das enzimas antioxidantes (SOD e GSH) e de peroxidação lipídica (TBARS). Para os testes de geno e mutagenicidade, foram testadas, por um período de três horas, as concentrações utilizadas na formulação da tintura capilar e diluições dessas concentrações, sendo selecionadas três delas para cada corante, que exibiram viabilidade celular foi acima de 80 % (Cherry Red: 5,0, 2,5 e 1,25 mg/L; Sienna Brown: 100, 50 e 25 mg/L; e Ebony: 10, 7,5 e 5 mg/L). Todas as concentrações testadas para as três tinturas exibiram, pelo parâmetro intensidade da cauda, um aumento significativo do efeito genotóxico. Já no teste de mutagenicidade, foi observado aumento significativo de micronúcleo (MN) e brotos nucleares para todas as concentrações dos três corantes testados e de pontes nucleares para todas as concentrações, exceto a de 2,5 mg/L do corante Cherry Red. Na avaliação do estresse oxidativo, foi observado um aumento significativo da atividade da enzima SOD, apenas para a menor concentração do corante Cherry Red (1,25 mg/L). Em relação aos níveis de GSH, houve um aumento significativo para as concentrações de 5,0 e 1,25 mg/L do corante Cherry Red e para a concentração de 10 mg/L do corante Ebony. Foi observada também uma diminuição significativa desta enzima para os tratamentos realizados com as concentrações 50 e 25 mg/L do corante Sienna Brown. Já os níveis de peroxidação lipídica sofreu um significativo aumento induzido pela ação da concentração de 50 mg/L do corante Sienna Brown e das concentrações de 10 e 7,5 mg/L do corante Ebony. Pelos dados obtidos, podemos inferir que, mesmo em concentrações inferiores às indicadas para aplicação capilar, os três corantes apresentaram potencial citogenotóxico, pois induziram morte celular, formação de células micronucleadas, danos no DNA e estresse oxidativo nas células 5637. Esses efeitos podem estar associados, principalmente, à presença das ligações azo dos corantes usados na formulação das tinturas estudadas.

Palavras-Chave: Ensaio do cometa, estresse oxidativo, linhagem celular 5637, micronúcleo, teste da resazurina.

ABSTRACT

Customers, professionals in the cosmetology area and mainly the professionals of the area of health have a great concern in terms of the safe use of hair dyes. Due to the large marketing competition of the dyes, industries have searched for more efficient on the fixation of the color. To comply with the demand of the customers, many hair dyes began containing in their composition more potent compounds, like the azo dyes. Although azo dyes have been mentioned in the scientific literature like agents with high carcinogenic potential, many of them are related to bladder cancer. Facing these concerns, this study aimed to assess the effects of three dyes (Arianor Cherry Red, Arianor Sienna Brown e Arianor Ebony) present in the black hair dye formulation. Resazurin assay (cytotoxicity), comet assay (genotoxicity), micronucleus test (mutagenicity) and tests to evaluate the levels of SOD, GSH and TBARS were performed. By the resazurin assay, concentrations that presented cell viability over 80% were selected (Cherry Red: 5,0, 2,5 e 1,25 mg/L; Sienna Brown: 100, 50 e 25 mg/L; e Ebony: 10, 7.5 e 5 mg/L). This is needed to follow up the genotoxicity and mutagenicity tests. All the tested concentrations of the three dyes showed, by parameter tail intensity, a significant increase of the genotoxic effect. On the mutagenicity test, a significant increase of micronuclei (MN) and nuclear buds were observed for all concentrations of the three studies dyes. The same was observed for nuclear bridges with the exception the concentration of 2.5 mg/L of the dye Cherry Red. On the evaluation of the oxidative stress, a significant increase in SOD enzyme activity was observed on for the lowest concentration of the dye Cherry Red (1.25 mg/L). There was an increase in the cells exposed to the of 5.0 e 1.25 /L of the and the of 10 /L of the Ebony. The level of this enzyme decreased significantly in the cells exposed to concentrations of 50 and 25 mg/L of the dye Sienna Brown. Lipid peroxidation levels increased significantly in cells exposed to concentrations of 50 mg/L of Sienna Brown and 10 and 7,5 mg/L of Ebony. Thus, the obtained data shows that the three dyes possess cytotoxic, genotoxic and mutagenic potentials. This is possible to infer by the induction of cell death, micronucleated cells formation, DNA damage and oxidative stress on the bladder cells (cell line 5637). The dyes were able to cause these effects even in lower concentrations than the indicated to the capillary application. These effects are possibly related, mainly, to the presence of azo bonds of the used compounds on the formulation of the dyes.

Keywords: Cell line 5637, comet assay, micronucleus, oxidative stress, resazurin assay.

1. INTRODUÇÃO

Uma das formas mais antigas de ornamentação corporal é o tingimento dos cabelos (THOMPSON, 1957), que pode ser obtido por corantes naturais, vegetais e minerais. Algumas evidências mostram que o uso dessas substâncias teve início na Antiga Babilônia e na civilização Hindu a 2.500 anos A.C. (FORBES, 1964 *apud* ZHANG et al., 2008). Nos registros do Antigo Egito, correspondente a civilização datada de cerca de 3.000 anos A.C., existem claras evidências do uso de sais inorgânicos como formas de pigmentação, bem como de muitos corantes obtidos a partir de animais e vegetais (LOYSON, 2011). Ao longo de muitos anos, principalmente com as novas descobertas na área química, houve uma intensificação no uso de corantes e pigmentos nos mais variados ramos industriais, sendo que, na indústria de cosméticos, destaca-se a produção das tinturas capilares. Atualmente, o tingimento de cabelos é uma prática mundialmente comum. De acordo com a IARC (2010), cerca de 50 a 80 % das mulheres dos Estados Unidos, da União Europeia e do Japão têm seus cabelos tingidos. Dados mais recentes apontam que, no Brasil, cerca de 26 % da população faz uso de tinturas de cabelo, sendo que desses, 85 % são mulheres e 15 % homens (INMETRO, 2018). Como a demanda nessa área é muito grande, há o desafio das indústrias oferecerem, cada vez mais, produtos mais eficientes na fixação e duração da cor e grande variedade de tonalidades, além de produtos que sejam seguros tanto para o meio ambiente quanto para a saúde humana (MOREL; CHRISTIE, 2011). Porém, essa preocupação, quanto ao risco das tinturas para a saúde humana, não é recente.

No início do século passado, médicos e cientistas já demonstravam preocupações sobre os efeitos que os corantes poderiam desencadear nos organismos. Nott (1924) relata que seu paciente apresentava sintomas semelhantes a envenenamento, que o autor correlacionou com efeito de tintura capilar, uma vez que este paciente aplicava a tintura em seus clientes sem fazer uso de luvas.

Dentre os corantes capilares atualmente usados, uma grande parte deles possuem uma ou mais ligação azo ($R-N=N-R'$) (SUN et al., 2017), característica esta que tem sido relacionada à carcinogenicidade de bexiga (LOWRY et al., 1980; CERNIGLIA et al., 1986). Além disso, a incidência de câncer em pessoas que fazem uso de tinturas de cabelos ou em profissionais expostos a esses químicos já foi alvo de vários estudos epidemiológicos (NOHYNEK et al., 2004). Estudos de meta-

análise, realizados por Takkouche et al. (2009), relataram um risco ocupacional relativo desses profissionais ao câncer de bexiga.

Yahagi et al. (1975) citam que tanto os corantes azo como os seus metabólitos são capazes de modificar as bases do DNA e, conseqüentemente, promover mutações, sendo capazes, então, de iniciar eventos de carcinogenicidade. Os autores destacam ainda sobre a importância dos estudos de mutagenicidade realizados com os corantes azo, pois os resultados desses estudos podem elucidar possíveis mecanismos envolvidos com a carcinogenicidade desses corantes.

Em uma revisão feita por Anders (1980) sobre metabolismo de drogas, o autor traz que células renais apresentam atividade reduzida de azoredutase, quando comparada às células hepáticas, mas, mesmo assim, são capazes de produzir metabólitos. Estudos de Hildebrand et al. (1999) corroboram essa afirmação, pois os autores mostraram que culturas celulares de diferentes órgãos, inclusive as de rim, apresentam atividade azoredutase, comprovando que essa característica não é restrita de hepatócito. Esses autores ainda afirmam que, quando os compostos azo são reduzidos, eles geram aminas aromáticas, que são substâncias reconhecidamente carcinogênicas. Assim, quando o rim metaboliza esses compostos e há produção de metabólitos, esses ficam biodisponíveis na bexiga, podendo levar a indução de câncer nesse órgão.

As colorações de cabelo mais escuras possuem um risco maior de causarem câncer de bexiga urinária, quando comparadas com as colorações mais claras. Este efeito está relacionado à presença de uma maior concentração de substâncias intermediárias na composição dos pigmentos escuros (BOLT; GOLKA, 2007).

Ainda, não há relatos de efeitos tóxicos promovidos à bexiga pelos corantes Cherry Red, Sienna Brown e Ebony, porém, dados da literatura apontam que eles induziram citotoxicidade a outros órgãos. Considerando que a tintura de cabelo entra em contato com o couro cabeludo e, mesmo após a lavagem, ainda é possível encontrar resíduos da tinta dentro dos folículos (LADEMANN et al., 2008), Zaroni et al. (2014) investigaram a citotoxicidade do corante Basic Red 51 em queratinócitos humanos. Este estudo mostrou que esse corante, mesmo em baixas concentrações, foi capaz de, além de inibir a divisão celular após 48 horas de exposição, diminuir o potencial de recuperação das células, após uma hora de exposição, comprovando, assim, a sua citotoxicidade.

Tafurt-Cardona et al. (2015) avaliaram, por meio de ensaios realizados com a linhagem celular HepG2 (células de hepatocarcinoma humano), concentrações menores que as recomendadas pelo fabricante, dos corantes Basic Red 51 (BR51) e Basic Brown 17 (BB17), usados na formulação da tintura preta. Os autores observaram que, mesmo em baixas concentrações, os corantes foram altamente citotóxicos para as células, causando morte celular e diminuição da atividade da enzima succinato desidrogenase. Os dois corantes, quando avaliados isoladamente, também apresentaram efeitos genotóxicos, que os autores atribuíram às suas estruturas azo, uma vez que essas estruturas estão associadas à indução de efeitos mutagênicos e carcinogênicos.

Como os corantes que compõem as tinturas capilares podem ser citotóxicos e apresentarem potencialidade para indução de câncer, mesmo em baixas concentrações; pelos corantes azo serem considerados os mais agressivos na indução de carcinogênese; pelas tinturas de cabelos estarem correlacionadas com a indução de câncer de bexiga; e pelas citações de que as tinturas capilares escuras apresentam maior riscos carcinogênicos, esse estudo teve como objetivo avaliar a citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade de cada corante envolvido na formulação da tintura preta (Arianor Cherry Red, Arianor Sienna Brown e Arianor Ebony), sobre células de bexiga, de forma a se estimar os reais efeitos dos mesmos sobre o material genético. Os resultados obtidos neste estudo poderão contribuir com informações importantes e consistentes sobre a segurança de uso de tinturas capilares, tanto pelos consumidores que estão diretamente expostos a elas, como também para os profissionais da área, que se expõe de forma indireta, mas constante, a esses produtos.

2. METODOLOGIA

2.1. Bioensaios com células 5637 (células cancerosas de bexiga humana)

A linhagem celular 5637 foi cultivada em 15 mL de meio DMEM (Meio de Eagle modificado por Dulbecco – Gibco/Cultilab), 2.200 mg/L de NaHCO₃, 3.500 mg/L de glicose e 0,1% de solução de antibiótico-antimicótico (penicilina 10.000 U.I./mL / estreptomicina 10 mg/mL, Cultilab), suplementados com 10% de soro bovino fetal. Os frascos foram mantidos à temperatura controlada (37 °C) em estufa à 5 % de CO₂.

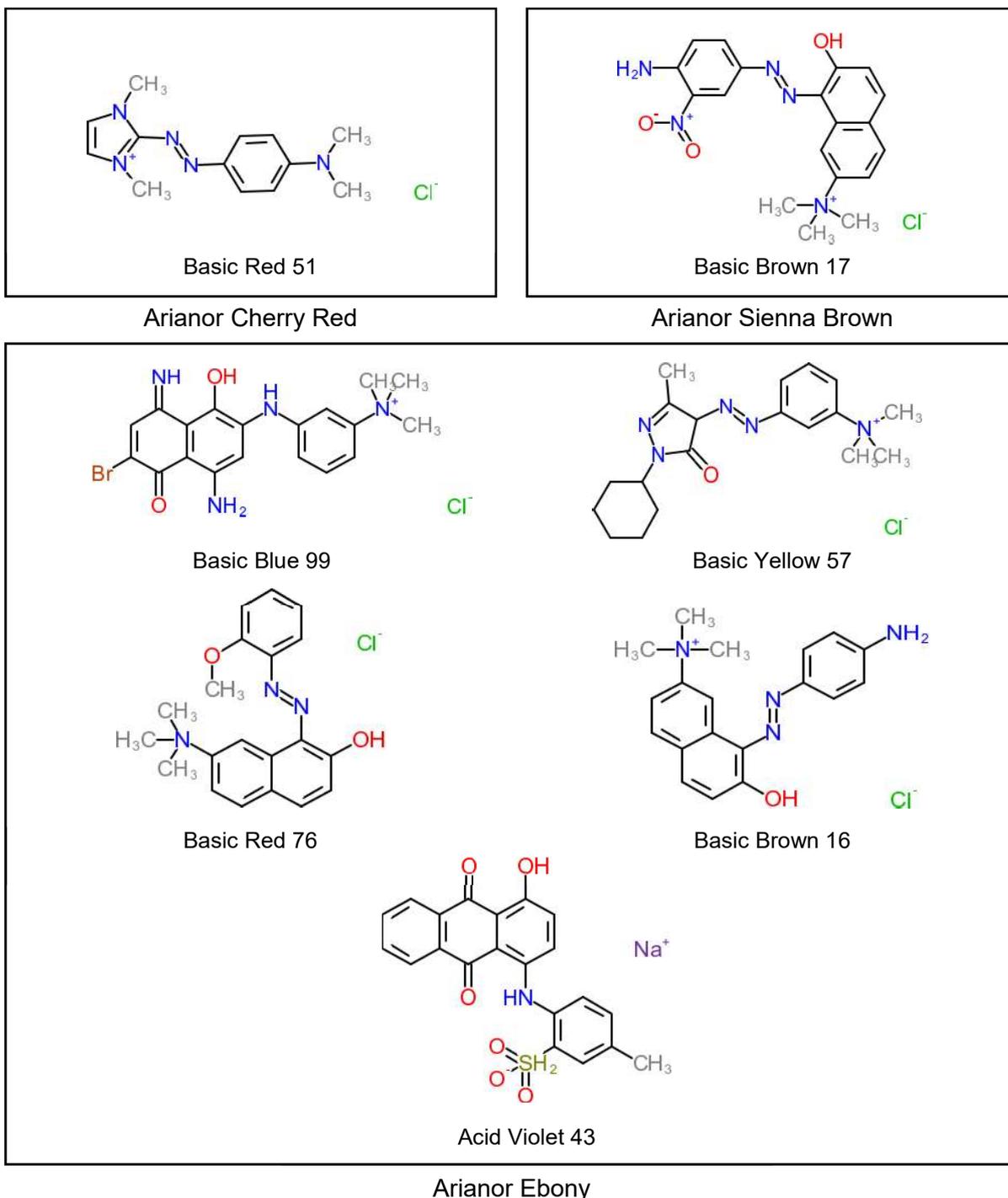
2.2. Material químico testado

Os corantes usados nesse estudo foram: o Arianor Cherry Red (composto pelo azo corante Basic Red 51 - CAS no. 77061-58-6); Arianor Sienna Brown (composto pelo azo corante Basic Brown 17 - CAS no. 68391-32-2); e o Arianor Ebony, que é uma mistura de cinco diferentes corantes (Basic Blue 99 - CAS no. 68123-13-7; Basic Brown 16 - CAS No. 26381-41-9; Basic Yellow 57 - CAS No. 68391-31-1; Basic Red 76 - CAS no. 68391-30-0; e Acid Violet 43 - CAS no. 4430-18-6). Todos os corantes utilizados (formulações em pó) foram obtidos junto à empresa Sensient Cosmetic Technologies Brasil (São Paulo-SP).

Para a realização dos ensaios com os corantes que fazem parte da tintura preta, primeiramente testamos as concentrações que são usadas na formulação desta tintura (Cherry Red: 20 mg/L; Sienna Brown: 400 mg/L; e Ebony: 3200 mg/L) e algumas diluições das mesmas. Nos ensaios de toxicidade com Resazurina, foram testadas as seguintes concentrações:

- Cherry Red: 20,000 mg/L; 15,000 mg/L; 10,000 mg/L; 7,500 mg/L; 6,250 mg/L; 5,000 mg/L; 3,750 mg/L; 2,500 mg/L; 1,875 mg/L; 1,250 mg/L.
- Sienna Brown: 400,00 mg/L; 300,00 mg/L; 200,00 mg/L; 150,00 mg/L; 100,00 mg/L; 75,00 mg/L; 50 mg/L; 37,50 mg/L; 25,00 mg/L; 18,75 mg/L.
- Ebony: 3200,00 mg/L; 2400,00 mg/L; 1600,00 mg/L; 1200,00 mg/L; 800,00 mg/L; 600,00 mg/L; 320,00 mg/L; 240,00 mg/L; 160,00 mg/L; 120,00 mg/L; 80,00 mg/L; 60,00 mg/L; 40,00 mg/L; 30,00 mg/L; 20,00 mg/L; 15,00 mg/L; 10,00 mg/L; 8,75 mg/L; 7,50 mg/L; 6,25 mg/L; 5,00 mg/L; 3,75 mg/L.

O teste controle positivo (CP) foi realizado com Triton X-100, diluído em meio de cultura sem soro, na concentração de 1% e o teste controle negativo, apenas meio de cultura sem soro.

Figura 1: Fórmula estrutural dos corantes avaliados neste estudo.

Para os ensaios de genotoxicidade (ensaio do Cometa) e de mutagenicidade (teste do Micronúcleo - MN), foram testadas três concentrações escolhidas a partir do teste de citotoxicidade e que obtiveram viabilidade celular acima de 80 % (Tabela 1):

- Cherry Red: 1,25 mg/L, 2,50 mg/L e 5,00 mg/L.
- Sienna Brown: 25 mg/L, 50 mg/L e 100 mg/L.
- Ebony: 5,0 mg/L, 7,5 mg/L e 10,0 mg/L.

O CP, para os ensaios do cometa e do MN, foi realizado com uma solução aquosa do composto Metil Metanossulfonato (MMS) à $1,2 \times 10^{-2}$ M, e, como controle negativo, meio de cultura.

2.3. Ensaio da resazurina

A exposição das células às concentrações sugeridas anteriormente foi feita em placas de 96 poços nas quais foram semeadas $2,34 \times 10^4$ células da linhagem celular 5637 (células cancerosas de bexiga humana) por poço, de acordo com o protocolo descrito por RISS et al. (2016) com algumas modificações. O controle branco foi incluído na análise. Depois de um período de 24 horas de incubação em estufa de CO₂ (5 % e a 37 °C), o meio de cada poço foi substituído por um meio de cultura novo (sem SBF), a fim de expor as células aos tratamentos.

Tabela 1: Concentrações dos corantes avaliados neste estudo e porcentagem correspondente ao produto comercial.

Corante	Concentrações	% do corante em relação à concentração comercial
Cherry Red	1,25 mg/L	6.25%
	2,5 mg/L	12.50%
	5,0 mg/L	25.00%
Sienna Brown	25 mg/L	6.25%
	50 mg/L	12.50%
	100 mg/L	25.00%
Ebony	5,0 mg/L	0.16%
	7,5 mg/L	0.23%
	10 mg/L	0.31%

Os tratamentos permaneceram nos poços por um período de três horas e, posteriormente, foram retirados e adicionou-se solução de resazurina 44 µM (CAS No. 62758-13-8) diluída em meio de cultura sem soro. A placa permaneceu incubada por quatro horas e após esse período, as placas foram lidas no leitor de microplaca (Aparelho Infinite® 200 Pro - Tecan), comprimento de onda de excitação 560 nm e de emissão 590 nm.

2.4. Ensaio do cometa

O ensaio do cometa foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Tice et al. (2000) com algumas modificações. Foram semeadas 1×10^5 células por poço em placas de seis poços. Após a exposição, as células foram coletas, centrifugadas e o pellet foi ressuspendido.

Para o prosseguimento do ensaio do cometa, foi avaliada a viabilidade celular das concentrações pré-estabelecidas no ensaio de resazurina pelo método do Azul de Tripán. Após a confirmação de que a viabilidade celular estava acima de 80 %, deu-se prosseguimento ao ensaio.

As lâminas previamente cobertas com agarose comum receberam 20 μL de suspensão celular que foi misturada com 120 μL de agarose de baixo ponto de fusão (37 °C). As lâminas foram cobertas com lamínulas e resfriadas a uma temperatura de 6 °C em geladeira, por 20 minutos. Em seguida, as lamínulas foram extraídas e as lâminas submetidas a solução de lise (1 % de Triton X-100, 10 % de DMSO e 89 % de solução de lise estoque – NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM com pH ajustado para 10, com auxílio de solução aquosa de NaCl 5M), onde permaneceram por, no mínimo, 1 hora a 6 °C. Após este procedimento, as lâminas foram colocadas em uma cuba de eletroforese e cobertas com solução tampão (NaOH 300mM, EDTA 1mM, pH < 13), por 20 min, para a desnaturação do DNA. A corrida de eletroforese foi realizada por 20 minutos a uma corrente de 40 V e 300 mA (~0,8 V/cm). Em seguida, as lâminas foram neutralizadas com tampão (0,4 M tris-HCl, pH 7,5), e fixadas com etanol absoluto. As lâminas, após secas, foram guardadas à 4 °C até o momento da análise.

Para realizar a análise, as lâminas foram coradas com 50 μL de solução de GelRed®, cobertas com lamínula e, imediatamente, analisadas em microscópio de fluorescência Leica DM 4000B (filtro de excitação de 515-560 nm e filtro de barreira de 590 nm), em um aumento de 400 vezes. Foram analisados 50 nucleóides por lâmina, não sobrepostos e escolhidos aleatoriamente, totalizando 300 nucleóides por tratamento (COLLINS, 2004). A dimensão dos danos foi avaliada pelo programa Comet Assay IV (INSTEM® – Filadélfia, EUA).

2.5. Ensaio do micronúcleo com bloqueio da citocinese

Para o ensaio do MN, foram semeadas, em cada frasco de cultura de 25 cm², 1×10^6 células. Ao término da exposição aos tratamentos (três horas), o meio de

cultura foi substituído por um novo meio, onde foram adicionados 50 µL de citocalasina B (300 µg/mL), por um período de 24 horas, para a obtenção de células binucleadas. Após a colheita, as células foram tratadas com solução hipotônica (KCl 0,075 M) e duas gotas de formol 40 %, sendo posteriormente centrifugadas a 1500 rpm por cinco minutos. Após o descarte do sobrenadante, foi adicionada ao pellet a solução fixadora de Carnoy (3 partes de etanol absoluto: 1 parte de ácido acético glacial).

A suspensão celular foi gotejada sobre lâminas, previamente limpas para remoção de gordura, contendo um filme de água gelada e, depois de secas a temperatura ambiente, as lâminas foram coradas com reativo de Schiff e contra coradas com Giemsa 5 % por cinco minutos. Foram analisadas 2.000 células binucleadas, por réplica, totalizando 6.000 células por tratamento. Dessas, foram calculadas a quantidade de células contendo micronúcleos, brotos e pontes nucleoplasmáticas. Também foram analisadas 500 células adicionais por lâmina, para serem usadas na obtenção do Índice Citotóxico de Divisão Nuclear (ICDN), onde foram contabilizadas células com um dois, três e quatro núcleos e células em processo de apoptose e necrose, cujos valores obtidos foram aplicados na fórmula apresentada a seguir, proposta por Fenech (2000):

$$ICDN = \frac{(Ap + Nec + 1N + (2 \times 2N) + (3 \times 3N) + (4 \times 4N))}{500}$$

onde:

ICDN = Índice Citotóxico de Divisão Nuclear;

Ap = células apoptóticas;

Nec = células necróticas;

1- 4N = células viáveis com 1 a 4 núcleos.

2.6. Avaliação da atividade das enzimas antioxidantes

Para os ensaios de avaliação de estresse oxidativo, foram semeadas 1×10^6 células em cada frasco de cultura de 25 cm², contendo meio DMEM suplementado com SBF, onde permaneceram, por um período de 48 horas, em estabilização. Na sequência. Após três horas de tratamento com as concentrações dos corantes, as células foram lavadas com PBS-EDTA gelado, retiradas dos frascos com o auxílio de

scraper e transferidas para tubos criogênicos, que foram armazenados em nitrogênio líquido para posterior análise.

Para o desenvolvimento dos ensaios, as amostras foram descongeladas em gelo e, posteriormente, sonicadas duas vezes por 10 segundos cada, no aparelho QSonica Sonicators (modelo Q55), amplitude 20 kHz. A seguir, a solução de cada tubo criogênico foi transferida para microtubos, os quais foram dispostos em centrífuga refrigerada (Centrifuge 5430R – eppendorf®) e centrifugados, por 10 minutos, a 10.000 rpm (4 °C). O sobrenadante foi utilizado nos ensaios de estresse oxidativo.

2.6.1. Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

A atividade da enzima superóxido dismutase foi avaliada de acordo com o método proposto por Marklund e Marklund (1974), com algumas modificações. Em uma placa de 96 poços, foram misturados, em cada poço, 200 µL de tampão Tris-HCl 25 mM (EDTA 20mM, pH 8,5), 20 µL do sobrenadante obtido e 20 µL de pirogalol 15 mM. A placa foi incubada à 25 °C, por 10 minutos, e a reação foi interrompida pela adição de 20 µL de HCl 1N. A atividade da SOD foi medida em leitor de microplaca (Aparelho Infinite® 200 Pro – Tecan), em comprimento de onda de 440 nm, expressa em unidade de absorvância/minuto.

2.6.2. Avaliação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH)

Os níveis de GSH dos tratamentos foram avaliados por meio do método descrito por Habig et al. (1974), com algumas modificações. Inicialmente, as proteínas das amostras, foram precipitadas misturando, em microtubos, 200 µL da amostra com 200 µL TCA (ácido tricloroacético) a 20 %. Essa solução permaneceu em repouso por cinco minutos. Decorrido esse tempo, os microtubos foram centrifugados em centrífuga refrigerada, por cinco minutos à 4000 rpm e a 4 °C. Em uma placa de 96 poços, foram adicionados, por poço 100 µL do sobrenadante 100 µL de tampão (fosfato 0,1 M, EDTA 1 µM e pH 8,0) e 20 µL de DTNB 10 mM (Reagente de Ellman). A absorvância foi monitorada em leitor de microplaca (Aparelho Infinite® 200 Pro – Tecan), em comprimento de onda 410 nm, em dois momentos distintos (logo após a adição do DTNB e após 15 minutos da exposição).

2.6.3. Determinação da peroxidação lipídica (TBARS)

Os níveis de peroxidação lipídica foram determinados de acordo com o método descrito por Buege e Aust (1978), com algumas adaptações. Foram adicionados em tubos de ensaio, 700 µL da amostra, 1 mL de TBA (ácido tiobarbitúrico à 1 % diluído em solução de NaOH 50 mM), 10 µL de NaOH 10 M e 500 µL de solução de H₃PO₄ a 20 %. Essa mistura foi colocada em banho-maria à 100 °C por 15 minutos. Decorrido esse tempo, foi adicionado 1 ml de N-Butanol, os tubos de ensaio foram agitados para homogeneização da mistura. Logo em seguida, os tubos foram centrifugados à 3400 rpm, por cinco minutos, para separação da fase orgânica, e 250 µL do sobrenadante foram colocados em cada um dos poços das placas de Elisa. A placa foi lida em leitor de microplaca (Aparelho Infinite® 200 Pro - Tecan) em comprimento de onda 535 nm.

2.7. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram feitas através do programa estatístico IBM SPSS Statistics Data Editor, versão 22, desenvolvido pela empresa IBM, North Castle – Nova Iorque (EUA). Todos os resultados passaram inicialmente pelo teste de normalidade e, de acordo com o resultado obtido nesse teste, foi escolhido o teste estatístico apropriado.

Para a realização da análise estatística dos ensaios de estresse oxidativo, foi necessário ajustar os dados obtidos nos ensaios pelo teste de Grubbs que retira os valores considerados extremos do conjunto observado. O teste de Grubbs foi realizado pelo software GraphPad, desenvolvido por GraphPad Software Inc., La Jolla – Califórnia, EUA, com nível de significância igual à 0,05.

3. RESULTADOS

3.1. Teste da resazurina

Nossos resultados mostraram que muitas das concentrações testadas foram citotóxicas para as células 5637 (linhagem celular de bexiga humana) (Figura 2).

Figura 2: Viabilidade celular (%) obtida no teste da Resazurina.



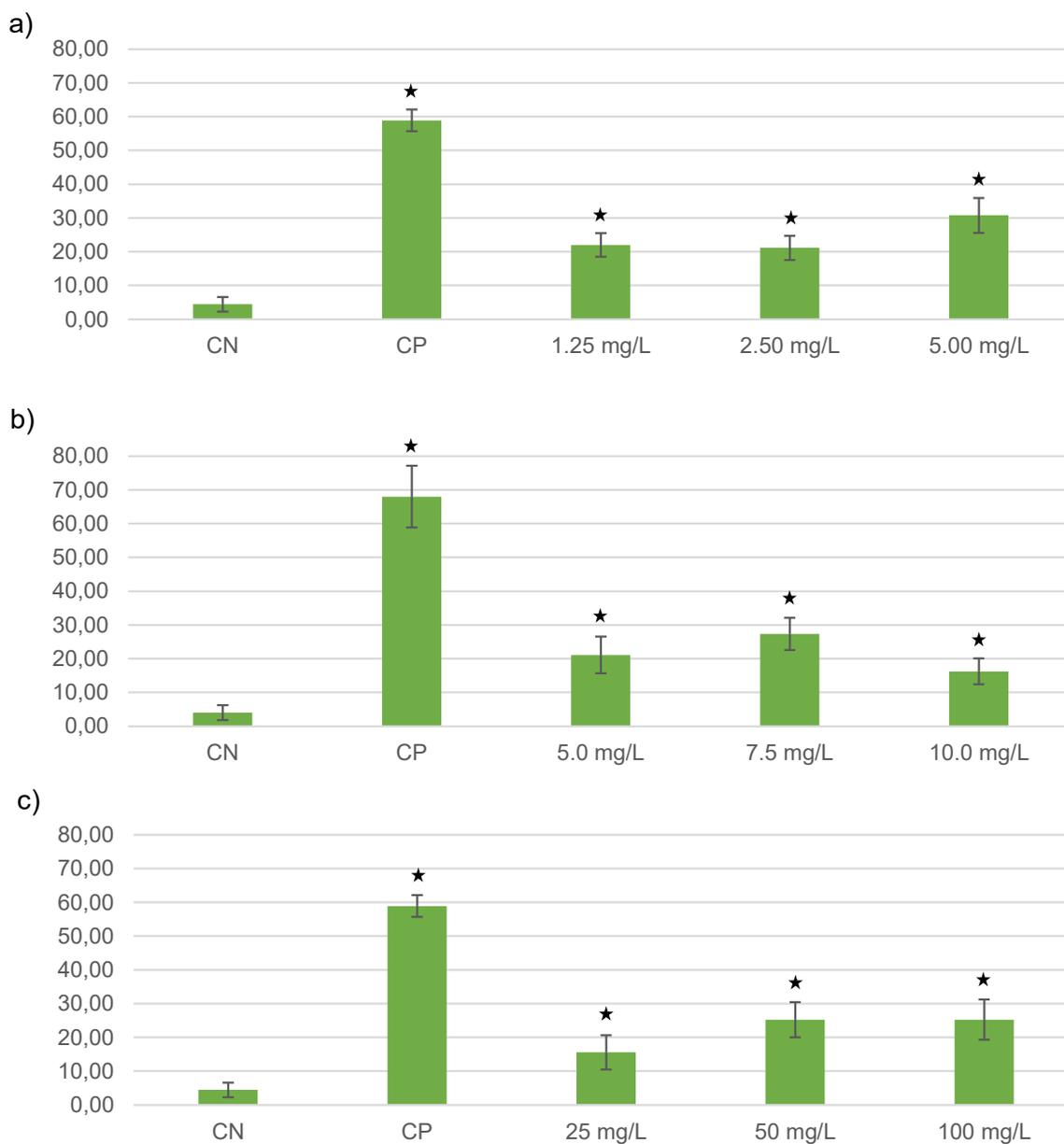
Viabilidades celulares observadas para as tinturas (VCT): a) Cherry Red; b) Sienna Brown; c) Ebony.

3.2. Ensaio do cometa

Todos os tratamentos realizados neste ensaio apresentaram viabilidade celular superior a 80 %. A análise dos resultados foi feita com base no parâmetro intensidade da cauda (Figura 3)

Com os dados obtidos no ensaio do cometa, foi possível observar que todas as concentrações dos corantes testados induziram efeitos genotóxicos, mostrando que os corantes causam danos ao material genético das células de bexiga, mesmo em concentrações inferiores às usadas na formulação comercial da tintura preta.

Figura 3: Intensidade de cauda observada em células de linhagem de bexiga, pelo ensaio do cometa, após três horas de exposição às tinturas Cherry Red, Sienna Brown e Ebony.



CN = controle negativo. * = Valores estatisticamente significativos em relação ao CN (ANOVA/Dunnet, $p < 0,05$). Valores obtidos da exposição às tinturas: a) Cherry Red; b) Sienna Brown; c) Ebony.

3.3. Ensaio do micronúcleo com bloqueio da citocinese

Os resultados obtidos no teste do MN (Tabela 2) indicam que todas as concentrações testadas, para os três corantes estudados, têm potencial mutagênico para as células de bexiga. Essa evidência tem por base a alta frequência de MNs nas células tratadas com os corantes, quando comparados com os resultados do CN. Foi observado também, que os corantes induziram a formação de múltiplos MNs em uma mesma célula, o que reforça o potencial mutagênico já descrito, neste trabalho, para esses compostos. Podemos observar essas alterações na figura 4.

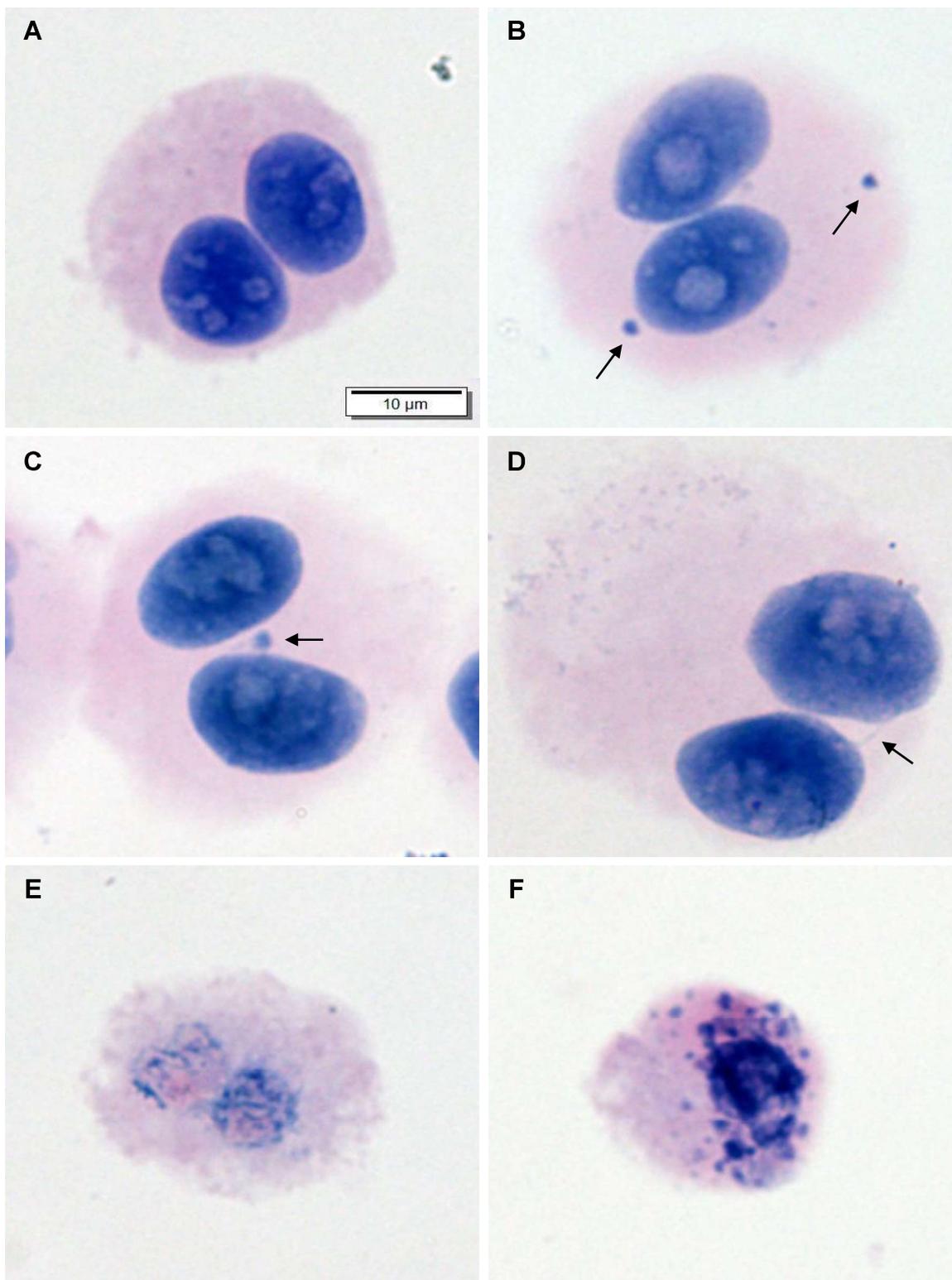
As células expostas aos três corantes tiveram seus ICDNs significativamente reduzidos, em comparação ao CN. A redução observada para o corante Sienna Brown foi concentração dependente (menor concentração, menor redução). Esses dados indicam que os corantes, além de interferirem na cinética da divisão nuclear, efeito este comprovado pelo aumento do número de células em processo de morte celular, promovem alterações estruturais no material genético.

Tabela 2: Resultados obtidos no teste do micronúcleo, realizado com a linhagem celular 5637 (bexiga humana), após três horas de exposição a três concentrações dos corantes Cherry Red, Sienna Brown e Ebony.

Tratamentos	Ponte		Broto		MN		Quantidade de MN / cél				ICDN
	Média ± DP		Média ± DP		Média ± DP		1	2	3	4+	
Controle Negativo	1,50 ± 0,84		9,00 ± 1,41		19,00 ± 2,10		18,0	1,0	0,0	0,0	1,91
Controle Positivo	11,17 ± 2,79 *		32,00 ± 5,25 *		88,50 ± 4,72 *		71,3 *	14,0 *	2,5 *	0,7	1,73 *
Cherry Red	1,25 mg/L	7,33 ± 2,50 *	40,67 ± 3,72 *		67,00 ± 3,35 *		54,0 *	10,2 *	2,3 *	0,5	1,67 *
	2,5 mg/L	3,83 ± 1,47	37,50 ± 5,24 *		78,67 ± 5,32 *		67,0 *	8,7 *	2,5 *	0,5	1,68 *
	5,0 mg/L	9,17 ± 1,83 *	43,33 ± 5,61 *		87,83 ± 5,34 *		72,3 *	11,5 *	3,5 *	0,5	1,60 *
Sienna Brown	25 mg/L	8,17 ± 2,14 *	36,83 ± 2,23 *		68,50 ± 4,32 *		54,3 *	9,0 *	4,7 *	0,5	1,60 *
	50 mg/L	5,83 ± 2,14 *	35,33 ± 6,50 *		69,67 ± 5,16 *		61,7 *	6,7 *	1,2	0,2	1,57 *
	100 mg/L	9,17 ± 3,54 *	38,83 ± 4,36 *		90,50 ± 9,44 *		78,9 *	9,5 *	1,2	0,0	1,48 *
Ebony	5,0 mg/L	10,83 ± 2,56 *	32,17 ± 2,14 *		79,83 ± 6,77 *		64,5 *	11,2 *	2,8 *	1,3 *	1,67 *
	7,5 mg/L	10,33 ± 2,66 *	34,00 ± 1,90 *		93,18 ± 2,93 *		77,3 *	10,7 *	3,8 *	1,3 *	1,66 *
	10,0 mg/L	10,17 ± 2,04 *	41,83 ± 2,32 *		97,67 ± 4,84 *		79,7 *	13,7 *	3,3 *	1,0	1,70 *

DP = Desvio Padrão; ICDN = Índice Citotóxico de Divisão Nuclear; * = valores estatisticamente significativos em relação ao controle negativo (ANOVA/Dunnet, p<0,05).

Figura 4: Células da linhagem de bexiga humana expostas por três horas às tinturas capilares. A. Célula binucleada normal; B. Célula binucleada com dois micronúcleos; C. Célula binucleada com broto; D. Célula binucleada com ponte; E. Célula em processo de necrose; F. Célula em processo de apoptose.



3.4. Avaliação da atividade das enzimas antioxidantes

Os resultados obtidos na avaliação da atividade da SOD, nos níveis de GSH e de peroxidação lipídica (TBARS) estão apresentados na tabela 3.

Por estes ensaios, foi observado um aumento significativo da atividade da SOD, apenas para a menor concentração do corante Cherry Red (1,25 mg/L). Com relação aos níveis GSH, houve um aumento significativo deste índice para as concentrações de 5,0 e 1,25 mg/L do corante Cherry Red e para a concentração de 10 mg/L do corante Ebony. Para o corante Sienna Brown, foi observada uma diminuição significativa dos níveis dessa enzima para as concentrações de 50 e 25 mg/L. Foi observado um aumento significativo dos níveis de TBARS para a concentração de 50 mg/L do corante Sienna Brown e para as concentrações de 10 e 7,5 mg/L do corante Ebony (Tabela3).

Tabela 3: Resultados obtidos nos ensaios de estresse oxidativos, realizados com a linhagem celular 5637 (bexiga humana), após três horas de exposição a três concentrações dos corantes Cherry Red, Sienna Brown e Ebony.

Tratamentos	SOD ± DP	GSH ± DP (mmol/L)	TBARS ± DP (mol/Lx10 ⁻⁹)
Cherry Red			
Cont. Neg.	0.260 ± 0.006	43.88 ± 10.29	376.7 ± 28.1
1,25 mg/L	0.295 ± 0.025 *	145.62 ± 40.22 *	439.6 ± 50.6
2,50 mg/L	0.274 ± 0.009	60.72 ± 12.73	391.9 ± 67.4
5,00 mg/L	0.238 ± 0.039	77.40 ± 19.06 *	447.1 ± 29.1
Sienna Brown			
Cont. Neg.	0.260 ± 0.006	43.88 ± 10.29	376.7 ± 28.1
25 mg/L	0.287 ± 0.023	18.72 ± 7.59 *	441.4 ± 52.2
50 mg/L	0.283 ± 0.017	16.92 ± 6.57 *	598.5 ± 44.0 *
100 mg/L	0.279 ± 0.014	33.13 ± 14.28	418.8 ± 42.5
Ebony			
Cont. Neg.	0.193 ± 0.014	14.17 ± 7.31	341.9 ± 7.4
5,0 mg/L	0.190 ± 0.022	16.09 ± 5.46	329.9 ± 9.1
7,5 mg/L	0.199 ± 0.034	18.37 ± 4.14	392.3 ± 35.7 *
10,0 mg/L	0.197 ± 0.014	27.20 ± 9.44 *	379.4 ± 35.7 *

Cont. Neg. = Controle Negativo; DP = Desvio Padrão; SOD= atividade da enzima superóxido dismutase; GSH= avaliação dos níveis de glutatona reduzida; TBARS= determinação da peroxidação lipídica; * = valores estatisticamente significativos em relação ao controle negativo (ANOVA/Dunnett, p<0,05).

4. DISCUSSÃO

Os estudos realizados por Lind et al. (2017) mostraram que, durante as aplicações das tinturas capilares, os cabelereiros se expõem aos corantes dessas tinturas, nas mais diferentes etapas do processo (preparo e aplicação da mistura, e, até mesmo, durante o corte dos cabelos). Essa exposição pode aumentar os níveis de adutos de hemoglobina, como o-toluidina, m-toluidina, p-toluidina, entre os cabelereiros, compostos esses altamente reativos e detrimental para os sistemas biológicos (GONÇALVES et al., 2014; JOHANSSON et al., 2015). Essa exposição pode estar relacionada à baixa preocupação de proteção pessoal dos cabelereiros, que, sistematicamente, não fazem uso de Equipamentos de Proteção Individual (EPI), durante os processos de tingimento (ORESKOV et al., 2015). Assim, existe a possibilidade de que esses corantes sejam absorvidos pela pele e atinjam órgãos como a bexiga.

As concentrações inicialmente testadas nos ensaios realizados neste estudo foram baseadas nas concentrações usadas na formulação da tintura preta (Cherry Red: 20 mg/L; Sienna Brown: 400 mg/L; e Ebony: 3200 mg/L) e suas respectivas diluições. Os primeiros testes mostram que muitas das concentrações foram citotóxicas para as células de bexiga, como mostra a figura 2. Assim, foram usadas nos testes seguintes (ensaios do cometa e MN e de estresse oxidativo), concentrações bem menores do que as iniciais (Cherry Red: 5,0 mg/L, 2,5 mg/L, ,25 mg/L; Sienna Brown: 100 mg/L, 50 mg/L, 25 mg/L; Ebony: 10 mg/L, 7,5 mg/L, 5,0 mg/L). Esse efeito citotóxico também foi observado em nos estudos realizados por Zaroni et al. (2014), em queratinócitos humanos. Os autores observaram que, após uma hora de exposição ao Basic Red 51, o corante apresentou potencialidade de induzir danos persistentes, responsáveis pelo desencadeamento de processo de apoptose. Nesse mesmo estudo, foi observado que esse efeito era dose dependente.

Baseado na revisão de Fenech (2000), podemos sugerir que as células em processo de morte celular observadas neste estudo, foram tanto do tipo apoptótico como necrótico. Sugerimos que essas mortes celulares podem ser devido a ação de metabólitos formados pós clivagem dos corantes. Isso pode ser explicado pelas afirmações de Robinson et al. (2001), descrita em seus estudos com corantes têxteis, que os corantes podem ser quebrados em moléculas menores, que

atravessam mais facilmente a membrana celular e, por serem mais tóxicos que o produto original, levam a célula à morte. Essa afirmação é reforçada por Chung (2016), que também afirmou que os azo corantes podem sofrer clivagem e formar aminas aromáticas. Como pode ser observado na Figura 1, a maioria dos corantes testados neste estudo possuem grupo azo ($R-N=N-R'$), cujos radicais podem ser de grupos fenil ou naftil (VENTURA-CAMARGO; MARIN-MORALES, 2013).

Nossos dados de citotoxicidade são corroborados por Ferraz et al. (2011), que avaliou em células HepG2, diferentes concentrações do corante azo Disperse Orange 1. Esses autores também observaram que o corante azo induziu processo de morte celular por apoptose. Efeitos citotóxicos semelhantes também foram registrados por Maiti et al. (2016), quando estudaram, em diferentes organismos (*E. coli*, células sanguíneas brancas e células sanguíneas vermelhas), as formulações comercialmente usadas em três tinturas capilares. Os autores verificaram que, quanto maior a concentração da tintura, menor a viabilidade celular e que, para *E. coli*, a morte celular foi devido a danos na membrana das células, enquanto que para os eritrócitos, a causa morte foi por ruptura celular.

Os ensaios para avaliação do Índice Citotóxico de Divisão Nuclear (ICDN) mostraram que os corantes estudados promovem uma redução desse índice nas células 5637, o que também reforça a característica citotóxica dos mesmos. A diminuição deste índice pode ter ocorrido pela indução de morte celular, uma vez que foi observado um aumento significativo de células em processo de necrose e apoptose. Nossos resultados são corroborados pelos estudos de Ventura-Camargo et al. (2011), realizados com o corante têxtil BDCP (Black Dye Commercial Product), que é composto por três corantes azos (Disperse Blue 373, Disperse Violet 93 e Disperse Orange 37). Os autores concluíram que essa mistura de corantes azo do BDCP promoveu morte celular por necrose e apoptose em células meristemáticas de *Allium cepa*. Gao et al. (2011), também observaram indução de morte celular por apoptose em células cerebrais de ratos expostos ao azo corante tartrazina.

Os resultados do presente estudo para o ensaio do cometa, mostram que todas as concentrações foram significativamente genotóxicas para as células 5637, provavelmente devido a presença de grupos azo nos corantes Cherry Red, Sienna Brown e em três dos cinco corantes que compõem o corante Ebony.

Estudos realizados por Ooka et al. (2016) com três diferentes corantes azo (Sudan I, Orange II e Orange G) mostraram que todos eles foram citotóxicos para a linhagem de células de galinha DT40, mas o Sudan I foi também capaz de causar quebras de fita dupla no DNA, por ter uma ação DNA-intercalante. Esse mesmo estudo sugere que a estrutura planar do Sudan I pode ser a responsável pela quebra do DNA, por causar um colapso na forquilha de replicação.

Os resultados de genotoxicidade do presente estudo são corroborados por Tafurt-Cardona et al. (2015), que expuseram células da linhagem HepG2 a diferentes concentrações dos corantes Cherry Red e Sienna Brown. Os autores observaram efeitos genotóxicos para concentrações menores de ambos os corantes, que eles atribuíram ser devido a efeitos de moléculas menores formadas após a metabolização, que possuem atividade ainda mais tóxica para as células.

Foi observado pelo ensaio do MN um aumento significativo na incidência de brotos e pontes nucleares, o que reforça o efeito genotóxico potencial dos três corantes sobre as células de bexiga.

Os corantes são capazes de interagir com a dupla fita de DNA, por intercalação, devido à presença de grupos azos nas suas moléculas, resultando em danos e mudanças na conformação desta biomolécula (ULIANA et al., 2013, OOKA et al., 2016). Uliana et al. (2013) observaram essa mudança em células de timo de bezerro expostas aos corantes azo Disperse Orange 1 e Disperse Red 1. Osugi et al. (2009) investigaram os mesmos corantes e comprovaram, por meio do teste de Ames, que ambos foram capazes de causar mutações em *Salmonella typhimurium*, efeito este que os autores atribuíram à presença dos grupos azo destes corantes.

Os resultados do presente estudo, relacionado ao aumento da incidência de micronúcleo nas células 5637, além do aumento de quebras no DNA observado no ensaio do cometa, são similares com os reportados por Tsuboy et al. (2007), que verificaram efeito semelhante para o corante CI Disperse Blue 291, em células HepG2. Os autores sugeriram que os danos observados foram devido a efeitos clastogênicos deste corante. Apesar de serem células diferentes, é possível supor que os corantes Cherry Red, Sienna Brown e Ebony possuem os mesmos mecanismos de ação nas células, uma vez que são azos corantes e induziram os mesmos danos no DNA das células.

Sarikaya *et al.* (2012) também verificaram os efeitos de alguns corantes alimentícios em larvas de *Drosophila melanogaster*, onde um deles, pertence ao grupo azo (Acid Red 27). Os autores observaram que o azo corante avaliado induziu mutações no organismo testado, reforçando o efeito danoso que esse grupo químico tem sobre o material genético. Chequer *et al.* (2015) observaram que houve um aumento na frequência de MN, quando linfócitos humanos foram expostos aos corantes Disperse Red 13, indicando que esses corantes têm ação mutagênica e um preditivo de carcinogenicidade. Isto porque, de acordo com Bonassi *et al.* (2003), a presença de MN em linfócitos humanos é um indicativo de efeito carcinogênico. Esse mesmo corante e o Disperse Red 1, apresentaram resposta positiva para o teste de Ames, comprovando a mutagenicidade dos mesmos (FERRAZ *et al.*, 2010). A enzima superóxido dismutase (SOD) catalisa uma reação redox que envolve ânions superóxido (O_2^-), resultando na formação de oxigênio molecular (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Assim, quanto maior a atividade desta enzima, maior é a quantidade de ânions superóxido na célula. Pelos resultados obtidos neste estudo, apenas a menor concentração do corante Cherry Red mostrou um aumento significativo na atividade da enzima SOD. Esses resultados estão de acordo com os registrados por Fouad (2015), cujo estudo constatou aumento significativo da atividade da SOD em células de sangue e de fígado de ratos Wistar, expostos ao azo corante amarelo crepúsculo (Orange Yellow S).

Quando um agente oxidante é inativado, ocorre tanto a produção do tripeptídeo glutationa (GSSG) como a diminuição do tripeptídeo glutationa reduzida (GSH) (SHAN *et al.*, 1990; GILBERT; MC LEAN, 1990; FERREIRA; MATSUBARA, 1997). A GSH é um tripeptídeo antioxidante que protege as células contra o estresse oxidativo. Esse agente transforma os xenobióticos e ajuda na eliminação de seus compostos resultantes desta biotransformação (JOSEPHY; MANNERVIK, 2006). Nesta transformação esta molécula é oxidada pelos agentes oxidativos estressores, transformando em GSSG. O desequilíbrio estabelecido entre os níveis de GSSG e GSH induz a ação da enzima glutationa redutase sobre a GSSG, reduzindo esse tripeptídeo a GSH, normalizando o sistema protetor (HUBER *et al.*, 2008). Nesse estudo foi observado que a maior (5 mg/L) e a menor (1,25 mg/L) concentração do corante Cherry Red e a maior concentração (10 mg/L) do corante Ebony induziram aumento significativo nos níveis da GSH.

Foi observado, porém, efeito inverso para maior concentração (100 mg/L) e para a concentração intermediária (50 mg/L) do corante Sienna Brown. Neste caso, os níveis de GSH foram significativamente menores que os encontrados no CN, o que indica que houve um rápido esgotamento desta enzima, pela sua utilização na metabolização do corante, sem que houvesse a devida reposição dela pela redução da GSSG, o que pode estar levando as células a um maior risco de estresse. Estudos desenvolvidos por Dermikol et al. (2012), em células de ovário de hamster chinês (CHO-K1), e por Amin (2010), e em células de fígado de ratos, com o corante tartrazina também registraram uma diminuição significativa dos níveis de GSH, dados esses que corroboram os resultados do presente estudo para o corante Sienna Brown. O corante Sudan IV também induziu a diminuição dos níveis de GSH em células HepG2 (ZHANG et al., 2009).

Quando a célula fica exposta às espécies reativas de oxigênio (ROS), ela pode sofrer peroxidação dos ácidos graxos insaturados de sua membrana. A peroxidação de lipídios insaturados produz compostos como os hidroperóxidos e aldeídos, como o malondialdeído (MDA) (LIMA; ABDALLA, 2001; ANDRADE JÚNIOR et al., 2005), que reduzem a fluidez da membrana, podendo promover o rompimento da mesma (HALLIWELL, 1987).

A partir dos resultados obtidos neste estudo, foi observado um aumento significativo nas concentrações de TBARS para as células expostas à concentração de 50 mg/L do corante Sienna Brown e de 10 e 7,5 mg/L do corante Ebony. Esses dados permitem inferir que, além dos corantes causarem danos no material genético, comprovados pelos ensaios do MN e do cometa, eles também interferem na estrutura da membrana celular.

Resultados semelhantes foram obtidos nos estudos de Dermikol et al. (2012) com células CHO expostas aos corantes Tartrazina e New Coccin, ambos pertencentes ao grupo dos corantes azo. Os autores observaram altos níveis de MDA, derivado da peroxidação lipídica. Fouad (2015) também observou que houve um aumento na concentração de TBARS no plasma em células de fígado de ratos ao testar o Orange Yellow S. Ambos os resultados estão de acordo com os resultados encontrados no presente estudo, indicando que os compostos azo são capazes de danificar a membrana celular. Desta forma é possível afirmar que os corantes estudados nesta pesquisa (Cherry Red, Sienna Brown e Ebony) induzem

estresse oxidativos nas células 5637, e que quanto maior a concentração de TBARS observada, maior é o grau do estresse oxidativo sofrido pela célula.

5. CONCLUSÃO

As avaliações realizadas neste estudo são pioneiras, pois foram testados, pela primeira vez, os corantes Cherry Red, Sienna Brown e Ebony, usados na formulação da tintura preta, em células de bexiga, órgão este considerado alvo de fragilidade desses químicos.

Pelos resultados do presente estudo, ficou evidente que os corantes avaliados, mesmo em concentrações inferiores às usadas comercialmente, têm potencialidade de causar morte celular, devido a sua interação com a membrana das células. Os corantes estudados induziram danos na dupla fita do DNA, possíveis de serem observados pelo ensaio do cometa, e danos mutagênicos, pela indução significativa de MNs. Todos os corantes testados foram genotóxicos, mostrando que há uma alta afinidade destes corantes com o DNA. Isto acontece, porque os compostos formados após a metabolização dos corantes azo, possuem atividade muito mais tóxica para as células, por poderem se intercalar no DNA, levando a quebras de fita dupla e a consequentes mutações.

Pela potencialidade dos corantes promoverem quebras no DNA, sua toxicidade é decorrente da sua ação clastogênica. Os corantes Cherry Red, Sienna Brown e Ebony possuem a capacidade de causar estresse oxidativo nas células 5637. Esses efeitos podem ser devidos, principalmente, à presença de grupos azo na composição dos mesmos. Esses resultados servem de alerta sobre os efeitos que esses corantes podem ter sobre as células de bexiga. Nossos estudos ainda sugerem que a citotoxicidade do corante Sienna Brown é concentração dependente, pois quanto maior a concentração do corante, maior foi a redução do ICDN.

Sabendo que os cabeleireiros não fazem uso de luvas durante as etapas do processo de tingimento de cabelo e pelos resultados obtidos neste estudo, inferimos que existe uma necessidade urgente de se implementar políticas de conscientização desses profissionais das áreas da cosmética, além de estabelecer critérios mais rigorosos para a produção desses químicos, visando a maior proteção e uma melhor saúde dos seus usuários.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMIN, K.A.; ABDEL-HAMEID, H.; ABD-ELSTTAR, A.H. Effect of food azo dyes tartrazine and carmoisine on biochemical parameters related to renal, hepatic function and oxidative stress biomarkers in young male rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.48, p.2994–2999, 2010.
- ANDRADE JÚNIOR, D.R.; SOUZA, R.B.; SANTOS, S.A.; ANDRADE, D.R. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.31, p.60-68, 2005.
- BOLT, H.M.; GOLKA, K. The debate on carcinogenicity of permanent hair dyes: new insights. **Critical Reviews in Toxicology**, v.37, p.521-536, 2007.
- BONASSI, S.; NERI, M.; LANDO, C.; CEPPI, M.; LIN, Y.; CHANG, W.P.; HOLLAND, N.; KIRSCH-VOLDER, M.; ZEIGER, E.; FENECH, M.; THE HUMN COLLABORATIVE GROUP. Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human MicroNucleus project. **Mutation Research**, v.543, p.155-166, 2003.
- BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation methods. **Methods in Enzymology**, v.52, p.302-310, 1978.
- CERNIGLIA, C.E.; ZHUO, Z.; MANNING, B.W.; FEDERLE, T.W.; HEFLICH, R.H. Mutagenic activation of the benzidine-based dye direct black 38 by human intestinal microflora. **Mutation Research**, v.175, p.11–16, 1986.
- CHEQUER, F.M.D.; LIZIER, T.M.; FELÍCIO, R.; ZANONI, M.V.B.; DEBONSI, H.M.; LOPES, N.P.; OLIVEIRA, D.P. The azo dye Disperse Red 13 and its oxidation and reduction products showed mutagenic potential. **Toxicology in Vitro**, v.29, p.1906-1915, 2015.
- CHUNG, K. Azo dyes and human health: A review. **Journal of Environmental Science and Health**, v.34, p.233-261, 2016.
- COLLINS, A. R. The comet assay for DNA damage and repair: Principles, applications, and limitations. **Molecular Biotechnology**, v.26, p.249-261, 2004.
- DERMIKOL, O.; ZHANG, X.; ERCAL, N. Oxidative effects of tartrazine (CAS No. 1934-21-0) and New Coccin (CAS No. 2611-82-7) azo dyes on CHO cells. **Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit**, v.7, p.229-236, 2012.
- FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v.455, p.81-95, 2000.
- FERNANDES, F.H.; BUSTOS-OBREGON, E.; SALVADORI, D.M.F. Disperse Red 1 (textile dye) induces cytotoxic and genotoxic effects in mouse germ cells. **Reproductive Toxicology**, v.53, p.75-81, 2015.

FERRAZ, E.R.A.; UMBUZEIRO, G.A.; DE-ALMEIDA, G.; CALOTO-OLIVEIRA, A.; CHEQUER, F.M.D.; ZANONI, M.V.B.; DORTA, D.J.; OLIVEIRA, D.P. Differential toxicity of disperse Red 1 and disperse Red 13 in the Ames test, HepG2 cytotoxicity assay, and daphnia acute toxicity test. **Environmental Toxicology**, v.26, p.489-497, 2010.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, p.61-68, 1997.

FERRAZ, E.R.A.; GRANDO, M.D.; OLIVEIRA, D.P. The azo dye Disperse Orange 1 induces DNA damage and cytotoxic effects but does not cause ecotoxic effects in *Daphnia similis* and *Vibrio fischeri*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 192, p.628-622, 2011.

FORBES, R. J. Dyes and dyeing. **Studies in Ancient Technology**, v.4, p.98-142, 1964.

FOUAD, D. Antioxidant and modulatory effect of melatonin on hepatotoxicity and oxidative stress induced by Orange Yellow S in male rats. **Pakistan Journal of Zoology**, v.47, p.383-391, 2015.

GAO, Y.; LI, C.; SHEN, J.; YIN, H.; AN, X.; JIN, H. Effect of food azo dye tartrazine on learning and memory functions in mice and rats, and the possible mechanisms involved. **Journal of Food Science**, v.76, p.125-129, 2011.

GILBERT, H.F.; MC LEAN, V.M. Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, v.63, p.69-172, 1990.

GONÇALVES, E.S.; SILVA, J.M.B.; PAVESI, T.; MOREIRA, J.C. A importância da determinação analítica de intermediários reativos e de seus produtos de reações com biomacromoléculas: uma mini revisão. **Química Nova**, v. 37, p.317-322, 2014.

HABIG, W.H.; PABST, M.J.; JAKOBY, W.B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **The Journal of Biological Chemistry**, v.249, p.7130–7139, 1974.

HALLIWELL, B. Oxidants and human diseases: some new concepts. **The FASEB Journal**, v.1, p.441-445, 1987.

HUBER, P.C.; ALMEIDA, W.P.; DEFÁTIMA, A. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v.31, p.1170-1179, 2008.

IARC. **IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans**. Vol.57. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1993.

IARC. **IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans.** Some Aromatic Amines, Organic Dyes, and Related Exposures, Vol.99. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2010.

Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO). Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/consumidor/produtos/tintura_cabelo.asp>. Acesso em 20 dez. 2017

JOHANSSON, G.M.; JÖNSSON, B.A.G.; AXMON, A.; LINDH, C.H.; LIND, M.L.; GUSTAVSSON, M.; BROBERG, K.; BOMAN, A.; MEDING, B.; LIDÉN, C.; ALBIN, M. Exposure of hairdressers to ortho- and meta-toluidine in hair dyes. **Occupational and Environmental Medicine**, v.72, p.57-63, 2015.

JOSEPHY, P.D.; MANNERVIK, B. **Molecular toxicology.** Second edition. New York: Oxford University Press, 2006.

LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.37, p.293-303, 2001.

LIND, M.L.; JOHANSSON, S.; LIDÉN, C.; MEDING, B.; BOMAN, A. Hairdresser's skin exposure to hair dyes during different hair dying tasks. **Contact Dermatitis**, v.77, p.303-310, 2017.

LOYSON, P. Chemistry in the time of the pharaohs. **Journal of Chemical Education**, v.88, p.146-150, 2011.

LADEMANN, J.; RICHTER, H.; JACOBI, U.; PATZELT, A.; HUEBER-BECKER, F.; RIBAUD, C.; BENECH-KIEFFER, F.; DUFOUR, E.K. Human percutaneous absorption of a direct hair dye comparing in vitro and in vivo results: implications for safety assessment and animal testing. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p.2214-2223, 2008.

LOWRY, L.K.; TOLOS, W.P.; BOENIGER, M.F.; NONY, C.R.; BOWMAN, M.C. Chemical monitoring of urine from workers potentially exposed to benzidine-derived azo dyes. **Toxicology Letters**, v.7, p.29-36, 1980.

MAITI, S.; SASMAL, K.; SINHA, S. S.; SINGH, M. Analysis of cytotoxicity and genotoxicity on *E. coli*, human blood cells and *Allium cepa* suggests a greater toxic potential of hair dye. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.124, p.248-254, 2016.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the auto-oxidation of pyrogallol and a convenient assay of superoxide dismutase. **European Journal of Biochemistry**, v. 47, p. 469-474, 1974.

MOREL, O. J. X.; CHRISTIE, R. M. Current trends in the chemistry of permanent hair dyeing. **Chemical Reviews**, v.111, p.2537-2561, 2011.

NOHYNEK, G. J.; FAUTZ, R.; BENECH-KIEFFER, F.; TOUTAIN, H. Toxicity and human health risk of hair dyes. **Food and Chemical Toxicology**, v.42, p.517-543, 2004.

NOTT, H. W. Systemic poisoning by hair dye. **The British Medical Journal**, v.1, p.421-422, 1924.

OOKA, M.; KOBAYASHI, K.; ABE, T.; AKIYAMA, K.; HADA, M.; TAKEDA, S.; HIROTA, K. Determination of genotoxic potential by comparison of structurally related azo dyes using DNA repair-deficient DT 40 mutant panels. **Chemosphere**, v.164, p.106-112, 2016.

ORESKOV, K.W.; SØSTED, H.; JOHANSEN, J.D. Glove use among hairdressers: difficulties in the correct use of gloves among hairdressers and the effect of education. **Contact Dermatitis**, v.72, p.362-366, 2015.

OSUGI, M.E.; RAJESHWAR, K.; FERRAZ, E.R.A.; OLIVEIRA, D.P.; ARAÚJO, A.R.; ZANONI, M.V.B. Comparison of oxidation efficiency of disperse dyes by chemical and photo-electrocatalytic chlorination and removal of mutagenic activity. **Electrochimica Acta**, v.54, p.1086-1093, 2009.

RISS, T.L.; MORAVEC, R.A.; NILES, A.L.; DUELLMAN, S.; BENINK, H.A.; WORZELLA, T.J.; MINOR, L. **Cell viability assays. Assay Guidance Manual [Internet]**. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004-.

ROBINSON, T.; MCMULLAN, G.; MARCHANT, R.; NIGAM, P. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. **Bioresource Technology**, v.77, p.247-255, 2001.

SARIKAYA, R.; SELVI, M.; ERKOÇ, F. Evaluation of potential genotoxicity of five food dyes using the somatic mutation and recombination test. **Chemosphere**, v.88, p.974-979, 2012.

SHAN, X.Q.; AW, T.Y.; JONES, D.P. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Pharmacology & Therapeutics**, v.47, p.61-71, 1990.

SUN, J.; JIN, J.; BEGER, R.D.; CERNIGLIA, C.E.; CHEN, H. Evaluation of metabolism of azo dyes and their effects on *Staphylococcus aureus* metabolome. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.44, p.1471-1481, 2017.

TAFURT-CARDONA, Y.; SUARES-ROCHA, P.; CASIMIRO, T. C. F.; MARIN-MORALES, M. A. Cytotoxic and genotoxic effects of two hair dyes used in the formulation of black color. **Food and Chemical Toxicology**, v.86, p.9.15, 2015.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SAZAKI, Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.35, p. 206-221, 2000.

TSUBOY, M.S.; ANGELI, J.P.F.; MATOVANI, M.S.; KANSMÜLLER, S.; UMBUZEIRO, G.A.; RIBEIRO, L.R. Genotoxic, mutagenic and cytotoxic effects of the commercial dye CI Disperse Blue 291 in the human hepatic cell line HepG2. **Toxicology in Vitro**, v.21, p.1650-1655, 2007.

THOMPSON, R. H. **Naturally occurring quinones**: Academic Press, New York, 1957.

ULIANA, C.V.; GARBELLINI, G.S.; YAMANAKA, H. Evaluation of the interactions of DNA with the textile dyes Disperse Orange 1 and Disperse Red 1 and their electrolysis products using an electrochemical biosensor. **Sensor and Actuators B: Chemical**, v. 178, p.627-635, 2013.

VENTURA-CAMARGO, B.C.; MARIN-MORALES, M.A. Azo Dyes: Characterization and toxicity - A review. **Textiles and Light Industrial Science and Technology**, v.2, p.85-103, 2013.

YAHAGI, T.; DEGAWA, M.; SEINO, Y.; MATSUSHIMA, T.; NAGAO, M.; SUGIMURA, T.; HASHIMOTO, Y. Mutagenicity of carcinogenic azo dyes and their derivatives. **Cancer Letters**, v.1, p.91-96, 1975.

ZANONI, T. B.; TIAGO, M.; FAIÃO-FLORES, F.; BARROS, S. B. M.; BAST, A.; HAGEMAN, G.; OLIVEIRA, D. P.; MARIA-ENGLER, S. S. Basic Red 51, a permitted semi-permanent hair dye, is cytotoxic to human skin cells: Studies in monolayer and 3D skin model using human keratinocytes (HaCaT). **Toxicology Letters**, v.227, p.139-149, 2014.

ZHANG, X.; GOOD, I.; LAURSEN, R. Characterization of dyestuffs in ancient textiles from Xinjiang. **Journal of Archeological Science**, v.35, p.1095-1103, 2008.

ZHANG, Y.; NA, Y.; JIANG, L.; GENG, C.; CAO, J.; JIANG, L.; ZHONG, L. The role of oxidative stress in Sudan IV-induced DNA damage in human liver-derived HepG2 cells. **Environmental Toxicology**, v.26, p.292-299, 2009. DOI: 10.1002/tox.20558.

Artigo 2: Avaliação dos efeitos da mistura de corantes usada em tinturas capilares, com e sem associação com peróxido de hidrogênio, sob células de bexiga humana.

Michele Perisatto Berreta¹; Leticia Cristina Gonçalves¹; Maria Aparecida Marin-Morales^{1*}.

¹UNESP – Univ Estadual Paulista, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Av. 24-A, 1515, CEP 13506-900, Rio Claro, São Paulo, Brasil.

* Autor correspondente. Tel.: + 55 19 3526-4143; Fax: +55 19 3536-0009

e-mail: mamm@rc.unesp.br

RESUMO

Atualmente, o setor de cosméticos tem se destacado no mercado produtivo mundial. Estima-se que cerca de 12 bilhões de dólares são gastos mundialmente só na aquisição de tinturas capilares. O alto uso desses produtos tem despertado muita preocupação na área da saúde, devido à composição química dessas tinturas, pois muitas delas são compostas por corantes que possuem ligações azo ($R-N=N-R'$), compostos estes reconhecidamente mutagênicos e/ou carcinogênicos. Estudos vem relacionando o uso de tinturas capilares com o aumento na incidência de câncer, principalmente o de bexiga. Devido a esses motivos, esse estudo teve como objetivo avaliar os efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos, além do potencial de indução de estresse oxidativos, em células de bexiga (linhagem 5637), de mistura de corantes que compõe a tintura capilar preta, na ausência e presença do peróxido de hidrogênio. Os efeitos citotóxicos dessas composições foram avaliados pelo teste da resazurina, sendo testadas 17 concentrações da associação dos três corantes (Cherry Red, Sienna Brown e Ebony) e 12 concentrações da associação dos três corantes com peróxido de hidrogênio. A partir desse teste, foram selecionadas três concentrações de cada tratamento, as quais apresentaram viabilidade celular acima de 80 % (0,31, 0,23 e 0,16 % da associação de corantes; e 0,08, 0,06 e 0,04 % da associação e corantes com peróxido de hidrogênio), para serem utilizadas nos demais ensaios. A genotoxicidade das três concentrações de cada tratamento foi avaliada pelo ensaio do cometa. Foi possível observar, pelo parâmetro intensidade de cauda, que todas as concentrações causaram danos significativos ao material genético das células. A avaliação do potencial mutagênico das misturas de corante, sem e com peróxido de hidrogênio, foi feita pelo teste do micronúcleo (MN). Por este teste, foi observada uma alta incidência de MN em células binucleadas de todos os tratamentos, confirmando o potencial mutagênico das associações de corantes. Pelo índice ICDN, extraído dos resultados do teste do MN, foi possível confirmar o efeito citotóxico de todos os tratamentos realizados. Foram também avaliados a atividade da enzima SOD, os níveis de GSH e de TBARs. A atividade da enzima SOD aumentou significativamente nas células expostas a todas as concentrações dos dois tipos de tratamento. Os níveis de GSH tiveram um aumento significativo para as concentrações de 0,16 % da associação de corantes e para 0,06 e 0,04 % da associação de corantes com peróxido de hidrogênio. Os níveis de TBARs exibiram aumento significativo apenas para a concentração de 0,04 % da associação de corantes com peróxido de hidrogênio. Com os dados obtidos neste estudo, podemos

inferir que as misturas de corantes, na presença e ausência do peróxido de hidrogênio, mesmo estando em concentrações muito inferiores às que estão presentes nas formulações comerciais da tintura capilar preta, são citotóxicas para as células. Ainda, essas misturas foram capazes de induzir danos genotóxicos e mutagênicos nas células de bexiga humana, além de colocarem as células em risco de estresse oxidativo. Esses efeitos podem estar associados tanto à presença dos grupos azo dos corantes da mistura como das aminas aromáticas resultantes das quebras desses corantes.

Palavras-chave: Ensaio do cometa, estresse oxidativo, linhagem celular 5637, teste da resazurina, teste do micronúcleo.

ABSTRACT

Nowadays, cosmetic sector has stood out in the productive worldwide market. It is estimated that about US\$ 12 billion are spent globally only on the acquisition of hair dyes. The high cost of these products has evoked many concerns in the health area due to the chemical composition of these dyes because many of them are composed by azo dyes ($R-N=N-R'$), which are known to be mutagenic and/or carcinogenic. Studies have been relating the use of hair dyes with an increase of cancer development, mainly the bladder cancer. Due to these reasons, this study aimed to evaluate the cytotoxic, genotoxic and the mutagenic effects, besides the oxidative stress induction potential of dye mixtures that composes the black hair dye, in the presence and absence of hydrogen peroxide, on bladder cells (cell line 5637). The cytotoxic effects of these compositions were assessed by the resazurina assay, in which were tested 17 concentrations of the mixture of three dye (Cherry Red, Sienna Brown and Ebony) and 12 concentrations of the mixture of these three dyes with hydrogen peroxide. From this test, we were able to select three concentrations of each treatment, which presented 80 % or more cell viability (0.31, 0.26, 0.16 % of the dye mixture; 0.08, 0.06 and 0.04 % of the dye mixture with hydrogen peroxide) to be tested on the following tests. The genotoxic effect of the three concentrations of each treatment was evaluated by the comet assay. It was possible to observe, by the tail intensity parameter, that all concentrations caused significant damages to the genetic material of the cells. The evaluation of the mutagenic potential of the dye mixtures, with and without hydrogen peroxide, was made by the MN test. By this test, it was observed a high incidence frequency of MN in binucleated cells exposed to every treatment, confirming the mutagenic potential of the mixtures of the dyes. By the ICDN, extracted from the results of the MN test, it was possible to confirm the cytotoxic effect of every treatment performed. It was also evaluated the SOD enzyme activity, GSH and TBARs levels. SOD activity increased significantly in the cells exposed to every concentration of both treatment. GSH levels had a significant increase to the concentrations of 0.16 % of the dye mixture and to 0.06 and 0.04 % to the dye mixture with hydrogen peroxide. TBARs levels showed significant increase only to the concentration of 0.04 % of the dye mixture with the hydrogen peroxide. With the obtained data in this study, we can infer that the dye mixtures, in the presence and absence of the hydrogen peroxide, even being in lower concentrations than the ones present in the commercial formulations, are cytotoxic for the cells. Besides, they can induce genotoxic and mutagenic damages on human bladder cells and endanger oxidative stress in the cells. These effects may be related both the presence of azo groups of the dye mixture and aromatic amines resulting from the breakage of these dyes.

Keywords: cell line 5637, comet assay, micronucleus test, oxidative stress, resazurin test.

1. INTRODUÇÃO

De acordo com Nohynek et al. (2010) é possível classificar as tinturas de cabelo como oxidativas (permanentes), diretas (semipermanente ou temporárias), sais metálicos e naturais. Os mesmos autores citam que elas contêm intermediários primários, agentes acopladores, e agentes alcalinizantes e oxidantes. Para que haja a formação da cor, os intermediários primários precisam ser oxidados, normalmente por peróxido de hidrogênio, em ambiente alcalino, formando espécies reativas que, por fim, reagem com os acopladores (FRANÇA et al., 2015).

O consumo de tinturas capilares ao redor do mundo é muito grande, o que causa uma preocupação também muito grande para o setor da saúde pública. Estima-se que US\$ 12 bilhões são, anualmente, gastos para a aquisição de tinturas capilares (TAI et al., 2016). Ames et al. (1975) também testaram a mutagenicidade de tinturas de cabelo permanente e concluíram que os compostos presentes nelas eram mutagênicos, tendo alta probabilidade de serem, também, carcinogênicos. Como já foi comprovado que os compostos presentes nas tinturas de cabelo podem ser absorvidos pela pele, (IARC, 1978), há uma grande preocupação sobre a segurança no uso de tinturas capilares, tanto dos consumidores quanto dos profissionais da área de cosmetologia.

Muitos estudos epidemiológicos tentam relacionar o uso de tinturas de cabelo com o aumento na incidência de cânceres, como o de bexiga, de mama e de próstata. Estudos realizados por Heikkinen et al., (2015) mostraram que o uso de tinturas capilares aumentou a probabilidade de ocorrência de câncer de mama em 23 %. Os autores afirmam que 19% dos casos de câncer de mama de pessoas com idade inferior a 60 anos podem ser atribuídos ao uso de tinturas de cabelo.

Tai et al. (2016) estudaram a relação entre o uso de tinturas de cabelo e o aparecimento de câncer de próstata. Com esse estudo, os autores concluíram que o tingimento de cabelo pode estar associado ao aumento do risco de aparecimento de câncer de próstata, embora os autores não encontraram relação com a sobrevivência dos pacientes. Outros estudos também destacam a incidência de câncer de bexiga tanto em pessoas que fazem uso de tinturas de cabelos como em profissionais que se expõe a elas (NOHYNEK et al., 2004). Hadkhale et al. (2017) mostraram que há um acentuado risco de câncer de bexiga entre os cabeleireiros do Canadá e entre as cabeleireiras dos países nórdicos. Bolt e Golka (2007) afirmam

ainda que as tinturas de cabelo mais escuras têm uma maior concentração de substâncias intermediárias na sua composição, o que aumenta o risco de causarem bexiga urinária. Para Cumberbatch et al. (2015), uma das profissões que apresenta maior risco de incidência de câncer de bexiga é de cabeleireiros, devido a sua exposição constante às tinturas e às aminas aromáticas. Todos os efeitos observados para as tinturas capilares podem estar relacionados, segundo Sun et al. (2017), com a presença de corantes azo nas suas formulações, uma vez que esse grupo de corante é o mais utilizado pelas indústrias de cosmético, cujo consumo chega a $4,9 \times 10^4$ tons/ano (NGUYEN; SALEH, 2016).

Os corantes azo podem ser transformados, sob condições específicas, em aminas aromáticas, substâncias estas que possuem características mutagênicas e/ou carcinogênicas (BRÜSCHWEILER; MERLOT, 2017). Sua toxicidade ocorre pela ativação metabólica de grupos amino que danificam proteínas e o DNA (NEUMANN, 2010).

McCann et al. (1975) avaliaram o potencial mutagênicos de cerca de 300 químicos, pelo teste *Salmonella*/microsoma, antes e após serem metabolizados. Nesse estudo, os autores encontraram várias substâncias mutagênicas e/ou carcinogênicas, destacando entre elas corantes azo e compostos diazo (MCCANN, 1975). Estudos realizados por Ventura-Camargo et al. (2016) também mostraram um alto potencial genotóxico e mutagênicos para um corante azo usado na indústria têxtil. Assim, pelas evidências de toxicidade dos corantes azos e a presença desses corantes em tinturas capilares, existe uma preocupação relacionada com a utilização de tinturas capilares, mostrando haver a necessidade de estudos que possam esclarecer mais efetivamente os reais efeitos desses compostos sobre a saúde dos seus usuários.

Além do fato das tinturas terem corantes azo nas suas formulações, há também a necessidade de serem adicionados a elas, durante o tingimento do cabelo, agentes oxidantes para uma melhor fixação da cor. Um dos agentes oxidantes mais utilizados é o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O H_2O_2 é uma ROS (SIMIC et al., 1989), que pode causar danos às células e, dependendo da sua concentração intracelular, promover desequilíbrio nos níveis de espécies antioxidantes (SOSA et al., 2013). Quando o equilíbrio entre as ROS e as espécies antioxidantes é perdido, inicia-se processos de estresse oxidativo dentro da célula,

podendo danificar macromoléculas, como o DNA (VESKOUKIS et al. 2012). As interações das ROS com a molécula de DNA podem, além de causar quebras, prejudicar o sistema de reparo e permitir a formação de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OhdG), uma mutação capaz de iniciar processos carcinogênicos (MATSUI et al., 2000; SOSA et al., 2013).

Existem muitos estudos realizados com compostos isolados das formulações das tinturas de cabelo, como os corantes azo e aminas aromáticas, mas quase nenhum avalia a mistura dos corantes com o peróxido de hidrogênio. Dessa forma, esse estudo teve como objetivo avaliar os efeitos citogenotóxico e mutagênico da mistura de três corantes que são usados na formulação da tintura de cabelo que confere a cor preta, com e sem peróxido de hidrogênio, sobre células de bexiga. Também foi avaliado o potencial dessas misturas causarem estresse oxidativo para as células testadas. Os resultados obtidos nesse estudo poderão contribuir com um melhor conhecimento dos efeitos da associação de corantes na presença e ausência do peróxido de hidrogênio sobre células de bexiga e também com a segurança do uso desses produtos para cabeleireiros, que se expõe continuamente às tinturas capilares.

2. METODOLOGIA

2.1. Bioensaios com células 5637 (células cancerosas de bexiga humana)

A linhagem celular 5637 foi cultivada meio DMEM (Meio de Eagle modificado por Dulbecco – Gibco/Cultilab), 2,200 mg/L de NaHCO₃, 3,500 mg/L de glicose e 0,1% de solução de antibiótico-antimicótico (penicilina 10.000 U.I./mL / estreptomicina 10 mg/mL, Cultilab), suplementados com 10% de soro bovino fetal (SBF). Os frascos foram mantidos à temperatura controlada (37 °C) em estufa à 5 % de CO₂.

2.2. Material químico testado

Foram usados neste estudo os corantes Arianor Cherry Red (composto pelo azo corante Basic Red 51 - CAS no. 77061-58-6); Arianor Sienna Brown (composto pelo azo corante Basic Brown 17 - CAS no. 68391-32-2) e o Arianor Ebony (composto por cinco diferentes corantes: Basic Blue 99 - CAS no. 68123-13-7, Basic Brown 16 - CAS No. 26381-41-9, Basic Yellow 57 - CAS No. 68391-31-1, Basic Red 76 - CAS no. 68391-30-0 e Acid Violet 43 - CAS no. 4430-18-6, sendo que três deles

são corantes azo: Basic Yellow, Basic Red e Basic Brown), que foram doados (amostra em pó), gentilmente, pela empresa Sensient Cosmetic Technologies Brasil (São Paulo-SP). Também foi usado neste estudo o peróxido de hidrogênio (água oxigenada), adquirido em farmácias, na concentração de 6 % (20 volumes). As concentrações testadas desses corantes corresponderam à porcentagem comparativa com a formulação da tintura capilar preta, recomendada pelo fabricante (20 mg/L do Chery Red; 400 mg/L do Sienna Brown e 3.200 mg/L do Ebony).

Foram realizados dois tipos de tratamentos: 1. A mistura dos corantes; 2. A mistura dos corantes, na presença de peróxido de hidrogênio, na proporção de 1:1,5 (1 parte de corante para 1,5 parte de peróxido de hidrogênio). A escolha dessa proporção de peróxido de hidrogênio se baseou na proporção utilizada em salões de beleza e indicada para o processo de tingimento, pelos fabricantes das tinturas capilares. Para a realização dos ensaios de resazurina com as misturas de corantes que fazem parte da tintura preta, foram testadas as seguintes concentrações em relação à formulação da tintura capilar preta:

- Sem peróxido: 100,00 %, 75,00 %, 50,00 %, 37,50 %, 25,00 %, 18,75 %, 2,50%, 1,88 %, 1,25 %, 0,94 %, 0,63 %, 0,47 %, 0,31 %, 0,27 %, 0,23 %, 0,20 % e 0,16 %. (Sendo 100 % correspondente à solução contendo 20 mg/L de Arianor Cherry Red, 400 mg/L de Arianos Sienna Brown e 3.200 mg/L de Arianor Ebony, conforme recomendado pelo fabricante).
- Com peróxido: 0,31 %, 0,27 %, 0,23 %, 0,20%, 0,16 %, 0,12 %, 0,08 %, 0,07 %, 0,06 %, 0,05 %, 0,04 % e 0,03 % (porcentagem comparativa à composição de uso).

Essas concentrações estão apresentadas em porcentagem, para se estabelecer uma melhor comparação entre elas e as especificadas para uso pelo fabricante. O teste controle positivo (CP) foi realizado com Triton X-100, diluído em meio de cultura sem soro, na concentração de 1% e, o teste controle negativo (CN), apenas meio de cultura sem soro.

Para os ensaios de genotoxicidade (ensaio do Cometa) e de mutagenicidade (teste do MN) e estresse oxidativo, foram testadas concentrações que apresentaram viabilidade celular superior à 80 % no teste da resazurina:

Sem peróxido: 0,16 %, 0,23 % e 0,31 %.

Com peróxido: 0,04 %, 0,06 % e 0,08 %.

O CP, para os ensaios do cometa e do MN, foi realizado com uma solução aquosa do composto Metil Metanosulfonato (MMS) à $1,2 \times 10^{-2}$ M, e o CN com meio de cultura.

Tabela 1: Porcentagem de cada corante (em mg/L) presente em cada concentração testada das misturas.

Concentrações testadas	Cherry Red	Sienna Brown	Ebony	
Sem H ₂ O ₂	0,16 %	0,032	0,64	5,12
	0,23 %	0,046	0,92	7,36
	0,31 %	0,062	1,24	9,92
Com H ₂ O ₂	0,04 %	0,008	0,16	1,28
	0,06 %	0,012	0,24	1,92
	0,08 %	0,016	0,32	2,56

2.3. Ensaio da resazurina

A exposição das células às concentrações sugeridas anteriormente foi feita em placas de 96 poços, nas quais foram semeadas $2,34 \times 10^4$ células da linhagem celular 5637 (células cancerosas de bexiga humana) por poço, de acordo com o protocolo descrito por RISS et al. (2016), com algumas modificações. Foi incluído, também, o teste branco do experimento. Depois de um período de 24 horas de incubação em estufa de CO₂ (5 % e a 37 °C), o meio de cada poço foi substituído por um meio de cultura novo (sem soro), a fim de expor as células aos tratamentos.

Os tratamentos permaneceram nos poços por um período de três horas. Na sequência, os tratamentos foram retirados e adicionada a solução de resazurina 44 µM (CAS No. 62758-13-8), diluída em meio de cultura sem soro. A placa permaneceu incubada por quatro horas e, após esse período, foram lidas no leitor de microplaca (Aparelho Infinite® 200 Pro - Tecan), no comprimento de onda de excitação 560 nm e de emissão 590 nm.

2.4. Ensaio do cometa

Para este ensaio, foram semeadas em placas de 6 poços, 1×10^5 células da linhagem celular 5637 por poço. Após o término do período de exposição, as células foram coletadas, centrifugadas e, o pellet, ressuspendido.

Para o prosseguimento do ensaio do cometa, foi avaliada a viabilidade celular das concentrações pré-estabelecidas no ensaio de pelo método do Azul de Tripán.

Para a montagem das lâminas do ensaio do cometa, 20 μ L de suspensão celular foi misturada com 120 μ L de agarose de baixo ponto de fusão (37 °C) e, então, espalhadas sobre as lâminas previamente cobertas com agarose comum. As lâminas foram cobertas com lamínulas e resfriadas a uma temperatura de 6 °C, por 20 minutos. Em seguida, foram extraídas as lamínulas e as lâminas submetidas a solução de lise (1 % de Triton X-100, 10 % de DMSO e 89 % de solução de lise estoque – NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM com pH ajustado para 10, com auxílio de solução aquosa de NaCl 5M), onde permaneceram por, no mínimo, 1 hora a 6 °C, em geladeira. Após este procedimento, as lâminas foram colocadas em uma cuba de eletroforese e cobertas com solução tampão (NaOH 300mM, EDTA 1mM, pH < 13), por 20 min, para a desnaturação do DNA. A corrida de eletroforese foi realizada por 20 minutos a uma corrente de 40 V e 300 mA (~0,8 V/cm). Em seguida, as lâminas foram submetidas a três banhos de solução de neutralização (0,4 M Tris-HCl, pH 7,5), por cinco minutos cada, secas a temperatura ambiente e fixadas com etanol absoluto, por 10 minutos. Após a fixação e secagem, as lâminas foram coradas com 50 μ L de solução de GelRed®, cobertas com lamínula e, imediatamente, analisadas em microscópio de fluorescência Leica DM 4000B (filtro de excitação de 515-560 nm e filtro de barreira de 590 nm), em um aumento de 400 vezes. Foram analisados, aleatoriamente, 50 nucleóides por lâmina, não sobrepostos, totalizando 300 nucleóides por tratamento (COLLINS, 2004). A dimensão dos danos foi avaliada pelo programa Comet Assay IV (INSTEM® – Filadélfia, EUA).

2.5. Ensaio do micronúcleo com bloqueio da citocinese

O ensaio do MN procedeu de acordo com o protocolo proposto por Natarajan e Darroudi (1991) com algumas modificações. Ao término da exposição aos tratamentos (três horas), o meio de cultura foi substituído por um novo meio, onde foram adicionados 50 μ L de citocalasina B (300 μ g/mL), por um período de 24 horas, para a obtenção de células binucleadas. Após a colheita, as células foram tratadas com solução hipotônica (KCl 0,075 M) e duas gotas de formol 40 %, sendo, posteriormente, centrifugadas a 1500 rpm, por cinco minutos. Após o descarte do sobrenadante, foi adicionada ao pellet a solução fixadora de Carnoy (3 partes de etanol absoluto: 1 parte de ácido acético glacial).

A suspensão celular foi gotejada sobre lâminas, previamente limpas para remoção de gordura, contendo um filme de água gelada e, depois de secas a temperatura ambiente, as coradas com reativo de Schiff e contra coradas com Giemsa 5 %, por cinco minutos. Foram analisadas 2.000 células binucleadas (com delimitações citoplasmáticas e nucleares íntegras e com núcleos de tamanhos similares, não sobrepostos e com o mesmo padrão e intensidade de coloração), por réplica, totalizando 6.000 células por tratamento. Foram contabilizadas a quantidade de células normais, micronucleadas, com broto e pontes nucleoplasmáticas. Também foram analisadas 500 células adicionais por lâmina, para serem usadas na obtenção do Índice Citotóxico de Divisão Nuclear (ICDN), onde foram contabilizadas células com um dois, três e quatro núcleos e células em processo de apoptose e necrose, cujos valores obtidos foram aplicados na fórmula proposta por Fenech (2000), apresentada a seguir:

$$ICDN = \frac{(Ap + Nec + 1N + (2 \times 2N) + (3 \times 3N) + (4 \times 4N))}{500}$$

onde:

ICDN = Índice Citotóxico de Divisão Nuclear;

Ap = células apoptóticas;

Nec = células necróticas;

1- 4N = células viáveis com 1 a 4 núcleos.

2.6. Avaliação da atividade das enzimas antioxidantes

Para os ensaios de avaliação de estresse oxidativo, foram semeadas 1×10^6 células em cada frasco de cultura de 25 cm², contendo meio DMEM suplementado com SBF, onde permaneceram, por um período de 48 horas, em estabilização. Na sequência. Após três horas de tratamento com as concentrações dos corantes, as células foram lavadas com PBS-EDTA gelado, retiradas dos frascos com o auxílio de *scraper* e transferidas para tubos criogênicos, que foram armazenados em nitrogênio líquido, até serem usadas nas análises posteriores.

Para o desenvolvimento dos ensaios, as amostras foram descongeladas em gelo e, posteriormente, sonicadas, duas vezes por 10 segundos cada, no aparelho QSonica Sonicators (modelo Q55), amplitude 20 kHz. A seguir, a solução de cada tubo criogênico foi transferida para microtubos, os quais foram dispostos em

centrífuga refrigerada (Centrifuge 5430R – eppendorf®) e centrifugados, por 10 minutos, a 10.000 rpm (4 °C). O sobrenadante foi utilizado nos ensaios de estresse oxidativo.

2.6.1. Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

A atividade da enzima superóxido dismutase foi avaliada de acordo com o método proposto por Marklund e Marklund (1974), com algumas modificações. Em uma placa de 96 poços, foram misturados, em cada poço, 200 µL de tampão TRIS-HCl 25 mM (EDTA 20mM, pH 8,5), 20 µL do sobrenadantes obtido e 20 µL de pirogalol 15 mM. A placa foi incubada à temperatura ambiente (25 °C), por 10 minutos, e a reação foi interrompida pela adição de 20 µL de HCl 1N. A atividade da SOD foi medida em leitor de microplaca (Aparelho Infinite® 200 Pro – Tecan), em comprimento de onda de 440 nm, expressa em unidade de absorbância/minuto.

2.6.2. Avaliação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH)

Os níveis de GSH dos tratamentos foram avaliados por meio do método descrito por Habig et al. (1974), com algumas modificações. Inicialmente, as proteínas das amostras, foram precipitadas misturando, em microtubos, 200 µL da amostra com 200 µL TCA (ácido tricloroacético) a 20 %. Essa solução permaneceu em repouso por cinco minutos. Decorrido esse tempo, os microtubos foram centrifugados em centrífuga refrigerada, por cinco minutos à 4000 rpm e a 4 °C. Em uma placa de 96 poços, foram adicionados, por poço, 100 µL do sobrenadante, 100 µL de tampão (fosfato 0,1 M, EDTA 1 µM e pH 8,0) e 20 µL de DTNB 10 mM (Reagente de Ellman). A absorbância foi monitorada em leitor de microplaca (Aparelho Infinite® 200 Pro – Tecan), em comprimento de onda 410 nm, em dois momentos distintos (logo após a adição do DTNB e após 15 minutos da exposição).

2.6.3. Determinação da peroxidação lipídica (TBARS)

Os níveis de peroxidação lipídica foram determinados de acordo com o método descrito por Buege e Aust (1978), com algumas adaptações. Foram adicionados em tubos de ensaio, 700 µL da amostra, 1 mL de TBA (ácido tiobarbitúrico à 1 % diluído em solução de NaOH 50 mM), 10 µL de NaOH 10 M e 500 µL de solução de H₃PO₄ a 20 %. Essa mistura foi colocada em banho-maria por 15 minutos. Decorrido esse tempo, foi adicionado 1 ml de N-Butanol. Os tubos de ensaio foram agitados, para

homogeneização da mistura e, em seguida centrifugados à 3.400 rpm, por cinco minutos, para separação da fase orgânica. Foram colocados em cada um dos poços das placas de Elisa 250 µL do sobrenadante. A placa foi lida em leitor de microplaca (Aparelho Infinite® 200 Pro - Tecan), em comprimento de onda 535 nm.

2.7. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas no programa estatístico IBM SPSS Statistics Data Editor, versão 22, desenvolvido pela empresa IBM, North Castle – Nova Iorque (EUA). Todos os resultados passaram inicialmente pelo teste de normalidade e, de acordo com os resultados obtidos nesse teste, foi escolhido o teste estatístico apropriado.

Os valores considerados extremos do conjunto foram retirados pelo teste de Grubb's, para serem utilizados na análise estatística dos ensaios de estresse oxidativo. O teste de Grubb's foi realizado pelo software GraphPad, desenvolvido por GraphPad Software Inc., La Jolla – Califórnia, EUA, com nível de significância igual à 0,05.

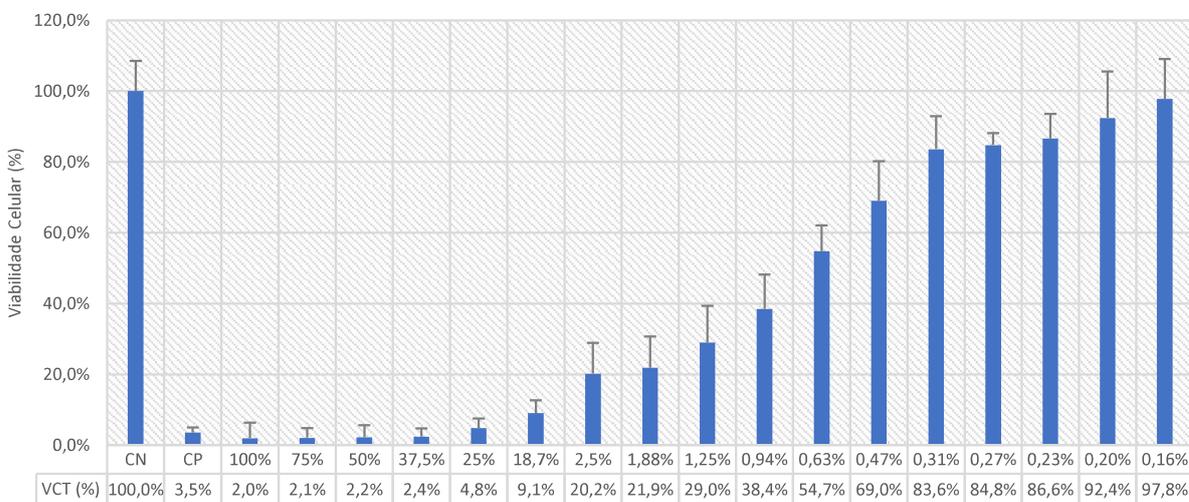
3. RESULTADOS

3.1. Teste da resazurina

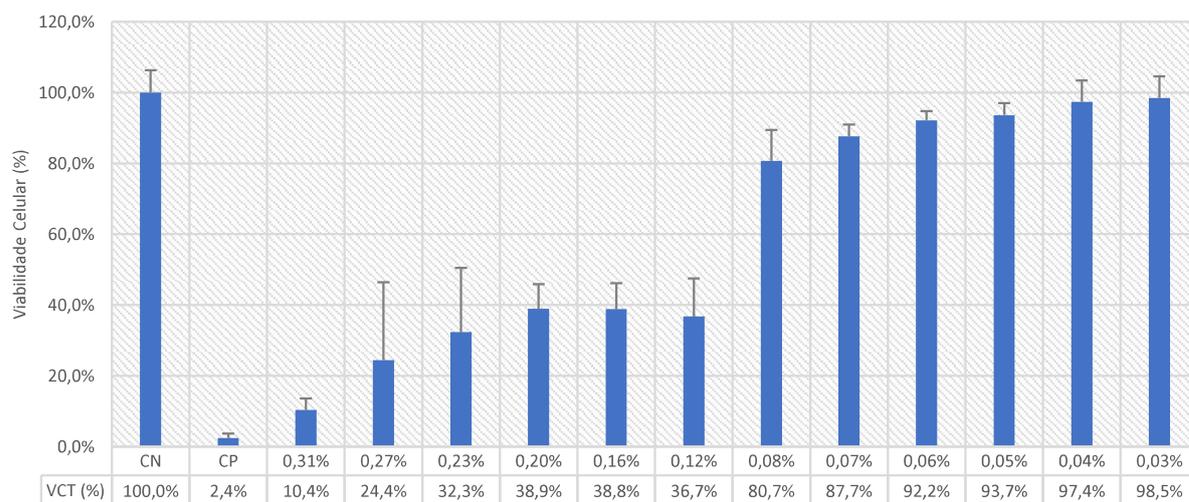
Nesse ensaio, foram testadas diversas concentrações da mistura dos corantes da tintura de cabelo preta. Muitas das concentrações testadas da tintura, sem o peróxido de hidrogênio, já foram citotóxicas para as células da linhagem 5637, inclusive em concentrações muito mais baixas que as presentes na formulação da mesma. Como só foi possível obter viabilidade celular superior a 80 % somente para as 5 menores concentrações testadas da mistura sem peróxido, foram escolhidas para o teste de viabilidade da mistura associada ao peróxido de hidrogênio, concentrações a partir de 0,31 %. Desta análise, foi possível selecionar as concentrações de 0,31 %, 0,23 % e 0,16 % da mistura sem associação com peróxido e as concentrações de 0,08 %, 0,06 % e 0,04 % da mistura com peróxido (Figura 1). A partir desses resultados, foi possível prosseguir com os demais ensaios de genotoxicidade, mutagenicidade e de estresse oxidativo.

Figura 1: Viabilidade celular (%) obtida no teste da Resazurina após três horas de exposição às misturas de corantes, com e sem peróxido de hidrogênio.

a)



b)



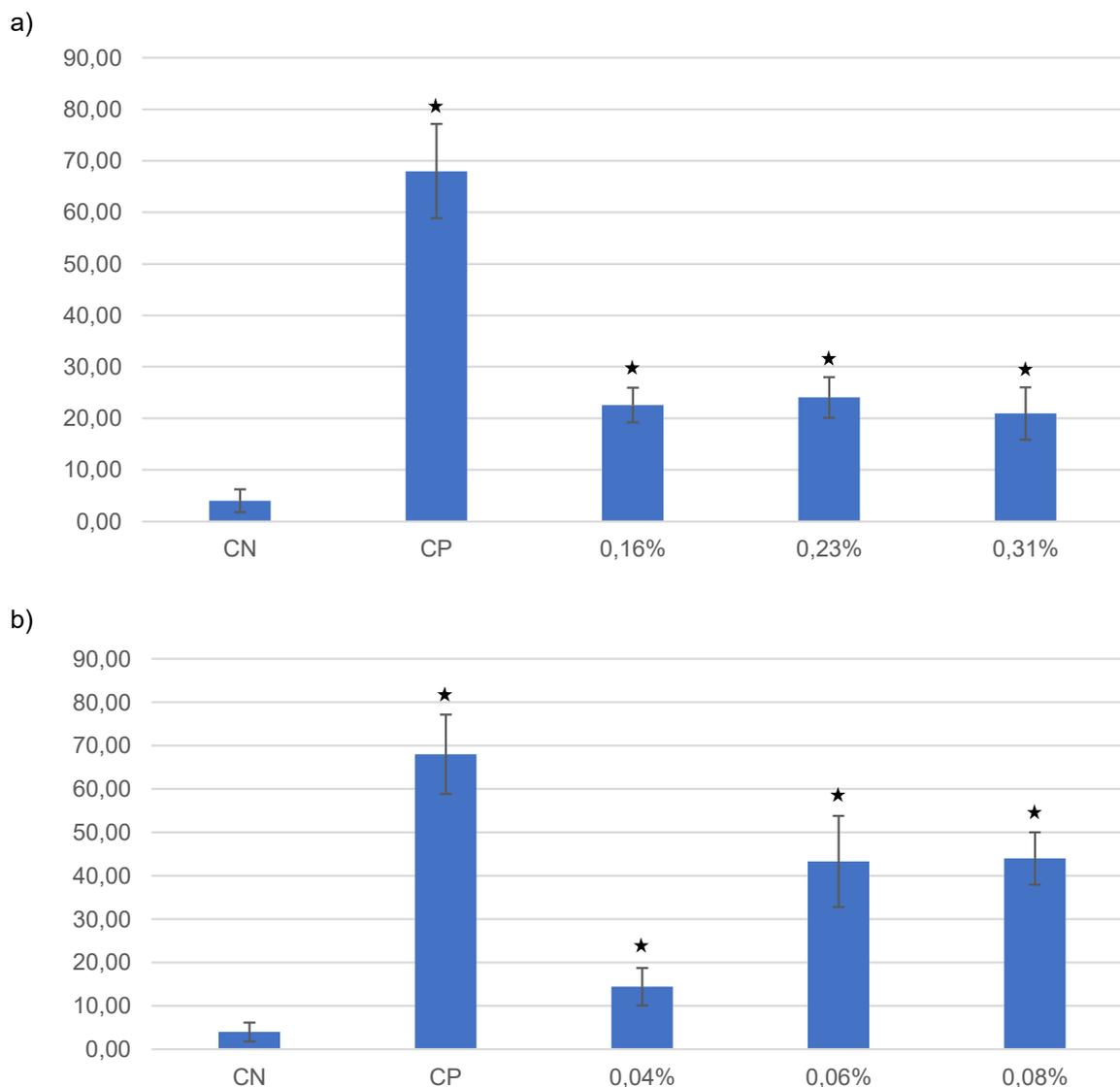
Viabilidades celulares observadas para as misturas de corantes (VCT): a) sem peróxido de hidrogênio; b) com peróxido de hidrogênio.

3.2. Ensaio do cometa

Neste ensaio, foram testadas concentrações pré-estabelecidas no teste da Resazurina (mistura de corantes sem peróxido de hidrogênio: 0,31 %, 0,23 % e 0,16 %; e mistura de corantes com peróxido de hidrogênio: 0,08 %, 0,06 % e 0,04 %).

Pelos resultados de genotoxicidade, obtidos nos ensaios do cometa, para o parâmetro intensidade da cauda, foi possível observar que todas as concentrações das misturas, sem e com peróxido de hidrogênio, após três horas de exposição, causaram efeitos genotóxicos, mostrando que essas misturas causam danos ao material genético das células de bexiga, mesmo em concentrações muito inferiores às usadas na formulação estabelecida pelo fabricante e, até mesmo, em salões de beleza.

Figura 2: Intensidade de cauda observada em células de linhagem de bexiga, pelo ensaio do cometa, após três horas de exposição às misturas de corantes, com e sem peróxido de hidrogênio.



CN = controle negativo. * = Valores estatisticamente significativos em relação ao CN (ANOVA/Dunnet, $p < 0,05$). Valores obtidos da exposição às tinturas: a) sem peróxido de hidrogênio; b) com peróxido de hidrogênio.

3.3. Ensaio do micronúcleo com bloqueio da citocinese

Os resultados mostrados na tabela 1 indicam que todas as misturas de corantes, independentemente de serem ou não associadas com o peróxido de hidrogênio, possuem ação mutagênica para as células da linhagem de bexiga 5637. É possível observar também que, para as concentrações de corantes sem o peróxido de hidrogênio, a indução de MN foi dose-dependente, ou seja, quanto maior a dose, maior a indução de MNs.

Foi verificado um aumento significativo de broto nucleares nas células expostas a todos os tratamentos, quando comparado com o CN, confirmando o efeito genotóxico observado para o ensaio do cometa. Com relação a pontes nucleares, apenas as concentrações 0,31 % e 0,26 % da mistura de corantes sem peróxido de hidrogênio e 0,06 % da mistura com peróxido de hidrogênio obtiveram resultados significativo, quando comparados ao CN.

As misturas dos corantes com e sem peróxido de hidrogênio, também reduziram, significativamente, o índice de divisão celular (ICDN), indicando um potencial citotóxico da tintura preta para as células 5637, mesmo para concentrações muito mais baixas que as usualmente utilizadas para tingimento.

Tabela 2: Resultados obtidos no teste do micronúcleo, realizado com a linhagem celular 5637 (bexiga humana), após três horas de exposição às misturas de corantes, com e sem peróxido de hidrogênio.

Tratamentos	Ponte		Broto		MN		Quantidade de MN / célula				ICDN
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	1	2	3	4+	
Controle Negativo	0,05 ± 0,55	8,00 ± 1,67	14,33 ± 2,16	14,2	0,2	0,0	14,2	0,2	0,0	0,0	1,760
Controle Positivo	2,50 ± 1,38 *	33,83 ± 2,56 *	69,00 ± 1,41 *	63,2 *	5,0 *	0,7	63,2 *	5,0 *	0,7	0,2	1,623 *
Sem peróxido											
0,16 %	2,00 ± 1,41	27,83 ± 5,42 *	52,83 ± 2,64 *	48,3 *	2,0 *	1,0	48,3 *	2,0 *	1,0	0,5	1,438 *
0,23 %	2,67 ± 1,03 *	27,17 ± 2,32 *	59,50 ± 3,33 *	53,8 *	5,0 *	0,5	53,8 *	5,0 *	0,5	0,2	1,460 *
0,31 %	4,33 ± 1,21 *	31,00 ± 4,65 *	67,00 ± 2,68 *	60,3 *	5,7 *	1,0	60,3 *	5,7 *	1,0	0,0	1,506 *
0,04 %	1,18 ± 0,98	31,17 ± 3,97 *	55,50 ± 3,99 *	46,7 *	7,3 *	1,5	46,7 *	7,3 *	1,5	0,0	1,464 *
Com peróxido											
0,06 %	2,33 ± 1,21 *	30,67 ± 3,27 *	53,67 ± 4,89 *	47,3 *	4,8 *	1,3	47,3 *	4,8 *	1,3	0,2	1,455 *
0,08 %	2,00 ± 0,89	36,83 ± 2,99 *	66,83 ± 3,31 *	57,3 *	6,2 *	3,2 *	57,3 *	6,2 *	3,2 *	0,2	1,455 *

DP = Desvio Padrão; ICDN = Índice Citotóxico de Divisão Nuclear; MN = micronúcleo; * = valores estatisticamente significativos em relação ao controle negativo (ANOVA/Dunnett, p<0,05).

3.4. Avaliação da atividade das enzimas antioxidantes

Pelos resultados obtidos nos ensaios de avaliação de indução de estresse oxidativo, foi possível observar (Tabela 2) que todas as concentrações das misturas de corantes, sem e com peróxido de hidrogênio, foram capazes de aumentar, significativamente, os níveis da enzima SOD, quando comparados com os resultados do CN.

A atividade da enzima GSH também aumentou significativamente nas concentrações de 0,16 % da mistura de corantes sem peróxido de hidrogênio e nas de 0,06 % e 0,04 % da mistura de corantes com peróxido de hidrogênio, indicando uma relação dose/resposta inversamente dependente (menor concentração, maior atividade da enzima).

Foram registrados níveis de TBARS aumentados apenas para a concentração de 0,04 % da mistura de corantes com peróxido de hidrogênio.

Tabela 3: Resultados obtidos nos ensaios de estresse oxidativo, realizados com a linhagem celular 5637 (bexiga humana), após três horas de exposição às misturas de corantes, com e sem peróxido de hidrogênio.

Tratamentos	SOD ± DP	GSH ± DP (mmol/L)	TBARS ± DP (mol/Lx10 ⁻⁹)
Controle Negativo	0,193 ± 0,014	14,17 ± 7,31	341,9 ± 2,7
Sem peróxido	0,16 %	0,347 ± 0,008 *	48,16 ± 3,11 *
	0,23 %	0,335 ± 0,016 *	22,76 ± 4,89
	0,31 %	0,328 ± 0,005 *	9,34 ± 6,10
Com peróxido	0,04 %	0,350 ± 0,011 *	37,92 ± 6,60 *
	0,06 %	0,345 ± 0,006 *	471,0 ± 22,9 *
	0,08 %	0,357 ± 0,012 *	28,73 ± 5,22 *
			329,5 ± 7,3

DP = Desvio Padrão; SOD= atividade da enzima superóxido dismutase; GSH= avaliação dos níveis de glutathiona reduzida; TBARS= determinação da peroxidação lipídica; * = valores estatisticamente significativos em relação ao controle negativo (ANOVA/Dunnet, p<0,05).

4. DISCUSSÃO

A concentração de 0,31 %, da associação de corantes sem peróxido, obteve viabilidade celular acima de 80 %, porém essa mesma concentração testada para a mistura com o peróxido se mostrou altamente citotóxica, por apresentar baixa

viabilidade celular. Isso indica que, mesmo em baixa concentração, o peróxido de hidrogênio causou a morte das células.

Maiti et al. (2016) avaliaram os efeitos de três formulações de tinturas capilares em diferentes ensaios. Em *E. coli*, os autores concluíram que as tinturas interagiram com a membrana celular, levando as células à morte. Já em células sanguíneas humanas, os autores observaram que esses compostos causaram hemólise e uma diminuição dose dependente da viabilidade dos leucócitos. Ventura-Camargo et al. (2016), ao testarem o corante BDCP (*Black Dye Commercial Product*), que é composto por três corantes azo, mostraram que este composto tem efeito citotóxico sobre células meristemáticas de *Allium cepa*. Esse efeito foi observado antes e após o corante ter passado por um processo de biodegradação por bactérias, fungos e levedura, sendo que, os corantes azo, ao serem reduzidos pela biotransformação, liberam aminas aromáticas que possuem efeitos muitas vezes mais tóxicos que a substância original (KORINTH et al., 2013; BRÜSCHWEILER; MERLOT, 2017). Apesar desses estudos serem concordantes com os resultados da presente pesquisa, sobre a toxicidade das tinturas capilares, não existe, até o momento, dados que mostrem os efeitos dessas tinturas, quando essas são associadas com peróxido de hidrogênio.

Ainda, pelo teste do micronúcleo realizado nesta pesquisa, foi possível observar uma diminuição significativa do ICDN para todos os tratamentos testados, reforçando a atividade citotóxica de tinturas capilares, tanto na presença como na ausência do H₂O₂. É importante ressaltar que, para a associação de corantes, sem peróxido de hidrogênio, quanto menor a concentrações testada maior a redução do índice. Para obter esse índice, também foram contabilizadas células em processo de morte, tanto por apoptose quanto necrose. Os resultados obtidos na presente análise são concordantes com os apresentados por Ventura-Camargo et al. (2016), uma vez que os autores verificaram que o corante BDCP desencadeou processos de necrose e apoptose em células merismáticas de *Allium cepa*.

Pelo ensaio do cometa, usando o parâmetro intensidade de cauda, foi possível observar que todas as concentrações de todas as misturas (com e sem peróxido de hidrogênio) causaram efeitos genotóxicos sobre as células de bexiga. Ainda, é possível destacar que, a mistura da associação dos corantes com o peróxido de hidrogênio apresentou uma genotoxicidade muito maior, quando comparada com a

mistura dos corantes sem peróxido. Apesar de não haver nenhuma citação na literatura científica sobre a relação entre as quebras no DNA e tinturas capilares associadas a peróxido de hidrogênio, podemos inferir que há um forte indicativo de promoção de efeitos danosos a essa macromolécula, potencializado pela presença do peróxido em compostos já considerados tóxicos

Um estudo *in vitro*, realizado por Maiti et al. (2015), mostrou que tinturas capilares, em seu estado de uso, conseguem interagir com o DNA, causando sua fragmentação e oxidação. O presente estudo reafirma a ação danosa que as tinturas capilares têm sobre o DNA, especialmente devido à presença de corantes azo. Dois dos corantes utilizados neste estudo (Basic Red 51 e Basic Brown 17) também já foram alvos de estudo, que mostraram que, mesmo em baixas concentrações, eles apresentaram efeitos genotóxicos sobre células humanas (HepG2) (TAFURT-CARDONA et al., 2015). Os autores atribuíram esse efeito à presença de ligações azo nas moléculas desses corantes. Alguns estudos ainda mostram que corantes azo conseguem se intercalar na molécula de DNA e causar quebras de fita dupla (ULIANA et al., 2013; OOKA et al., 2016). O aumento na incidência de pontes e brotos, observadas no teste do micronúcleo, reforçam os resultados obtidos pelo ensaio do cometa, comprovando a ação genotóxica da associação de corantes, sem e com peróxido de hidrogênio, sobre o DNA.

Tsuboy et al. (2007) reporta quebras no DNA de células HepG2 causadas pelo corante azo CI Disperse Blue 291. Segundo os autores, essas quebras são resultados da ação clastogênica desse corante. Assim, podemos sugerir que, tanto pelos resultados do presente estudo obtidos pelo ensaio do cometa, quanto pelas pesquisas realizadas por Tsuboy et al. (2007), os corantes azo têm efeitos clastogênicos sobre o DNA. Isso explicaria, também, a alta frequência de micronúcleos encontrados no teste do MN. Assim, podemos inferir que as associações de corantes, sem e com peróxido de hidrogênio, possuem ação mutagênica sobre o material genético das células de bexiga, uma vez que esses danos foram persistentes, mesmo após essas células passarem por um ciclo de divisão, mostrando que eles não foram reparados. Essa afirmação é reforçada pelo estudo de Maiti et al. (2016), em que os autores detectaram danos clastogênicos sobre o DNA de células merismáticas de *Allium cepa*, causados por corantes capilares.

Aumento na frequência de micronúcleos em células expostas a um corante azo também foi observado por Chequer et al. (2015). Os autores expuseram linfócitos aos corantes Disperse Red 13 e encontraram claras evidências da ação mutagênica desse composto. Essa ação é comprovada pelos estudos realizados por Oliveira et al. (2010) e Ferraz et al. (2010). Oliveira et al. (2010) mostraram a ação mutagênica desse corante pelo teste do micronúcleo e Ferraz et al. (2010) pelo teste de Ames. As pesquisas comprovaram que esse corante azo induz mutações no material genético. A avaliação da atividade enzimática no presente estudo revelou que todas as concentrações testadas, tanto na presença como na ausência do peróxido de hidrogênio, obtiveram um aumento significativo na atividade da enzima superóxido dismutase (SOD). Apesar desses resultados mostrarem valores muito semelhantes entre si, deve-se considerar que as concentrações da mistura com e sem peróxido de hidrogênio foram muito diferentes entre si, o que nos permite inferir que o H₂O₂ aumentou, drasticamente, o nível da atividade da SOD.

Estudos prévios realizados nesta pesquisa (BERRETA et al., dados não publicados) sobre a os efeitos citotóxicos do corante Ebony, mostraram que a concentração de 10 mg/L, correspondente a 0,31 % na mistura ora estudada, não induziu alteração na atividade da enzima SOD. Pelos resultados obtidos com a tintura, podemos afirmar que os três corantes da associação testada (tintura preta) têm um efeito sinérgico e, por isso, induziram, conjuntamente, um aumento significativo da atividade da SOD. Infelizmente, não há dados na literatura que correlacionem o aumento da SOD de células expostas ao peróxido de hidrogênio. Esse aumento na atividade da SOD nos permite inferir que a exposição das células aos tratamentos fez com que houvesse um aumento de radicais livres dentro delas, o que levou a uma alteração do equilíbrio celular, acarretando neste aumento de atividade verificado. O azo corante amarelo crepúsculo (Orange Yellow S) também aumentou significativamente a atividade da SOD, em células de sangue e fígado de ratos Wistar (FOUD, 2015).

Esse aumento nos níveis de radicais livres, observado pela atividade aumentada da SOD, também pode ter interferido nos níveis de TBARs. As ROS podem interagir com os lipídios insaturados da membrana celular, resultando na formação de hidroperóxidos e aldeídos, como o malondialdeído (MDA) (ANDRADE JÚNIOR et al., 2005), compostos estes conhecidos como TBARs. Foi observado no

presente estudo um aumento significativo dos níveis de TBARS para a concentração de 0,04% da associação de corantes com peróxido de hidrogênio. Esse aumento é indicativo de que está havendo peroxidação lipídica e, conseqüentemente, um aumento na permeabilidade da membrana celular, que pode levar a célula a morte (HALLIWELL; CHIRICO, 1993). Altos níveis de MDA também foram observados para células CHO-K1, quando expostas aos corantes azo Tartrazina e New Coccin, e para plasma de fígado de ratos, expostos ao corante amarelo crepúsculo (DERMIKOL et al., 2012; FOUAD, 2015).

A GSH é uma proteína antioxidante que, para proteger a célula de agentes estressores, é oxidada para GSSH. Essa reação de oxidação envolve transferências de elétrons que transformam o agente estressor em um composto menos agressivo para a célula (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; JOSEPHY; MANNERVIK, 2006). Nos resultados do presente estudo, observamos um aumento significativo nos níveis de GSH para a concentração 0,16 % da associação de corantes sem H₂O₂ e para as concentrações 0,06 e 0,04 % da associação de corantes com H₂O₂. Esse aumento também foi observado em estudos prévios, realizados com o corante Ebony (BERRETA et al., dados não publicados), onde foi observado um aumento para a concentração de 10 mg/L desse corante, dados estes que reforçam o efeito sinérgico entre os corantes, sugerido anteriormente.

Por fim, é importante destacar que o aumento dos níveis de ROS dentro das células pode dar início a processos de estresse oxidativo (VESKOUKIS et al., 2012). Essas espécies podem causar danos em macromoléculas, como DNA, promovendo falhas no mecanismo reparo, ocorrência de mutações e processos de carcinogênese (MATSUI et al., 2000), bem como danos em lipídeos, que podem levar a morte celular.

5. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos nesse estudo podemos concluir que as associações de corantes utilizadas em tinturas capilares são altamente citotóxicas para as células de bexiga, principalmente na presença do peróxido de hidrogênio.

A citotoxicidade das tinturas capilares, mesmo em baixas concentrações, sem e com H₂O₂, foi confirmada pelo ICDN obtido no teste do micronúcleo. Esse índice mostrou que todos os tratamentos com as associações de corantes (com e sem

peróxido) induziram uma diminuição na divisão celular, que foi concentração inversamente dependente para a associação de corantes na ausência do peróxido de hidrogênio, (menor concentração, maior redução).

As associações de corantes, na ausência e presença do peróxido de hidrogênio, foram capazes de induzir danos na molécula de DNA, provavelmente devido às ligações azo presentes nos corantes destas misturas. Pelos resultados obtidos, podemos ainda concluir que o peróxido de hidrogênio potencializou os efeitos tóxicos dos corantes, pois mesmo em baixas concentrações, eles foram capazes de causar danos às células

Pelo teste do MN, observamos efeito genotóxico das misturas sobre as células de bexiga, pelos altos valores de pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares registrados. Esses dados reforçam os resultados do ensaio do cometa, e mostram que esses corantes, na presença do peróxido de hidrogênio, podem causar quebras no DNA. Essas quebras podem ser resultado de uma ação clastogênica e, como as houve eventos de reparar desses danos, a ação mutagênica persistiu sobre a forma de micronúcleos.

Além da possível atividade azoredutase das células de bexiga, o peróxido de hidrogênio, como agente oxidante, aumentou a formação de aminas aromáticas, que também são altamente tóxicas e prejudiciais aos sistemas biológicos. Isso também explica a alta atividade da enzima SOD, pois as células, ao serem expostas às associações dos corantes, na presença e ausência do H_2O_2 , ficaram também expostas a um maior estresse oxidativo, que levou ao aumento de radicais livres nessas células. Esses radicais também interferiram nos níveis de TBARs, que aumentam para a menor concentração da associação de corantes com H_2O_2 , o que nos permite concluir que, mesmo em baixa concentração, está havendo peroxidação lipídica.

Poucos são os estudos que avaliam os efeitos de misturas de corantes sobre as células, principalmente quando essa mistura está associada também com o peróxido de hidrogênio.

Essa pesquisa, traz informações consistentes para uma maior e melhor compreensão dos riscos que os corantes utilizados em tinturas capilares promovem sobre células humanas, especificamente, sobre as células de bexiga. Os dados também sugerem que devem ser realizados mais estudos sobre os efeitos de

misturas de corantes usadas nas formulações de tinturas capilares, associadas ou não ao peróxido de hidrogênio, para um melhor conhecimento do modo de ação desses compostos, bem como de seus efeitos e prováveis riscos de carcinogênese.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRÜSCHWEILER, B.J.; MERLOT, C. Azo dyes in clothing textiles can be cleaved into a series of mutagenic aromatic amines which are not regulated yet. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.88, p.214-226, 2017.

BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation methods. *Methods in Enzymology*, v.52, p.302-310, 1978.

CERNIGLIA, C.E.; ZHUO, Z.; MANNING, B.W.; FEDERLE, T.W.; HEFLICH, R.H. Mutagenic activation of the benzidine-based dye direct black 38 by human intestinal microflora. **Mutation Research**, v.175, p.11-16, 1986.

CHEQUER, F.M.D.; LIZIER, T.M.; FELÍCIO, R.; ZANONI, M.V.B.; DEBONSI, H.M.; LOPES, N.P.; OLIVEIRA, D.P. The azo dye Disperse Red 13 and its oxidation and reduction products showed mutagenic potential. **Toxicology in Vitro**, v.29, p.1906-1915, 2015.

COLLINS, A. R. The comet assay for DNA damage and repair: Principles, applications, and limitations. **Molecular Biotechnology**, v.26, p.249-261, 2004.

CUMBERBATCH, M.G.K.; COX, A.; TEARE, D.; CATTO, J.W.F. Contemporary occupational carcinogen exposure and bladder cancer: A systematic review and meta-analysis. **JAMA Oncology**, v.1, p.1282-1290, 2015.

DERMIKOL, O.; ZHANG, X.; ERCAL, N. Oxidative effects of tartrazine (CAS No. 1934-21-0) and New Coccin (CAS No. 2611-82-7) azo dyes on CHO cells. **Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit**, v.7, p.229-236, 2012.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research**, v.455, p.81-95, 2000.

FERRAZ, E.R.A.; UMBUZEIRO, G.A.; DE-ALMEIDA, G.; CALOTO-OLIVEIRA, A.; CHEQUER, F.M.D.; ZANONI, M.V.B.; DORTA, D.J.; OLIVEIRA, D.P. Differential toxicity of disperse Red 1 and disperse Red 13 in the Ames test, HepG2 cytotoxicity assay, and daphnia acute toxicity test. **Environmental Toxicology**, v.26, p.489-497, 2010.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, p.61-68, 1997.

FOUAD, D. Antioxidant and modulatory effect of melatonin on hepatotoxicity and oxidative stress induced by Orange Yellow S in male rats. **Pakistan Journal of Zoology**, v.47, p.383-391, 2015.

FRANÇA, S.A.; DARIO, M.F.; ESTEVES, V.B.; BABY, A.R.; VELASCO, M.V.R. Types of hair dye and their mechanisms of action. **Cosmetics**, v.2, p.1101-126, 2015.

HABIG, W.H.; PABST, M.J.; JAKOBY, W.B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **The Journal of Biological Chemistry**, v.249, p.7130–7139, 1974.

HADKALE, K.; MACLEOD, J.; DEMERS, P.A.; MARTINSEN, J.I.; WEIDERPASS, E.; KJAERHEIM, K.; LYNGE, E.; SPAREN, P.; TRYGGVADOTTIR, L.; HARRIS, M.A.; TJEPKEMA, M.; PETERS, P.A.; PUKKALA, E. Occupational variation in incidence of bladder cancer: a comparison of population-representative cohorts from Nordic countries and Canada. **BMJ Open**, v.7, p.1-10, 2017.

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.57, p.715S-724S, 1993.

HEIKKINEN, S.; PITKÄNIEMI, J.; SARKEALA, T.; MALILA, N.; KOSKENVUO, M. Does hair dye use increase the risk of breast cancer? A population-based case-control study of Finnish women. **PLoS ONE**, v.10, p.1-14, 2015.

IARC. **IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to man**. Some Aromatic Amines, and Related Nitro Compounds, Hair Dyes, Colouring Agents and Miscellaneous Industrial Chemicals. Vol.16. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 1978.

KORINTH, G.; SCHALLER, K.H.; DREXLER, H. Percutaneous absorption of aromatic amines and the risk assessment resulting from the dermal pathway. **Frontiers in Bioscience**, v.5, p.928-938, 2013.

JOSEPHY, P.D.; MANNERVIK, B. **Molecular toxicology**. Second edition. New York: Oxford University Press, 2006.

LOWRY, L.K.; TOLOS, W.P.; BOENIGER, M.F.; NONY, C.R.; BOWMAN, M.C. Chemical monitoring of urine from workers potentially exposed to benzidine-derived azo dyes. **Toxicology Letters**, v.7, p.29–36, 1980.

MCCANN, J.; CHOI, E.; YAMASAKI, E.; AMES, B.N. Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: Assay of 300 chemicals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.72, p.5135-5139, 1975.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the auto-oxidation of pyrogallol and a convenient assay of superoxide dismutase. **European Journal of Biochemistry**, v. 47, p. 469-474, 1974.

MATSUI, A.; IKEDA, T.; ENOMOTO, K.; NAKASHIMA, H.; OMAE, K.; WATANABE, M.; HIBI, T.; KITAJIMA, M. Increased formation of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-doexuguanosine, in human breast cancer tissue and its relationship to GSTP1 and COMT genotypes. **Cancer Letters**, v.151, p.87-95, 2000.

MAITI, S.; SINHA, S.S.; SINGH, M. Hair dye-DNA interaction: Plausible cause of mutation. **Cosmetics**, v.2, p.313-321, 2015.

MAITI, S.; SASMAL, K.; SINHA, S.S.; SINGH, M. Analysis of cytotoxicity and genotoxicity on *E. coli*, human blood cells and *Allium cepa* suggests a greater toxic potential of hair dye. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.124, p.248-254, 2016.

NATARAJAN, A.T.; DARROUDI, F. Use of human hepatoma cells for in vitro metabolic activation of chemical mutagens/carcinogens. **Mutagenesis**, v.6, p. 399-403, 1991.

NEUMANN, H.-G. Aromatic amines: mechanisms of carcinogenesis and implications for risk assessment. **Frontiers in Bioscience**, v.15, p.1119-1130, 2010.

NGUYEN, T.; SALEH, M.A. Detection of azo dyes and aromatic amines in women undergarment. **Journal of Environmental Science and Health**, v.51, p.744-753, 2016.

NOKYNEK, G.J.; ANTIGNAC, E.; RE, T.; TOUTAIN, H. Safety assessment of personal care products/cosmetics and their ingredients. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.243, p.239-259, 2010.

OLIVEIRA, G.A.R.; FERRAZ, E.R.A.; CHEQUER, F.M.D.; GRANDO, M.D.; ANGELI, J.P.F.; TSUBOY, M.S.; MARCARINI, J.C.; MANTOVANI, M.S.; OSUGI, M.E.; LIZIER, T.M.; ZANONI, M.V.B.; OLIVEIRA, D.P. Chlorination treatment of aqueous samples reduces, but does not eliminate, the mutagenic effect of the azo dyes Disperse Red 1, Disperse Red 13 and Disperse Orange 1. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, v.21, p.200-208, 2010.

OOKA, M.; KOBAYASHI, K.; ABE, T.; AKIYAMA, K.; HADA, M.; TAKEDA, S.; HIROTA, K. Determination of genotoxic potential by comparison of structurally related azo dyes using DNA repair-deficient DT 40 mutant panels. **Chemosphere**, v.164, p.106-112, 2016.

RISS, T.L.; MORAVEC, R.A.; NILES, A.L.; DUELLMAN, S.; BENINK, H.A.; WORZELLA, T.J.; MINOR, L. **Cell viability assays. Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD):** Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004-.

SIMIC, M.G.; BERGTOLD, D.S.; KARAM, L.R. Generation of oxy radicals in biosystems. **Mutation Research**, v.214, p.3-12, 1989.

SOSA, V.; MOLINÉ, T.; SOMOZA, R.; PACIUCCI, R.; KONDOH, H.; LLEONART, M.E. Oxidative stress and cancer: An overview. **Ageing Research Reviews**, v.12, p.376-390, 2013.

SUN, J.; JIN, J.; BEGER, R.D.; CERNIGLIA, C.E.; CHEN, H. Evaluation of metabolism of azo dyes and their effects on *Staphylococcus aureus* metabolome. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.44, p.1471-1481, 2017.

TAFURT-CARDONA, Y.; SUARES-ROCHA, P.; CASIMIRO, T. C. F.; MARIN-MORALES, M. A. Cytotoxic and genotoxic effects of two hair dyes used in the formulation of black color. **Food and Chemical Toxicology**, v.86, p.9.15, 2015.

TAI, T.Y.; HSIEH, H.M.; HUANG, S.P.; WU, M.T.; Hair dye use, regular exercise, and the risk and prognosis of prostate cancer: multicenter case-control and case-only studies. **BMC Cancer**, v.16, p.242-254, 2016.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SAZAKI, Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.35, p. 206-221, 2000.

TSUBOY, M.S.; ANGELI, J.P.F.; MATOVANI, M.S.; KANSMÜLLER, S.; UMBUZEIRO, G.A.; RIBEIRO, L.R. Genotoxic, mutagenic and cytotoxic effects of the commercial dye CI Disperse Blue 291 in the human hepatic cell line HepG2. **Toxicology in Vitro**, v.21, p.1650-1655, 2007.

ULIANA, C.V.; GARBELLINI, G.S.; YAMANAKA, H. Evaluation of the interactions of DNA with the textile dyes Disperse Orange 1 and Disperse Red 1 and their electrolysis products using an electrochemical biosensor. **Sensor and Actuators B: Chemical**, v. 178, p.627-635, 2013.

VENTURA-CAMARGO, B.C.; MARIN-MORALES, M.A. Azo Dyes: Characterization and toxicity - A review. **Textiles and Light Industrial Science and Technology**, v.2, p.85-103, 2013.

VESKOUKIS, A.S.; TSATSAKIS, A.M.; KOURETAS, D. Dietary oxidative stress and antioxidant defense with emphasis on plant extract administration. **Cell Stress and Chaperones**, v.17, p.11-21, 2012.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos nessa pesquisa nos permitem concluir que:

- Todos os corantes estudados, individualmente ou em associação, com e sem adição de peróxido de hidrogênio, apresentaram efeitos citotóxicos para células de bexiga, tanto para as concentrações são usadas na formulação da tintura capilar preta como as indicadas para uso pelo fabricante. A viabilidade celular, maior que 80 %, necessária para ser usadas em testes genotóxicos (ensaio do cometa) e mutagênicos (MN), só foi obtida para células expostas à concentrações muito mais baixas que as utilizadas pelos consumidores;
- Mesmo em baixas concentrações, todos os tratamentos (corante individuais e em mistura e misturas associadas com peróxido de hidrogênio) apresentaram efeitos genotóxicos (ensaio do cometa) sobre as células de bexiga;
- Foi observado efeito genotóxico também para o teste do MN, pois as células apresentaram altos índices de pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares, provavelmente devido à ação clastogênica dos corantes azo;
- Todos os corantes, individualmente ou em associações, entre si e com o peróxido de hidrogênio apresentaram atividade mutagênica, comprovada pelo teste do MN;
- Pelo teste do MN, ainda foi possível observar que todos os corantes, individualmente e em associações com e sem adição de peróxido de hidrogênio, foram capazes de induzir uma significativa redução na divisão celular, indicando citotoxicidade. Esse efeito também foi conferido por concentrações muito inferiores à utilizada na preparação da tintura capilar preta;
- Algumas concentrações da mistura dos corantes, presentes na formulação da tintura preta, foram capazes de alterar o equilíbrio ROS-defesa antioxidante das células, efeito este que pode levar a risco oxidativos para elas e até a indução de processos de carcinogênese;
- Devido a todas essas evidências, podemos afirmar que existe uma alta possibilidade desses corantes (em todas as formas testadas) conferirem riscos à saúde humana, tanto para os profissionais que se expõem diariamente a eles como para os consumidores desses produtos;
- Essa pesquisa é pioneira na avaliação dos efeitos desses corantes sobre as células de bexiga, órgão este considerado vulnerável a ação esses compostos. Pela

característica funcional deste órgão, ele pode permanecer exposto tanto aos corantes como aos seus metabólitos, ficando mais tempo vulneráveis à ação dos mesmos, o que pode conferir um maior risco de desenvolvimento de cânceres;

- São necessários mais estudos que elucidem os mecanismos de ação dos corantes utilizados em tinturas capilares, para poder avaliar as reais consequências do uso de tinturas capilares, para a saúde humana.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Isolating cells and growing them in culture. In: _____. **Molecular Biology of the Cell**. 4th ed. New York: Garland Science, 2002, p.469-478.

ANDREW A.S.; SCHNED, A.R.; HEANEY, J.A.; KARAGAS, M.R. Bladder cancer risk and personal hair dye use. **International Journal of Cancer**, v.109, p.581–586, 2004.

ANTELM, A.; YOUNG, E.; SVEDMAN, C.; ZIMERSOON, E.; ENGFELDT, M.; FOTI, C.; BRUZE, M. Are glove sufficiently protective when hairdressers are exposed to permanent hair dyes? An *in vivo* study. **Contact Dermatitis**, v.72, p.229-236, 2015

BAFANA, A.; DEVI, S.S.; CHAKRABARTI, T. Azo dyes: past, presentt and future. **Environmental Reviews**, v.19, p.350-370, 2011.

BOLT, H.M.; GOLKA, K. The debate on carcinogenicity of permanent hair dyes: new insights. **Critical Reviews in Toxicology**, v.37, p.521-536, 2007.

BRÜSCHWEILER, B.J.; MERLOT, C. Azo dyes in clothing textiles can be cleaved into a series of mutagenic aromatic amines which are no regulated yet. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.88, p.214-226, 2017.

BURLINSON, B.; TICE, R.R.; SPEIT, G.; AGUREL, E.; BRENDLER-SCHWAAB, S.Y.; COLLINS, A.R.; ESCOBAR, P.; HONMA, M.; KUMARAVEL, T.S.; NAKAJIMA, M.; SASAKI, Y.F.; THYBAUD, V.; UNO, Y.; VASQUEZ, M.; HARTMANN, A. Fourth international workgroup on genotoxicity testing: results of the *in vivo* comet assay workgroup. **Mutation Research**, v.627, p.31-35, 2007.

CARTER, S. B. Effects of cytochalasins on mammalian cells. **Nature**, v.213, p.261–264, 1967.

CARVALHO, T. U.; Cultura de Células Animais. In: BENCHIMOL, M. (Org.). **Métodos de Estudo da Célula**. Rio de Janeiro: FENORTE/UENF., v.2, p.45-58, 1996.

CERNIGLIA, C.E.; ZHUO, Z.; MANNING, B.W.; FEDERLE, T.W.; HEFLICH, R.H. Mutagenic activation of the benzidine-based dye direct black 38 by human intestinal microflora. **Mutation Research**, v.175, p.11–16, 1986.

CESARATTO, L.; VASCOTTO, C.; CALLIGARIS, S.; TELL, G. The importance of redox state in liver damage. **Annals of Hepatology**, v.3, p.86-92, 2004.

CHAUDHRI, S.K.; JAIN, N.K. History of cosmetics. **Asian Journal of Pharmaceutics**, v.3, p.164-167, 2009.

CHEONG, H.S. J.; SETH, I.; JOINER, M.C.; TUCKER, J.D. Relationships among micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds within individual cells in the cytokinesis- block micronucleus assay. **Mutagenesis**, v.28, p.433-440, 2013.

CHOI, J.H. Dye. In: Encyclopedia of Color Science and Technology. DOI: 10.1007/978-3-642-27851-8_182-1

CHUNG, K. Azo dyes and human health: A review. **Journal of Environmental Science and Health**, v.34, p.233-261, 2016.

COLLIER, S.W.; STORM, J.E.; BRONAUGH, R.L. Reduction of azo dyes during in vitro percutaneous absorption. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.118, p.73-79, 1993.

COLLINS, A.R. The comet assay for DNA damage and repair: Principles, applications, and limitations. **Molecular Biotechnology**, v.26, p.249-261, 2004.

CORBETT, J.F. Chapter 10 – Synthetic dyes for human hair. In: PETERS, H.S.F.T (Ed.). **Colorants for Non-Textile Applications**. Amsterdam: Elsevier Science, p.456-477, 2000.

COTELLE, S., FÉRARD, J. F. Comet assay in genetic ecotoxicology: A review. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 34, p. 246-255, 1999.

CZENE, K.; TIIKKAJA, S.; HEMMINKI, K. Cancer risks in hairdressers: assessment of carcinogenicity of hair dyes and gels. **International Journal of Cancer**, v.105, p.108–112, 2003.

DEHON, G.; CATOIRE, L.; DUEZ, P.; BOGAERTS, P.; DUBOIS, J. Validation of an automatic comet assay analysis system integrating the curve fitting of combined comet intensity profiles. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v.650, p.87-95, 2008.

DRAELOS, Z. D. **Hair Care - An Illustrated Dermatologic**, 1st Ed., Taylor & Francis: London, 2005.

EL-ZEIN, R.A.; FENECH, M.; LOPEZ, M.S.; SPITZ, M.R.; ETZEL, C.J. Cytokinesis-blocked micronucleus cytome assay biomarkers identify cancer cases amongst smokers. *Cancer Epidemiology*, **Biomarkers & Prevention**, v.17, p.1111-1119, 2008.

EASTMOND, D.A.; TUCKER, J.D. Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochores antibody. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 13, p.34-43, 1989.

FAIRBAIRN, D.W.; OLIVE, P.L.; O'NEILL, K.L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v.339, p.37-59, 1995.

FENECH, M.; MORLEY, A.A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. **Mutation Research**, v.147, p.29-36, 1985.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research**, v.455, p.81-95, 2000.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. **Mutation Research**, v.600, p.58-66, 2006.

FERNANDES, T.C.C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.88, p.252–259, 2007.

FRANÇA, S.A.; DARIO, M.F.; ESTEVES, V.B.; BABY, A.R.; VELASCO, M.V.R. Types of hair dye and their mechanism of action. **Cosmetics**, v.2, p.110-126, 2015.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J.A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LHD, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, v.160, p.171-177, 2006.

GAGO-DOMINGUEZ, M.; CASTELAO, J.E.; YUAN, J.M.; YU, M.C.; ROSS, R.K. Use of permanent hair dyes and bladder-cancer risk. **International Journal of Cancer**, v.91, p.575–579, 2001.

GILL, S.S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.48, p.909-930, 2010.

GIORGETTI, L.; TALOUIZTE, H.; MERZOUKI, M.; CALTAVUTURO, L.; GERI, C.; FRASSINETTI, S. Genotoxicity evaluation of effluents from textile industries of the region Fez-Boulmane, Morocco: a case study. **Ecotoxicology and environmental safety**, v.74, p.2275-2283, 2011.

GUERRA-TAPIA, A.; GONZALEZ-GUERRA, E. Hair cosmetics: dyes. **ACTAS Dermo-Sifiliográficas**, v.105, p.833-839, 2014.

GUO, H.; BASSIG, B.A.; LAN, Q.; ZHU, Y.; ZHANG, Y.; HOLFORD, T.R.; LEADERER, B.; BOYLE, P.; QIN, Q.; ZHU, C.; LI, N.; ROTHMAN, N.; ZHENG, T. Polymorphisms in DNA repair genes, hair dye use and the risk of non-Hodgkin lymphoma. **Cancer Causes Control**, v.25, p.1261-1270, 2014.

HADKHALE, K.; MACLEOD, J.; DEMERS, P.A.; MARTINSEN, J.I.; WEIDERPASS, E.; KJAERHEIM, K.; LYNGE, E.; SPAREN, P.; TRYGGVADOTTIR, L.; HARRIS, M.A.; TJEPKEMA, M. PETERS, P.A.; PUKKALA, E. Occupational variation in incidence of bladder cancer: a comparison of population-representative cohorts from Nordic countries and Canada. **BMJ Open**, v.7, p.1-10, 2017.

HARTMANN, A.; AGURELL, E.; BEEVERS, C.; BRENDLER-SCHWAAB, S.; BURLINSON, B.; CLAY, P. COLLINS, A.; SMITH, A.; SPEIT, G.; THYBAUD, V.; RICE, R.R. Recommendations for conducting the *in vitro* alkaline Comet assay. **Mutagenesis**, v.18, p.45-51, 2003.

HAYFLICK, L. The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. **Experimental Cell Research**, v.37, p.614-636, 1965.

HEIKKINEN, S.; PITKÄNIEMI, J.; SARKEALA, T.; MALILA, N.; KOSKENVUO, M. Does hair dye use increase the risk of breast cancer? A population-based case-control study of Finnish women. **PLoS ONE**, v.10, p.1-14, 2015.

HOWES, D.; BLACK, J.G. Percutaneous absorption of 2-nitro-p-phenylenediamine. **International Journal of Cosmetic Science**, v.5, p.215–26, 1983.

IARC. **IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans**. Vol.57. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1993.

IARC. **IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**. Some Aromatic Amines, Organic Dyes, and Related Exposures, Vol.99. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2010.

Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO). Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/consumidor/produtos/tintura_cabelo.asp>. Acesso em: 20 dez. 2017.

HUBER, P.C.; ALMEIDA, W.P.; DEFÁTIMA, A. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v.31, p.1170-1179, 2008.

JOSEPHY, P.D.; MANNERVIK, B. **Molecular toxicology**. Second edition. New York: Oxford University Press, 2006.

KAZANDJIEVA, J.; GROZDEV, I.; TSANKOV, N. Temporary henna tattoos. **Clinics in Dermatology**, v.25, p.383-387, 2007.

KELSH, M.A.; ALEXANDER, D.D.; KALMES, R.M.; BUFFLER, P.A. Personal use of hair dyes and risk of bladder cancer: a meta-analysis of epidemiologic data. **Cancer Causes Control**, v.19(6), p.549–558, 2008.

KIM, K.H.; KABIR, E.; JAHAN, S.A. The use of personal hair dye and its implication for human health. **Environment International**, v.89-90, p.222-227, 2016.

KOGEVINAS, M.; MANNETJT, A.; CORDIER, S.; RANFT, U.; GONZALEZ, C.A.; VINEIS, P.; CHANG-CLAUDE, J.; LYNGE, E.; WAHRENDORF, J.T.; ZONO, A.; JOCKEL, K.H.; SERRA, C.; PORRU, S.; HOURS, M.; GRIESER, E.; BOFFETIA, P. Occupation and bladder cancer among men in Western Europe. **Cancer causes and control**, v.14, p.907-914, 2003.

KORINTH, G.; SCHALLER, K.H.; DREXLER, H. Percutaneous absorption of aromatic amines and the risk assessment resulting from the dermal pathway. **Frontiers in Bioscience**, v.5, p.928-938, 2013.

KOUTROS, D.T.; SILVERMAN, D.B. Hair dye use and risk of bladder cancer in the New England bladder cancer study. **International Journal of Cancer**, v.129, p.2894-2904, 2011.

KRYSTON, T.B.; GEORGIEV, A.B.; PISSIS, P.; GEORGAKILAS, A.G. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. **Mutation Research**, v.711, p.193-201, 2011.

L'ORÉAL GROUP. **L'Oréal's history: 1909-1956: the first steps, constructing a model**. Disponível em: <<http://www.loreal.com/group/history/1909-1956>>. Acesso em 03 jan. 2018.

LEWIS, D.; MAMA, J.; HAWKES, J. A review of aspects of oxidative hair dye chemistry with special reference to n-nitrosamine formation. **Materials**, v.3, p.517-534, 2013.

LIND, M.L.; BOMAN, A.; SOLLENBERG, J.; JOHNSON, S.; HAGELTHORN, G.; MEDING, B. Occupational dermal exposure to permanent hair dyes among hairdressers. **Annals of Work Exposures and Health**, v.49, p.473-480, 2005.

LIND, M.L.; JOHNSON, S.; LIDÉN, C.; MEDING, B.; BOMAN, A. Hairdresser's skin exposure to hair dyes during different hair dyeing tasks. **Contact Dermatitis**, v.77, p.303-310, 2017.

LOWRY, L.K.; TOLOS, W.P.; BOENIGER, M.F.; NONY, C.R.; BOWMAN, M.C. Chemical monitoring of urine from workers potentially exposed to benzidine-derived azo dyes. **Toxicology Letters**, v.7, p.29-36, 1980.

LOYSON, P. Chemistry in the time of the pharaohs. **Journal of Chemical Education**, v.88, p.146-150, 2011.

MCCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). **Journal of Biological Chemistry**, v. 244, p.6049-6055, 1969.

MORAES, A.M.; AUGUSTO, E.F.P.; CASTILHO, L.R. **Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos à terapia gênica**. São Paulo: Rocca, 2007, 503 p.

MORRIS, P.J.T.; TRAVIS, A.S. A history of the international dyestuff industry. **American Dyestuff Reporter**, v.81, p.1-49, 1992.

MOSSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, p.55-63, 1983.

NGUYEN, T.; SALEH, M.A. Detection of azo dyes and aromatic amines in women undergarment. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v.51, p.744-753, 2016.

NOHYNEK, G.J.; FAUTZ, R.; BENECH-KIEFFER, F.; TOUTAIN, H. Toxicity and human health risk of hair dyes. **Food and Chemical Toxicology**, v.42, p.517-543, 2004.

NOHYNEK, G.J.; SKARE, J.A.; MEULING, W.J.A.; WEHMEYER, K.R.; DEBIE, A.T.H.J.; VAES, W.H.J.; DUFOUR, E.K.; FAUTZ, R.; STEILING, W.; BRAMANTE, M.; TOUTAIN, H. Human systemic exposure to [¹⁴C]-paraphenylenediamine-containing oxidative hair dyes: Absorption, kinetics, metabolism, excretion and safety assessment. **Food and Chemical Toxicology**, v.81, p.71-80, 2015.

NOVOTNÝ, Č.; DIAS, N.; KAPANEN, A.; MALACHOVÁ, K.; VÁNDROVCOVÁ, M.; ITÄVAARA, M.; LIMA, M. Comparative use of bacterial, algal and protozoan tests to study toxicity of azo- and anthraquinone dyes, **Chemosphere**, v.63, p.1436-1442, 2006.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v.267, p.5421-5426, 2000.

OHNISHI, T.; OHNISHI, K.; TAKAHASHI, A.; TANIGUCHI, Y.; SATO, M.; NAKANO, T.; NAGAOKA, S. Detection of DNA damage induced by space radiation in Mir and space shuttle. **Journal of Radiation Research**, v.43, p.133-136, 2002.

OLIVEIRA, R.A.G.; ZANONI, T.B.; BESSEGATO, G.G.; OLIVEIRA, D.P.; UMBUZEIRO, G.A.; ZANONI, M.V.B. A química e toxicidade dos corantes de cabelo. **Química Nova**, v.37, p.1037-1046, 2014.

ORESKOV, K.W.; SØSTED, H.; JOHANSEN, J.D. Glove use among hairdressers: difficulties in the correct use of gloves among hairdressers and the effect of education. **Contact Dermatitis**, v.72, p.362-366, 2015.

ÖSTLING, O.; JOHANSON, K.J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.123, p.291-298, 1984.

PARBOOSING, R.; MZOBE, G.; CHONCO, L.; MOODLEY, I. Cell-based assays for assessing toxicity: A basic guide. **Medicinal Chemistry**, v.13, p.13-21, 2017.

PAVLICA, M.; KLOBUCAR, G.I.V.; MOJAS, N.; ERBEN, R.; PAPES, D. Detection of DNA damage in hemocytes of zebra mussel using comet assay. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v.490, p.209-214, 2001.

RABELLO-GAY, M. N. Testes com organismos superiores. In: RABELLO-GAY, M. N.; RODRÍGUEZ, M. A. L. R.; MONTELEONE-NETO, R. Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese. Métodos e critérios de avaliação, Ribeirão Preto – SP. **Sociedade Brasileira de Genética**, 1991, p. 59-75.

RAMPERSAD, S.N. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. **Sensors (Basel)**, v.12, p.12347-12360, 2012.

RAHAL, A.; KUMAR, A.; SINGH, V.; YADAV, B.; TIWARI, R.; CHAKRABORTY, S.; DHAMA, K. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. **BioMed Research International**, v.2014, p1-19, 2014.

SAMPATHKUAR, K.; YESUDAS, S. Hair dye poisoning and the developing world. **Journal of Emergencies, Trauma and Shock**, v.2, p.129-131, 2009.

SCHERER, W.F.; SYVERTON, J.T.; GEY, G.O. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. **The Journal of Experimental Medicine**, v.97, p.695-710, 1953.

SCHMID, W. The micronucleus test for cytogenetics analysis. In: HOLLANDER, A. **Chemical Mutagens: Principles and methods for their detection**. New York: Plenum Press, 1976, p.31-53.

SHAMI, N.J.I.E.; MOREIRA, E.A.M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição**, v.17, p.227-36, 2004.

SHIMIZU, N.; ITOH, N.; UTIYAMA, H.; WAHL, G.M. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. **Journal of Cell Biology**, v.140, p.1307-1320, 1998.

SUN, J.; JIN, J.; BEGER, R.D.; CERNIGLIA, C.E.; CHEN, H. Evaluation of metabolism of azo dyes and their effects on *Staphylococcus aureus* metabolome. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.44, p.1471-1481, 2017.

STOCKERT, J.C.; BLÁZQUEZ-CASTRO, A.; CAÑETE, M.; HOROBIN, R.W.; VILLANUEVA, A. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. **Acta Histochemica**, v.114, p.785-796, 2012.

THOMPSON, R. H. **Naturally occurring quinones**: Academic Press, New York, 1957.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.-C.; SASAKI, Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.35, p.206-221, 2000.

TOWLE, K.M.; GRESPON, M.E.; MONNOT, A.D. Personal use of hair dyes and risk of leukemia: a systematic literature review and meta-analysis. **Cancer Medicine**, v.6, p.2471-2486, 2017.

TURATI, F.; PELUCCHI, C.; GALEONE, C.; DECARLI, A.; LA-VECCHIA, C. Personal hair dye use and bladder cancer: a meta-analysis. **Annals of Epidemiology**, v.24, p.151–159, 2014.

UMBUZEIRO, G.A.; FREEMAN, H.; WARREN, S.H.; KUMMROW, F.; CLAXTON, L.D. Mutagenicity evaluation of the commercial product CI Disperse Blue 21 using different protocols of the Salmonella assay. **Food and Chemical Toxicology**, v.43, p.49-56, 2005.

VEDEL-KROGH, S.; NIELSEN, S.F.; SCHNOHR, P.; NORDESTGAARD, B.G. Morbidity and mortality in 7,684 women according to personal hair dye use: the Copenhagen City Heart Study followed for 37 years. *PLoS One*, v.11, p.1-16, 2016.

VELOSO, L.A. Dossiê Técnico (Corantes e Pigmentos). Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas (BRT) / Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR), 2012.

VITA, A.C.R. **História da maquiagem, cosmética e do penteado: em busca da perfeição**. 1ªEd. São Paulo: Editora Anhembi Morumbi, 2009.

WOLFRAM, L.J. Endeavors in the area of hair care – chemical aspects of hair care processes and products. *Cosmetics*, v. 30, p.1-24, 2016.

YAHAGI, T.; DEGAWA, M.; SEINO, Y.; MATSUSHIMA, T.; NAGAO, M.; SUGIMURA, T.; HASHIMOTO, Y. Mutagenicity of carcinogenic azo dyes and their derivatives. *Cancer Letters*, v.1, p.91-96, 1975.

YOURICK, J.J.; BRONAUGH, R.L. Percutaneous penetration and metabolism of 2-nitro-p-phenylenediamine in human and fuzzy rat skin. *Toxicology Applied Pharmacology*, v.166, p.13–23, 2000.

ZHANG, Y.; HOLFORD, T.R.; LEADERER, B.; BOYLE, P.; ZAHM, S.H.; FLYNN, S.; TALLINI, G.; OWENS, P.H.; ZHENG, T. Hair-coloring product use and risk of non-Hodgkin's lymphoma: a population-based case-control study in Connecticut. *American Journal of Epidemiology*, v.159, p.148-154, 2004.