UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação do perfil de citotoxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade dos corantes Basic Red 51, Basic Yellow 57 e P-Fenilenodiamina usados na tintura de cabelo em células da pele.

Thalita Boldrin Zanoni

Ribeirão Preto

2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação do perfil de citotoxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade dos corantes Basic Red 51, Basic Yellow 57 e P-Fenilenodiamina usados na tintura de cabelo em células da pele.

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientada: Thalita Boldrin Zanoni

Orientadora: Profa. Dra. Danielle Palma de Oliveira

Versão corrigida da Tese de Doutorado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia no dia 26/06/2014. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP

Ribeirão Preto

2014

RESUMO

ZANONI, T.B. Avaliação do perfil de citotoxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade dos corantes Basic Red 51, Basic Yellow 57 e P-Fenilenodiamina usados na tintura de cabelo em células da pele. 2014. 168f. Tese (Doutorado), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

O processo de coloração de cabelos é um dos métodos de tintura mais antigos. No século XIX, iniciou-se a produção de corantes sintéticos, a partir do desenvolvimento da *p*-fenilenodiamina (PPD). Os corantes de cabelo são classificados de acordo com seu mecanismo de ação. Os corantes permanentes são classificados por mecanismos oxidativos, enquanto os corantes diretos colorem a fibra capilar por mecanismos não oxidativos. A investigação sobre os possíveis danos à saúde humana, que podem ser resultantes da exposição de corantes de cabelos, têm sido um tema de enorme desafio para a comunidade científica. Particularmente, devido à enorme discrepância dos estudos epidemiológicos e estudos que empregam metodologias *in vitro*. Neste trabalho, foram investigadas a capacidade citotóxica de um composto representante de cada classe de tinturas de cabelo, um corante temporário (Basic Yellow 57 (BY57)), um semi-temporário (Basic Red 51 (BR51)) e um ingrediente permanente *p*-fenilindiamina (PPD) em linhagens de células de pele humana. As linhagens normais da pele humana estudadas foram os queratinócitos imortalizados humanos (HaCaT) e fibroblastos primários, utilizou-se também melanoma SK-Mel-103. Posteriormente, após caracterização do corante mais tóxico, foi investigado o tipo de morte celular, as possíveis alterações destes compostos no ciclo celular, a capacidade de geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e aplicação em cultura tridimensional de pele artificial. Posteriormente, foi avaliada a capacidade de cada corante em induzir estresse oxidativo em queratinócitos humanos (HaCaT), que são a primeira via de exposição de corantes de cabelos. Em seguida, o corante elegido mais tóxico foi aplicado em pele humana provenientes de cirurgia. Finalmente, o potencial de mutagenicidade dos corantes BY57 e BR51 foram avaliados.

Palavras - chave: Corantes de cabelo, HaCaT, EROs, Citotoxicidade, Mutagenicidade, Genotoxicidade, Pele artificial.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A aplicação de corantes nos mais diversos setores é uma técnica bastante incorporada no dia a dia, sendo que o consumo global de corantes e pigmentos são de aproximadamente 7×10^5 toneladas por ano (BANAT *et al.*, 1996; ROBINSON *et al.*, 2001).

Dentro deste contexto, o uso de substâncias químicas para a modificação da cor dos cabelos tem grande destaque e remonta à Antiguidade. Registros indicam que há cerca de 4000 anos atrás diversas civilizações como as Egípcias, Gregas, Persas, Chinesas e Indianas já faziam uso de corantes de cabelos. Nessa época, esses compostos eram extraídos do reino vegetal e animal. Múmias com cabelos tingidos com henna (origem vegetal) foram encontradas no Egito (NOHYNEK *et al.*, 2004), enquanto mulheres Romanas realizavam o clareamento dos cabelos a partir da aplicação de soda caustica seguida de exposição ao sol (GOMES, 1999).

Em 1863, o desenvolvimento da indústria de corantes de cabelos sintéticos iniciou-se quando Dr. August Wilhelm von Hofmann descobriu a propriedade da *p*-fenilenodiamina (PPD) em conferir tons marrons aos cabelos. Atualmente, a maioria dos corantes e pigmentos utilizados em tinturas de cabelos é de origem sintética, sendo que a PPD é a substância mais empregada em formulações de tinturas de cabelos e ainda domina o mercado (BOUILLON; WILKINSON, 2005). O uso do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na descoloração da fibra capilar iniciou-se em 1867, esse composto ainda é frequentemente utilizado por indústrias químicas, no desenvolvimento de tinturas de cabelos permanentes (CORBETT, 1998).

Atualmente, milhões de pessoas no mundo tingem os cabelos. Estima-se que entre 50 e 80% das mulheres ao redor do mundo tenham feito uso de corantes de cabelos pelo menos uma vez na vida (IARC, 2010). Nos E.U. A e na Europa, cerca de 33% das mulheres acima de 18 anos e mais de 10% dos homens acima dos 40 anos colore seus cabelos (SCARPI *et al.*, 1998; ANDREW *et al.*, 2004; GOSH *et al.*, 2008). No Brasil, 26% da população adulta utilizam tintura para o cabelo, das quais 85 % são mulheres e 15 % são homens (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, 2013).

Para atender a demanda deste mercado em ampla expansão, altos investimentos são realizados com a finalidade de aumentar a oferta de cores e a cada ano, centenas de novos compostos coloridos são lançadas no mercado (BOUILLON; WILKINSON, 2005; ROBBINS, 2012).

1.1 Estrutura do cabelo Humano

Um adulto possui entre 100.000 a 150.000 fios de cabelo e o processo de formação do cabelo é semelhante ao crescimento da pele, ou seja, as células basais do folículo se diferenciam, produzindo a fibra capilar que se estende do folículo piloso para a derme, epiderme e estrato córneo (ROBBINS, 2012). O crescimento dos cabelos no couro cabeludo cria uma barreira física, que tem como funções a proteção mecânica do crânio, isolamento térmico, além da proteção contra inúmeros toxicantes ambientais (ZVIAK, 1986).

O cabelo humano é composto por cerca de 80% de proteínas, principalmente a alfa-queratina que, dependendo do tipo de cabelo, pode corresponder entre 65 a 95% de sua massa. Essa proteína está disposta em cadeias polipeptídicas helicoidais e é formada por elevada proporção de cisteína, estabilizada por ligações de dissulfeto, ligações de hidrogênio e interações de van der Waals (FEUGHELMAN, 1997; SWIFT, 1999; BOLDUC; SHAPIRO, 2001; SCHUELLER; ROMANOWSKI, 2005).

A matriz do cabelo é organizada por três hélices torcidas e montadas por ligações de hidrogênio e pontes de enxofre, entre outros aminoácidos. Os pigmentos de melanina determinam a coloração natural do cabelo, enquanto a cutícula envolve o córtex em aproximadamente 6-10 camadas (ARNAUD; BORÉ, 1981). A estrutura do cabelo é composta por três estruturas principais: a Cutícula, o Córtex e a Medula (ROBBINS, 2012), como ilustra a Figura 1.

Figura 1. Estrutura do cabelo humano. A cutícula compreende a parte mais externa do fio e o córtex localiza-se entre a medula e a cutícula (OLIVEIRA et al., aceito para publicação).

- *Cutícula*

A cutícula compreende a parte mais externa do cabelo e confere resistência e força à fibra capilar, além disso, ela controla a entrada e saída de água do fio. As células que constituem a cutícula possuem entre 5 e 10 micrometros de largura e 50 micrometro de comprimento e são separadas por uma forte camada adesiva denominada membrana de matriz celular (MMC). As cutículas envolvem o córtex em entre 6 e 10 camadas, aproximadamente (ARNAUD; BORÉ, 1981).

- *Córtex*

O córtex é o maior constituinte da fibra capilar. Ele é envolto pela cutícula, e compõe cerca de 90% do peso do cabelo. No citoplasma das células do córtex encontram-se os filamentos intermediários de queratina. O córtex é formado por células alongadas e fortemente aderidas entre si, paralelas ao axis da fibra, denominadas células corticais. Essas células são compostas por microfibrilas, as quais são constituídas por proteínas alfa-helicais. As microfibrilas compreendem cerca de 60% do peso total do córtex e apresentam-se na forma espiral. A queratina presente nas microfibrilas determina as propriedades mecânicas da

fibra, como resistência e elasticidade (SCHUELLER; ROMANOWSKI, 2005; ZAHN, 2002). Essa proteína é formada pela combinação de 18 aminoácidos, sendo o mais abundante a cisteína.

São no córtex que são encontradas as melaninas responsáveis pela pigmentação dos cabelos (FORMANEK et al., 2006; WOLFRAM, 2013). A interrupção da produção de melanina resulta na formação dos cabelos brancos. Esse processo é originado pela inibição da tirosinase (PEREIRA, 2001).

- Medula

A medula corresponde à parte mais interna da estrutura do cabelo humano e se apresenta como uma camada fina e cilíndrica, com diâmetro de aproximadamente entre 5 e 10 micrometros (FORMANEK et al. 2006). Essa estrutura é formada principalmente por lipídeos, sendo pobre em cisteína, mas rica em citrulina. Uma camada de MMC separa a medula do córtex (KREPLA et al., 2001).

1.2 Classificação das colorações e ingredientes usados em tinturas de cabelo

A coloração dos fios é utilizada por mulheres e homens que buscam alterar a cor natural do cabelo, por inúmeras razões, seja para esconder cabelos grisalhos, por modismo e para expressar a personalidade (HARRINSON; SINCLAIR, 2004; BOLDUC; SHAPIRO, 2001).

As tinturas de cabelos são classificadas de acordo com o modo de fixação na fibra capilar, que pode ocorrer por mecanismos oxidativos ou não oxidativos. No primeiro, ocorrem reações oxidativas entre compostos intermediários e agentes precursores, resultando na coloração permanente. Já os mecanismos não oxidativos compreendem os corantes de cabelos diretos, que independem de reações oxidativas, como as colorações semi-permanente e temporária (CHISVERT; SALVADOR, 2007).

1.2.1 Coloração permanente

É o tipo de coloração mais utilizada mundialmente, responsável por aproximadamente 80% de todos os procedimentos. Neste tipo de coloração não são empregados corantes diretos, mas sim ingredientes capazes de reagir entre si, modificando a cor da fibra do cabelo a partir

de reações oxidativas, que ocorrem internamente na fibra. Ou seja, a metodologia envolve a mistura de diferentes precursores e aditivos para o desenvolvimento da cor (Figura. 2B). Inicialmente os cabelos são tratados com um agente alcalino (amônia, monoetanolamina, aminometilpropanol) que fazem a abertura da cutícula facilitando a difusão do processo de coloração na estrutura interna do cabelo. Em seguida, dentro da fibra do cabelo, o intermediário primário, geralmente p-aminofenóis ou p-diaminas (ex: p-fenilenodiamina [PPD] e para-toluenodiamina) é oxidado pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) formando um composto imino reativo (p-benzoquinonas iminas ou diiminas). Esse composto formado reage dentro da fibra de cabelo com um acoplador (ex: resorcinol ou maminofenol) formando um corante leuco (incolor), que após etapas seguidas de oxidação formam um composto colorido (Figura 2A). Entretanto, o intermediário primário pode reagir diretamente com o H_2O_2 formando o composto mutagênico denominado Base de Bandrowski's (BROWN; CORBETT, 1979; CORBETT, 1984).

Diferentes tonalidades de cor nos cabelos são obtidas a partir de variações na concentração dos ingredientes descritos acima (NOHYNEK et al., 2010; CORBETT, 1998). O H_2O_2 é empregado em diferentes graduações (20 e 30 volumes) e tem como finalidade oxidar os intermediários primários e catalisar a reação destes com os acopladores. Esta reação resulta em moléculas coloridas de tamanho elevado que são impedidas de sair do córtex do cabelo. Os acopladores não produzem cor quando oxidados sozinhos, mas são utilizados para atingir a cor e a tonalidade desejada (SHANSKY, 2007; PINHEIRO et al., 2002; WOLFRAM, 2001; BROWN, 1997).

As tinturas permanentes deverão permanecer em contato com o cabelo por cerca de 40 minutos (HARRISON; SINCLAIR, 2002). Muitos fatores podem influenciara intensidade e tonalidade da coloração, como, a proporção do agente intermediário e do peróxido de hidrogênio, além da diluição adequada e o tempo de contato com o cabelo (SHANSKY, 2007).

(A)

(B)

Figura 2. (A) A interação entre os ingredientes utilizados em tinturas de cabelos que ocorre dentro da fibra capilar, colorindo permanentemente o fio. Como exemplo de precursor foi utilizado a p-Fenilenodiamina (PPD), estudada neste trabalho. (B) Exemplo de reações que ocorrem durante a coloração permanente dos cabelos.

1.2.2 Coloração semi-permanente

Neste caso, são usados corantes de baixo peso molecular e altamente solúveis, o que facilita a permeação do composto na cutícula capilar. São compostos da família dos ácidos ou corantes diretos e ostentam em sua estrutura principalmente grupos azo e grupos nitro. A Figura 3 ilustra a representação deste tipo de coloração, utilizando como exemplo o corante Basic Red 51 (BR51), estudado neste trabalho.

Esses corantes permanecem ancorados na fibra proteica interna por fracas pontes de Van der Waals, não ocorrendo clareamento. Seu uso é indicado para a cobertura de cabelos brancos e para aumentar o brilho natural do cabelo, e tem duração é de cerca de 6 lavagens (CHISVERT; SALVADOR, 2007; LADEMANN, et al 2008).

Figura 3. Representação da coloração semi-permanente, utilizando o corante Basic Red 51 (BR51), estudado neste trabalho, como exemplo.

1.2.3 Coloração temporária

São colorações fáceis de serem aplicadas, porém a cor é eliminada logo nas primeiras lavagens. Geralmente são utilizado corante do tipo básico (MASUKAWA et al., 2006), como o corante Basic Yellow 57 (BY57), estudado neste trabalho.

Esses compostos são temporariamente depositados na estrutura externa do cabelo por forças iônicas (ROBBINS, 2002), não ocorrendo difusão na estrutura interna dos cabelos e nenhuma mudança na cutícula (Figura 4).

Figura 4. Representação esquemática da coloração temporária, utilizando o corante Basic Yellow 57 como exemplo.

1.3 Constituição da pele humana

A pele humana é o órgão mais extenso do corpo que recebe cerca de um terço da circulação sanguínea (KIELHORN et al., 2006; KANITAKIS, 2002; JAIN, 2001). Este órgão é uma fronteira ativa entre o organismo e o ambiente externo, constituindo a primeira linha de defesa contra agressões externas, como poluentes ambientais, radiação ultravioleta (U.V) e microrganismos (BOUWSTRA et al., 2003).

A pele humana é constituída por duas camadas, a epiderme (camada superior) e derme (camada inferior) (Figura 5). Abaixo da derme, encontra-se a hipoderme, composta por tecido subcutâneo adiposo.

Figura 5: Representação esquemática da pele (Fonte: Adaptado de BROHEM et al., 2010).

A epiderme é um epitélio estratificado avascular que mantém contato direto com o ambiente externo. O principal tipo celular que compõe esta camada são os queratinócitos que se encontram dispostos em subcamadas ou estratos da epiderme e apresentam-se em diferentes fases de maturação (LÉPORI, 2002; JENSEN; PROKSCH, 2010; KHIELHORN et al., 2006;). No estrato germinativo da epiderme, encontram-se os queratinócitos metabolicamente ativos e pouco diferenciados que são capazes de migrar para as camadas superiores aonde vão se diferenciando e mudando suas características iniciais passando da forma arredondada para forma achatada. A ascensão ao estrato granuloso faz com que as células junto da camada basal produzam grânulos lamelares e organelas intracelulares que posteriormente se fundem com a membrana da célula liberando lipídeos, formando a barreira de proteção da pele (LÉPORI, 2002; KHIELHORN et al., 2006). O estrato mais externo é denominado estrato córneo, este representa o estágio final da diferenciação dos queratinócitos, os chamados “corneócitos” (queratinócitos mortos) (LÉPORI, 2002; KHIELHORN et al., 2006; AJANI et al., 2007; WIEDERSBERG et al., 2008). Além dos queratinócitos, na epiderme estão localizadas as células de Langerhans e os melanócitos. As células de Langerhans realizam o controle imune na pele humana (LEONARDI, 2008). Os melanócitos

que se localizam na membrana basal, são os produtores de melanina, o principal pigmento da pele humana responsável pela coloração e proteção contra radiação UV do tipo A e B. A derme é um tecido conjuntivo especializado com características de matrix fibrosa, constituído principalmente por fibroblastos, que são células especializadas responsáveis pela síntese de colágeno e elastina. Na derme encontram-se os folículos do pelo, vasos sanguíneos, vasos linfáticos, glândulas sudoríparas e os nervos sensoriais. A derme fornece nutrientes para a epiderme (WIEDERSBERG et al., 2008) atuando também como uma barreira contra infecções, além de ser responsável pelo armazenamento de água (KHIELHORN et al., 2006).

A permeação de substâncias pela pele ocorre por difusão passiva pela epiderme intacta ou pelos folículos pilosos. Sendo que o folículo piloso é considerado a principal porta de entrada na pele e possui papel fundamental na absorção de toxicantes, facilitando o transporte de agentes externos até a derme. Ainda, por coeficiente de partição, os toxicantes seriam capazes de permear os corneócitos sendo carregados até a derme. Outra teoria é que os toxicantes seriam capazes de contornar os corneócitos nas regiões ricas em lipídeos extracelulares, sendo livremente transportadas podendo atingir a derme (SUHONEN et al., 1999; ANSEL et al., 2000; HADGRAFT, 2001; LEONARDI, 2008)

Nos últimos anos, estudos considerando a permeação via folículo piloso se tornaram de grande interesse (TOLL et al., 2004; AMOH et al., 2004; LAMPEM 2003). Lademann et al., (2008) demonstraram que após processo de tingimento com corante semi-permanente, mesmo após a lavagem dos cabelos, foram encontrados vestígios do corante no folículo, que poderia favorecer a absorção dos compostos.

1.4 Toxicidade dos corantes e ingredientes utilizados em tinturas de cabelo

O uso de tinturas capilares ocorre a partir do desejo de modificar e melhorar a aparência física. No entanto, esse é um processo bastante complexo e envolve múltiplos ingredientes que exercem diversas funções. Após um processo rotineiro de tintura de cabelos, o consumidor entra em contato com diferentes substâncias químicas com as mais diversas características.

Até a década de 1960, acreditavam-se que esses produtos aplicados topicamente permaneciam apenas na pele e, desta forma, apenas efeitos locais eram considerados antes da liberação para o mercado consumidor. Porém, estudos mais recentes têm mostrado que alguns ingredientes de cosméticos podem ser absorvidos, levando a efeitos sistêmicos nos organismos expostos (CORBETT, 1999; NOHYNEK et al., 2010). Por isso, os possíveis

efeitos tóxicos decorrentes da exposição da população a produtos cosméticos vêm sendo reavaliados por diversos autores, utilizando ensaios toxicológicos mais modernos (NOHYNEK et al., 2010).

O risco de efeitos tóxicos decorrentes do uso de cosméticos deve ser avaliado levando-se em consideração o seu modo de aplicação, tempo de contato, área de superfície de aplicação, composição da formulação, além da importância de outras características como a permeação e dados toxicológicos (BRASIL, 2004). Uma estratégia para a avaliação do risco e a segurança do uso de tinturas de cabelos envolve a realização de ensaios de toxicidade aguda, subcrônica, além da investigação de irritação e sensibilização dérmica, absorção percutânea, genotoxicidade e carcinogenicidade para as formulações e seus precursores isolados e/ou combinados. (NOHYNEK et al., 2004; PLATZEK, 2007). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é responsável pela autorização de comercialização de produtos cosméticos, por meio de notificação e registros, além de fiscalizar as empresas fabricantes, verificando o processo de produção, as técnicas e os métodos empregados até o consumo final (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA a, 2013). De acordo com a Agência, antes de um produto ser lançado no mercado, a segurança deve ser avaliada pelo próprio fabricante ou importador por meio de diversos ensaios toxicológicos como: toxicidade sistêmica aguda; corrosividade e irritação dérmica; sensibilização cutânea; absorção/penetração cutânea; mutagenicidade/genotoxicidade; toxicidade subaguda e subcrônica; irritação ocular; irritação de mucosas; efeitos tóxicos induzidos pela radiação UV (fototoxicidade, genotoxicidade, fotoalergia, carcinogenicidade, toxicidade do desenvolvimento e reprodutiva (teratogenicidade) e toxicocinética e toxicodinâmica (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA a, 2013).

Uma das grandes preocupações em relação à segurança das tinturas é em relação à presença de amins aromáticas em algumas formulações ou formadas indiretamente devido ao complexo processo de degradação dos corantes do tipo azo (AMES et al., 1975; GOLKA et al., 2004). Esses corantes são caracterizados pela presença de um ou mais grupamentos (-N=N-) ligados a sistemas aromáticos (KUNZ et al., 2002) e a clivagem deste grupamento azo pode resultar na liberação das amins. Esse processo pode ocorrer a partir de reações de oxidação (ZANONI et al., 2013) ou por reações de redução (LIZIER et al., 2012). Grande parte das amins aromáticas são compostos biologicamente ativos e podem ser absorvidos percutaneamente, podendo ser tóxicas aos mamíferos (NOHYNEK et al., 2004) por apresentar propriedades mutagênicas e/ou carcinogênicas (KIRKLAND et al., 2005).

Na década de 70, Ames et al., (1975) relataram que mais de 90% dos ingredientes utilizados em tinturas de cabelo eram mutagênicos. Desde então, diversos estudos epidemiológicos foram realizados com a finalidade de definir o risco real da exposição a essas substâncias, no entanto, os resultados são bastante controversos. (CZENE et al., 2003; NOHYNEK et al., 2004; BOLT; GOLKA, 2007; GOLKA et al., 2008)

Alguns ingredientes empregados em tinturas permanentes tais como a PPD, o tolueno-2,5-diamina (PTD) e o resorcinol foram descritos como substâncias altamente sensibilizantes para a pele humana, capazes de induzir a alergia de contato (SCCNFP/0129/99; NOHYNEK et al 2004; SØSTED et al., 2004; SEO et al., 2012). Um estudo recente indicou que alguns dos ingredientes frequentemente empregados em tinturas permanentes, tais como, o H_2O_2 e a monoetanolamina (MEA) foram responsáveis pelo desenvolvimento de dermatite de contato e pela perda de pelos em ratos (SEO, et al., 2012).

Em 2006, a PPD foi classificada pela Sociedade Americana de Alergia de contato como o “alérgeno de contato do ano”. Na Alemanha e França essa substância foi banida entre 1906 a 1980, e novamente liberada na Europa posteriormente, sendo um dos precursores mais utilizados nas tinturas permanentes. Hoje, é conhecido que a exposição aguda humana à PPD pode causar graves tipos de dermatites, irritação nos olhos, asma, gastrite, insuficiência renal, vertigem, tremores, convulsões e coma em seres humanos (U.S. ENVIROMENTAL PROTECTION AGENCY, 1985; De LEO; 2006) e por isso ela merece especial atenção.

Estudos epidemiológicos baseados em toxicologia genética demonstraram que a exposição ocupacional a tinturas de cabelo causou um aumento na frequência de aberrações cromossômicas (HOFER; BORNATOWICZ, 1983; SARDAS et al., 1997).

Galioette et al (2008), utilizando o ensaio do Cometa, verificaram que os cabeleireiros expostos aos corantes de cabelo apresentaram maior frequência de quebra de DNA quando comparados ao grupo controle que não sofreu exposição.

Gago Dominguez, et al. (2001) associaram o risco de desenvolvimento de câncer de bexiga com a exposição ocupacional à corante de cabelos permanentes. Apesar de raros, testes de genotoxicidade têm mostrado resultados positivos para alguns corantes de cabelo e seus ingredientes (KALOPISSIS, 1988; GAYLOR et al 1995), bem como para seus precursores (LYNCH et al, 1998). Entre os anos de 1992 e 2005, trinta e um artigos foram publicados associando PPD à incidência de câncer, como linfoma não-Hodgkins, mieloma múltiplo, leucemia aguda e câncer de bexiga (ROLLINSON et al, 2006).

Além disto, alguns autores têm demonstrado que alguns ingredientes utilizados em tinturas de cabelos podem agir como desreguladores endócrinos (LYNCH et al., 2002).

Considerando esses e outros estudos que mostravam os potenciais tóxicos de tinturas capilares, a União Europeia decidiu adotar novas estratégias para garantir uma avaliação mais precisa e segura frente à exposição desses compostos (SCCP/0959/05). Sendo assim, desde 2006, o uso de 22 corantes de cabelos foram banidos por terem sido considerados não seguros.

Por outro lado, os dados que relacionam os efeitos carcinogênicos de ingredientes de tinturas ainda são bastante discrepantes. HELZLSOUER et al., (2007), após revisão da literatura chegaram à conclusão que não existem dados consistentes que retratem o real risco do desenvolvimento de câncer a partir da exposição aos corantes de cabelos. Em 2007, PLATZEC et al., apontaram que os resultados dos estudos que avaliam a genotoxicidade dos precursores das tinturas de cabelos não são conclusivos, sugerindo a necessidade de novos estudos que avaliem o potencial genotóxico e sensibilizante das tinturas.

Estudos epidemiológicos que investigam a associação entre exposição à corante de cabelo e o câncer de bexiga forneceram resultados ainda considerados inconclusivos (HENNEKENS et al., 1979; HOWE et al., 1980; NAJEM et al., 1982; OHNO et al 1985; NOMURA et al 1989; KOGEVINAS et al., 2006; GAGO DOMINGUEZ et al, 2001a; SILVERMANS et al, 2005).

Segundo Gago-Dominguez et al., (2001a) o uso de corantes semi-permanente e temporários não demonstrou relação com o aumento da incidência de câncer de bexiga para ambos os sexos, mas pode estar associada a um aumento de 30% de aumento na incidência de câncer de mama (GAGO-DOMINGUEZ et al, 2001b). Apesar de alguns estudos *in vitro* alertarem sobre o potencial carcinogênico de alguns componentes das tinturas de cabelo (IARC, 2010; NOHYNEK, 2004), de forma geral os estudos epidemiológicos que investigam a incidência de câncer em decorrência da exposição a corantes de cabelo em usuários desses compostos apresentam dados discrepantes que precisam ser melhor investigados para definir o real risco do uso destas formulações (KIRKLAND et al., 1981; CHO et al, 2003).

A Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer (IARC), recentemente concluiu que a exposição ocupacional a tinturas de cabelo, como nos casos de cabeleireiros ou barbeiros, poderia induzir à formação de câncer, enquanto que o uso pessoal das colorações capilares não poderia ser classificado como carcinogênico para humanos (HUEBER-BECKER et al., 2004). Por outro lado, alguns trabalhos sugerem que mesmo o uso pessoal das tinturas pode aumentar a incidência de câncer de bexiga (GAGO-DOMINGUES et al., 2002; HUNCHAREK; KUPELNICK, 2005).

É conhecido na literatura que corantes de cabelo são capazes de penetrar na pele (GRAMS et al., 2003). Entretanto, apenas um estudo relacionando toxicidade a queratinócitos em decorrência da exposição a corantes de cabelos foi encontrado, sendo o principal foco a fototoxicidade apresentada pelos corantes e não a toxicidade intrínseca da substância (YU et al., 2008). Desta forma, torna-se importante e necessária a investigação toxicológica envolvendo células de constituição normal da pele, a fim de melhor compreender os possíveis mecanismos de ação desses corantes que são largamente comercializados levando-se em consideração a exposição dérmica sendo a primeira via de contato e a principal área da aplicação desses produtos.

Esta revisão da literatura aqui apresentada sobre a toxicidade dos corantes de cabelo é parte do artigo de revisão listado abaixo, que foi aceito para publicação na Química Nova (Anexo A).

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.

Neste trabalho, avaliamos a toxicidade de corantes e da PPD utilizando diversos ensaios em células da pele, que serão apresentados a seguir.

1.5 Morte celular programada

Em 1972, KERR e colaboradores descreveram a morte celular programada, que foi identificada em diversos tecidos e células, com mecanismos distintos da morte por necrose. Nas últimas décadas, a morte celular programada virou sinônimo de apoptose. O processo apoptótico possui características próprias como a diminuição do volume celular, condensação da cromatina e desintegração celular que culmina na formação de corpos apoptóticos que podem ser eliminados por fagocitose (WYLLIE et al., 1980).

A apoptose é fundamental para que ocorra a manutenção das funções vitais de um organismo. Sua principal função é a de manter a homeostase de um organismo durante seu desenvolvimento e envelhecimento (NORBURY; HICKSON, 2001).

Já a necrose é um termo utilizado para descrever morte celular accidental ou não programada (FABER, 1994; KANDUC et al., 2002). Morfologicamente a necrose é caracterizada pela ruptura da membrana plasmática, pelo entumescimento de organelas citoplasmática seguida da ruptura da membrana plasmática (MAJNO; JORIS, 1995; KROEMER et al., 2009; EDINGER; THOMPSON, 2004), resultando na ativação do processo inflamatório através de sinalização celular que culmina na ativação do sistema

imune EDINGER; THOMPSON, 2004; FESTJENS et al., 2006; ZITVOGEL et al., 2004), com consequente morte de tecidos adjacentes (FESTJENS et al., 2006; ZONG; THOMPSON, 2006; YUAN, 2006).

Desta forma, sugere-se que o acúmulo excessivo de danos celulares pode levar a morte celular por necrose. Outra situação possível no desenvolvimento da necrose ocorre quando, na ausência da fagocitose, os corpos apoptóticos perdem sua integridade e prosseguem para a apoptose secundária (tardia) (MAJNO; JORIS, 1995).

O processo apoptótico pode ser induzido por estímulos fisiológicos ou patológicos, que resultam em sinalização celular. As duas principais vias apoptóticas são denominadas Via Intrínseca (mitocondrial) e a Via Extrínseca (receptores de morte celular) (ELMORE, 2007; AMARANTE-MENDES; GREEN, 1999).

Quando há ativação da Via Intrínseca, a morte celular é desencadeada por estímulos que provêm do interior da célula, que podem ocorrer após lesões celulares tais como danos no DNA, desestruturação do citoesqueleto, alterações no retículo endoplasmático ou modificações citoplasmáticas. Nessas situações, ocorre à liberação do citocromo c. A seguir, ocorre à formação de um complexo heptamérico denominado apoptossomo, compreendido pelas proteínas Apaf1, caspase 9 e dATP. Depois de formado o apoptossomo, as moléculas de caspase-9 são capazes de ativar as caspases efetoras -3, -6 e -7, resultando na clivagem de substratos específicos e nas mudanças morfológicas e bioquímicas que caracterizam a apoptose (Figura 6) (HENTGARDNER, 2000).

A Via Extrínseca é iniciada quando as proteínas da família do fator de necrose tumoral (TNF) ex: (FasL, TNF-alpha e TRAIL), estão presentes no espaço extracelular e são capazes de estimular seus receptores de morte específicos (Fas, TNFRI e DR4/DR5, respectivamente) (WAJANT, 2002). A partir dessa estimulação, inicia-se a ativação das cascatas bioquímica iniciadoras das caspases 8 e 10, que ativam diretamente as caspase efetoras, ou integram as duas vias de sinalização apoptótica através da clivagem da proteína pro-apoptótica Bid, a qual deverá se deslocar do citosol para a mitocôndria ativando também a Via Intrínseca (Figura 6) (WAJANT, 2002).

fase de crescimento. A mitose (M) é composta pela prófase, metáfase, anáfase e telófase, é nessa fase ocorre à divisão celular propriamente dita (BRUCE et al., 2002; SCHAFER, 1998).

Figura 7. Principais fases do ciclo celular. As fases S (síntese), M (Mitose) e as fases de intervalos extras G1 e G2.

Quando ocorrem erros na fase de replicação, ocorre atraso do ciclo celular, desta forma, as células não progridem e podem entrar em estado de inativação (G0) que pode perdurar por longos períodos, antes de continuar a proliferação (ALBERTS et al., 2004).

A descoberta das ciclinas e do complexo das ciclinas kinases (CDks) auxiliou na elucidação dos mecanismos de controle de transcrição e sinalização celular. A progressão do ciclo celular é regulada por subunidades catalíticas, ciclinas dependentes de quinase, as chamadas CDks, bem como subunidades de ativação, designadas ciclinas. As subunidades catalíticas Cdk e as ciclinas desempenham papel fundamental durante as diferentes fases do ciclo celular. As CDks são expressas nas células e reguladas por diferentes Ciclinas que são expressas ou degradadas de acordo com a fase do ciclo celular em que a célula se encontra. Desta forma, diferentes complexos Ciclina/CDK são ativados durante as diferentes fases do ciclo celular (SHERR, 1993).

Além das ciclinas e CDks, outros pontos de checagem são fundamentais ao longo do ciclo celular, pois garantem que este se propague apenas quando as células tiverem cumprido exigências tais como a completa replicação do DNA. Esse tipo de controle é essencial para atrasar a mitose até que a replicação do DNA tenha se completado na fase S, ou até que os

reparos sejam realizados adequadamente. Os genes envolvidos no bloqueio da divisão celular são chamados genes supressores de tumor, como exemplo, a proteína p53 (DIAMANTIS, 1994). Deste modo, a p53, é responsável por aumentar a transcrição de genes fundamentais que participam na modulação do processo de reparo do DNA (MOLDOVAN et al., 2007). Em células que sofreram danos no DNA, ocorre geralmente o aumento da expressão do gene p53, que também pode levar a morte celular por apoptose na tentativa de eliminar erros que poderiam ser perpetuados (VOUSDEN; LANE, 2007; KO; PRIVES 1996; VOGELSTEINS et al., 2001).

A inativação da p53 pode resultar na divisão celular contendo danos no DNA. De acordo com a literatura, mutações no gene p53 são frequentemente encontradas em aproximadamente 50% dos cânceres humanos (DIAMANTIS, 1994).

Além disso, a p21 possui também papel fundamental na modulação de processos de reparação do DNA, por inibição do ciclo celular (MOLDOVAN et al., 2007). A p21 pode inibir uma ampla gama de complexos ciclina/Cdks, com uma preferência por aqueles contendo Cdk2 (HARPER et al., 1995).

Ainda, foi demonstrado que a redução na expressão de p21 está associada com a presença de metástases e, provavelmente, com grande instabilidade genética (CECCARELLI et al., 2001; BUKHOLM; NESLAN, 2000).

A progressão do ciclo celular é regulada por ativação ou inibição da fosforilação das subunidades Cdks. Diferentes estágios do ciclo apresentam pontos de controle (DRAETTA, 1990). Foram descritos mecanismos adicionais para inativação dos complexos Cdk, como, as proteínas regulatórias, que ao se ligarem no complexo ciclina-Cdk podem inibi-lo (EL-DEIRY et al., 1993). Quando as células são expostas a algum tipo de estresse, como agentes que podem danificar o DNA, ocorre uma regulação negativa no ciclo celular; as Cdks ativas são inibidas por proteínas regulatórias que interrompem o ciclo celular em sua fase G1 ou G2, impedindo que a célula passe para a próxima fase antes que o seu DNA seja reparado (COHEN; ELLWEIN, 1990; SHERR; ROBERTS, 1995).

O controle do ciclo celular é muito importante na regulação do número de células nos tecidos do corpo. Quando o sistema apresenta uma falha, ocorrem divisões celulares excessivas, podendo levar a lesões proliferativas.

1.7 Genotoxicidade e Mutagenicidade

Estudos experimentais e epidemiológicos indicam que diversas substâncias químicas podem induzir a danos no material genético, contribuindo para o processo de carcinogênese. Entre esses danos, destacam-se a formação de adutos no DNA, quebras da cadeia do DNA, mutações em genes, aberração cromossômica, aneuploidia e mudanças no perfil de metilação do DNA (IARC, 2006).

O dano no DNA ou genotoxicidade pode ocorrer por ação direta de um composto, pela formação de um composto tóxico após metabolização ou através da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS). A lesão direta no DNA pode contribuir para que ocorram danos estruturais ou funcionais (WEISBURGER, 1999).

Considera-se uma substância mutagênica quando ela favorece a transmissão de danos no DNA de uma célula mãe para suas células filhas (SANTELLI, 2003). As mutações são responsáveis por inúmeras doenças hereditárias humanas, incluindo o câncer (GRIFFITHS, 1998a). As mutações podem ser formadas espontaneamente ou pela indução de agentes químicos (mutágenos), esse tipo de dano pode ocorrer em diferentes níveis, em cromossomos ou em genes. Em mutações cromossômicas, parte do cromossomo ou cromossomos inteiros sofrem alterações. Enquanto em mutações gênicas, genes específicos são mutados (GRIFFITHS et al, 2001 b).

Quando ocorrem danos ao material genético, os *checkpoints* do ciclo celular serão ativados ocasionando parada do ciclo, essa etapa é fundamental, pois garante tempo para que ocorra a ativação do sistema de reparo. Quando o reparo ocorre corretamente, as células deverão prosseguir normalmente o ciclo celular. Se caso o reparo não for correto, o ciclo celular poderá ser permanentemente bloqueado levando a um processo de envelhecimento ou morte por apoptose. Caso os danos permaneçam, a célula prossegue a divisão e a mutação se manifesta, podendo levar à oncogênese (Figura 8) (HOUTGRAAF et al., 2006).

Figura. 8: Fluxograma representativo de vias ativadas após detecção de danos no DNA. (Fonte: HOUTGRAAF et al., 2006).

O avanço da biologia molecular exige que novas metodologias sejam incorporadas aos testes clássicos de citogenética. Diversos mecanismos moleculares atuam na manutenção da integridade do genoma celular, deste modo, torna-se importante elucidar os mecanismos pelos quais os compostos possam interagir com o DNA. A tecnologia genômica tem como alvo predominante o estudo detalhado dos genes, esse avanço, permitem que um sistema complexo seja mais bem compreendido a nível molecular. Vários estudos com relação à genômica têm sido utilizados para avaliar a toxicidade e eficácia de fármacos (GERHOLD et al., 2002; KELL, 2006).

Atualmente, é reconhecido que o entendimento dos efeitos de ingredientes usados em tinturas de cabelos requer estudos em nível molecular (YOUNG-JIN-SO et al., 2011).

1.8 Estresse oxidativo

Um dos grandes mecanismos responsáveis pelo dano ao material genético é a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), sendo a pele um alvo importante destas espécies. Existem inúmeras fontes exógenas capazes de contribuir para formação de radicais livres na pele humana, como radiação ultravioleta (UV) e agentes químicos (NACHBAR;

KORTING, 1995). Endogenamente, os radicais livres podem ser formados a partir do metabolismo celular em condições normais ou patológicas (HALLIWELL; CROSS, 1994).

A origem de EROs em um organismo pode ser muito diversificada, no entanto, as espécies produzidas são sempre as mesmas. Essas espécies reativas de oxigênio podem ser de origem radicalar tais como (superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroxila ($\bullet OH$), peroxil (RO_2) e alcóxil (RO), existem ainda as espécies não radicalares que podem ser convertidas em radicais de forma simples, como o ácido hipocloroso ($HOCl$), ozônio (O_3), peroxinitrito ($ONOO^-$), oxigênio singlete e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (HALLIWELL; GUTERIDGE, 2007). Os radicais livres são produzidos a partir da redução molecular do oxigênio em estágios intermediários, conforme descrito abaixo:

(Fonte: KEVIN et al., 2002).

Em baixos níveis, o ânion superóxido ($\bullet O_2^-$), radical hidroxila ($OH^\bullet$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio molecular (O_2) participam de inúmeros processos tais como: proliferação celular, diferenciação celular, apoptose e respostas imunológicas. A produção excessiva ou remoção inadequada de EROs pode resultar em estresse oxidativo. O estresse oxidativo contribui para o desenvolvimento de patologias em tecidos, e são resultantes de alterações celulares entre outros efeitos como: alterações nos processos metabólicos, erros de sinalização celular e danos biomoleculares. Os danos biomoleculares resultantes do estresse oxidativo frequentemente levam a peroxidação lipídica (descrita a seguir) o que podem resultar em mutações, inativação ou ativação de enzimas ou oxidação e degradação de proteínas (MIYACHI, 1988).

Os lipídeos são componentes essenciais da membrana celular, pois, garantem a sua estrutura e manutenção (ESTERBAUER, 1993). Os ácidos graxos poliinsaturados são abundantes em células e altamente susceptíveis à oxidação. A peroxidação lipídica ocorre a partir da retirada de um átomo de hidrogênio bis-alílico de um ácido graxo ou a partir da oxidação do ácido graxo por um radical livre. Durante o processo de iniciação da peroxidação

lipídica, o ácido graxo sofre ataque dos radicais livres sendo oxidado ao radical $L^\bullet$. Já na fase de propagação, o radical formado $L^\bullet$ reage com o oxigênio O_2 , formando o radical peroxil ($LOO^\bullet$), este novo radical interage com uma nova molécula de ácido graxo gerando mais um radical $L^\bullet$. A decomposição do hidroperóxido lipídico ($LOOH$) pode ser catalisada por metais como o cobre e o ferro, gerando LOO e radical $LO^\bullet$, que participam da propagação da cadeia radicalar. A interrupção do processo radicalar ocorre pela interação de duas espécies radicalares, onde se forma o ácido carbonílico no estado fundamental ($L=O$) ou no estado excitado triplete ($^3L=O$) e os álcoois correspondentes (LOH) (ABDALLA; FAINE, 2008). Deste modo, a peroxidação lipídica é autocatalítica, levando a formação de hidroperóxidos e produtos secundários gerando substâncias genotóxicas que contribuem para a perda da integridade do DNA (BARBER; THOMAS, 1978; PRIOR, 1981; AIKENS, 1994; MARNETT, 1994). Abaixo, encontra-se a representação esquemática da peroxidação lipídica.

(Fonte: ABDALLA; FAINE, 2008)

Um tipo de dano biomolecular consequente da peroxidação lipídica é a formação de malonaldeído (MDA). Diversos estudos demonstram que o MDA é mutagênico em bactérias e células de mamíferos (SHAMBERGER et al., 1980; MARNETT et al., 1985; YONEI; FURUI, 1983; BASU; MARNETT, 1983; MARNETT, 1985; BENAMIRA, 1995), além de ser carcinogênico em ratos (SPALDING, 1988).

1.9 Oxidação do DNA

A detecção de adutos do DNA é essencial para a elucidação de mecanismos de ação de mutagênese e carcinogênese. Durante muitos anos, eles foram classificados como eventos

resultantes da exposição de agentes químicos carcinogênicos. No entanto, nos últimos 25 anos, os adutos de DNA encontrados em células, tecidos de humanos e animais foram correlacionados em situações não relacionadas à carcinogênese (AMES 1989; DEDON, 2008; MARNETT, 2000; SWENBERG et al., 2008).

Como já citado, muitas doenças humanas adquiridas e hereditárias são originadas de alterações da estrutura do DNA, como a interação de agentes químicos genotóxicos com a molécula do DNA. Em geral, esses agentes são substâncias eletrofílicas diretas, ou substâncias que são metabolizadas durante o processo de detoxificação química. Esses compostos são atraídos por moléculas de alta densidade, como por exemplo, as bases do DNA, onde se ligam efetivamente formando os adutos (BARTSCH, 1996). Inúmeras bases do DNA e cadeias açúcar-fosfato são alvos de substâncias químicas capazes de formarem adutos, no entanto a base mais susceptível a esse tipo de ataque é a guanina (DIPPLE, 1995).

Modificações na estrutura do DNA podem resultar em alterações no código genético, o que certamente contribui para o mau funcionamento celular. A remoção inadequada desses adutos pode resultar ainda em mutação, morte celular e até mesmo em desenvolvimento do câncer (FARMER et al., 2004; SEDGWICK et al., 2007)

Muitos dos danos no DNA correspondem a oxidações de bases (DOUKI et al., 1998; CADET et al., 1999). A identificação de compostos capazes de levar esse tipo de oxidação vem sendo estudados (RAVNAT et al., 2000).

Os danos oxidativos do DNA, não são resultantes diretos de substâncias químicas, por isso não são considerados adutos. Na oxidação do DNA ocorre uma lesão ocasionada por interação de EROS ou espécies reativas de nitrogênio (RNS) com o DNA (MANGAL et al., 2009; BANOUB; LIMBACH, 2010; CADET et al., 2010; ANDREOLI et al., 2011). A interação dessas espécies reativas pode resultar em diferentes tipos de danos ao DNA. Na literatura são descritos cerca de 40 tipos distintos de modificação de DNA e RNA, provenientes da interação entre as bases com espécies reativas (CADET et al., 2010; CADET et al., 2011).

O tipo de oxidação mais extensivamente estudado é a 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodG), formada a partir de oxidação monoelétrica e pelo ataque do radical $\text{HO}^\bullet$ (CADET et al., 2008). A 8-oxodG é uma lesão mutagênica descrita em bactérias e células de mamíferos, que bloqueia o processo de transcrição ou favorecem a transversão G: T. e T: A (BASSET-SEGUIN et al., 1994; PIERCEALL, 1991).

Segundo Yan An et al., 2004, o aumento dos níveis de 8-oxodG estão correlacionados o aumento da incidência de câncer de pele em indivíduos expostos ao arsênico. Ainda,

estudos correlacionam o aumento dos níveis de 8-oxodG com o desenvolvimento de diversos tipos de câncer (KRYSTONA et al., 2011). Outras doenças como diabetes e artrite reumatoide também foram associadas ao aumento de 8-oxodG (HAJIZADEH et al., 2003; SIMONE et al., 2008; ROSSNER et al., 2009; BROEDBAEK et al., 2011).

Ainda, agentes oxidantes de fonte endógena ou exógena podem exercer função genotóxica (von SONNTAG, 1987; BREE; MURPHY, 1995), no entanto, ambas as situações são decorrentes de danos no DNA, ou são ocasionadas por reações entre biomoléculas que levam a formação de espécies eletrofílicas altamente reativas, capazes de reagir com o DNA (CHAUDHARY et al., 1994; LINDAHL, 1993, AMES 1991).

O produto formado a partir da peroxidação lipídica, o malonaldeído (MDA) é um exemplo da via indireta, ocasionada pelo ataque de EROS aos ácidos graxos poliinsaturados (MUKAI, 1976).

O MDA é um aldeído altamente eletrofílico, por esta razão, ele pode reagir com o DNA resultando na formação de uma variedade de adutos. O principal aduto formado a partir dessa reação é o pirimidol[1,2-alfapurina]-103(3H)um (M1dG) (BASU et al., 1983; SPALDING et al., 1988). Esse aduto é de origem endógena e é gerado a partir da peroxidação lipídica e da peroxidação do DNA (BASU; MARNETT, 1988; DEDON et al., 1998; ZHOU et al., 2005).

Frente ao exposto, a quantificação de lesões ao DNA é uma ferramenta importante que contribui para a elucidação dos mecanismos envolvidos em processos genotóxicos desencadeados pela exposição aos mais diferentes tipos de xenobióticos, incluindo os corantes de cabelos.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Basic Red 51 (BR51)

- O BR51 apresentou potencial citotóxico para as células normais da pele humana (fibroblastos e queratinócitos) e para células tumorais, além de alta inibição na formação de novos clones após incubação com doses baixas em fibroblastos e queratinócitos;
- O corante BR51 apresentou citotoxicidade para células HaCaT com IC_{50} 13 μ g/ml, após 24 horas, resultando em morte celular por apoptose. Além disso, esse composto induziu à parada no ciclo celular em G2/M em queratinócitos e G1 em fibroblastos;
- A metabolização da mistura entre BR51/H₂O₂ *in vitro*, induz a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs);
- O BR51 isolado ou combinado com H₂O₂, induziu ao estresse oxidativo em HaCaT, resultando na oxidação do DNA por formação do aduto do tipo 8-oxodG;
- Em pele artificial (3D), confirmamos que o corante induz à morte por apoptose nos queratinócitos, além de diminuir a espessura da epiderme. Nesse modelo, não existem indícios de aumento de citocinas inflamatórias;
- O BR51 não é capaz de induzir mutação por substituição de pares de base ou deslocamento do quadro de leitura em *Salmonella*;
- O corante BR51 foi considerado o mais tóxico para as células da pele, quando comparados aos demais estudados;
- Frente ao exposto, sugerimos que este composto seja utilizado com cautela em produtos cosméticos.

p-Fenilenodiamina (PPD)

- A PPD é mais citotóxica para fibroblastos, seguida de HaCaT e melanoma, após 24 e 48 horas de incubação. A exposição prolongada em doses baixas inibe a formação de novos clones em fibroblastos e queratinócitos;
- A mistura entre PPD/H₂O₂ e PPD/H₂O₂/R nas condições testadas, resulta na liberação de radicais hidroxila (OH•);
- A Base Brandrowisk é formada após auto oxidação da PPD;
- Nas condições testadas, a PPD e a mistura PPD/H₂O₂ aumenta os níveis EROS intracelular, contribuindo para a peroxidação lipídica caracterizada pelo aumento de MDA;

- A presença de EROs induz também à oxidação do DNA, avaliado pela identificação do aduto 8-OxodG, sendo este o principal mecanismo de mutagenicidade;
- A expressão aumentada de genes associados à indução de EROS (HO-1 e OGG-1) na pele humana confirma o mecanismo de ação tóxica da PPD e suas respectivas misturas observado nos ensaios em monocamada;
- A exposição da pele à PPD e suas respectivas misturas estudadas ativa o sistema imune, por meio do aumento da expressão de IL4;
- O aumento da expressão da NOX-1 na epiderme após exposição à PPD/H₂O₂/R confirma que ainda mais radicais livres são formados durante o processo de tintura;
- A PPD foi o composto que mais apresentou indução a estresse oxidativo quando comparado aos demais corantes estudados;

Basic Yellow 57 (BY57)

- A citotoxicidade do BY57 é pronunciada em melanoma SK-Mel-103 em comparação às células normais da pele (queratinócitos e fibroblastos);
- Os queratinócitos são mais resistentes à inibição de clones que os fibroblastos;
- O BY57 e a sua mistura H₂O₂ não formam espontaneamente radicais livres *in vitro*, no entanto, a exposição ao BY57 e BY57/H₂O₂ aumenta os níveis intracelulares de EROS em HaCaT.
- O aumento dos níveis intracelulares em HaCaT levam a peroxidação lipídica, caracterizada pelo aumento de MDA;
- Apenas a mistura entre BY57/H₂O₂ é capaz de causar danos oxidativos no DNA (8oxodG);
- Ensaio com Salmonella foi negativo, desta forma o BY57 não produz mutação do tipo de deslocamento de leitura ou substituição de pares de bases;
- O BY57 foi o corante considerado menos tóxico em HaCaT e fibroblastos quando comparado aos outros corantes estudados nessa técnica.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABDALLA, D, S, P. **Fundamentos de Toxicologia**. In: SEIZI OGA. Radicais livres e antioxidantes. São Paulo: Atheneu, 2003. P. 37-56.

AEBY, P.; SIEBER, T.; BECK, H.; GERBERICK, G.F.; GOEBBEL, C. Skin sensitization to p-phenylenodimane: the diverging role of oxidation and N-acetylation for dendritic cell activation and the immune response. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 129, n.3, p. 99-109, 2009.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA) a: Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Cosmeticos>. Acesso em Junho 2013.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA) b: Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/guia/guia_cosmeticos_final_2.pdf. Acesso em Junho 2013.

AHMAD, N.; MUKHTAR, H. Cytochrome p450: a target for drug development for skin diseases. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 123, n. 3, p. 417-425, 2004.

AIKENS, J.; DIX, T.A. Peroxy radical (HOO•) Initiated lipid peroxidation- The role of fatty-acid hydroperoxides. **Journal Biology Chemistry**, v. 266, p. 15091-15098, 1991.

AJANI, G.; SATO, N.; MACK, J. A.; MAYTIN, E.V. Cellular responses to disruption of the permeability barrier in three-dimensional organotypic epidermal model. **Experimental cell research**, New York, v. 313, n. 14, p. 3005-3015, 2007.

ALBERTS, B; JOHNSON, A; LEWIS, J; RAFF, M; ROBERTS, K. **Biologia Molecular da Célula**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

AMARANTE-MENDES, G.P.; Green, D.R, The regulation of apoptotic cell death. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, n.9, p. 1053-1061, 1999.

AMBROSE, R.B. Life time occupation, smoking, caffeine, saccharine, hair dyes and bladder carcinogenesis. **International Journal of Epidemiology**, London, v. 7, p. 200-212, 1982.

AMES, B. N.; KAMMEN, H. O.; YAMASAKI, E. Hair dyes are mutagenic: identification of a variety of mutagenic ingredients. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America**. v. 72, p. 2423-2427. 1975.

AMES, B.N.; GOLD, L.S. Endogenous mutagens and the causes of aging and cancer. **Mutation Research**, v.250, n.3, p. 3-16, 1991.

AMES, B. N. Endogenous DNA damage as related to cancer and aging. **Mutation Research**, v. 1, p, 41-46, 1989.

AMOH, Y.; LI, L.; YANG, M.; MOOSA, A. R.; KATSUOKA, K.; PENMAN.S.; HOFFMAN, R.M. Nascent blood vessels in the skin arise from nestin-expressing hair follicle cells. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America**. Washington, v. 101. n. 36. p. 13291-13295, 2004.

ANDREOLI, R.; MUTTI, A.; GOLDONI, M.; MANINI, P.; APOSTOLI, P.; DE PALMA, G. Reference ranges of urinary biomarkers of oxidized guanine in (2'-deoxy)ribonucleotides and nucleic acids. **Free Radical Biology & Medicine**. v.50,p. 254-261, 2011.

ANDREW, A, S.; SCHNED, A, R.; HEANEY, J.A.; KARAGAS, M,R. Bladder cancer risk and personal hair dye use. **International Journal of Cancer**. New York, v. 109, n. 4, p. 581-586, 2004.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, L. V. **Farmacotécnica formas farmacêuticas e sistema de liberação de fármacos**. São Paulo: Editorial Premier, 6^o ed. v. 307, p, 288-291, 2000.

ANTHONY, H.M.; THOMAS, G.M.; COLE, P.; HOOVER, R. Tumors of the urinary bladder: an analysis of the occupations of 1,030 patients in Leeds, England, **Journal of the National Cancer Institut**, v. 46, p. 1111-1113, 1971.

ARNAUD, J. J; BORÉ, P. Isolation of melanin pigments from human hair. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, New York, v. 32, n.16, p. 137-152, 1981.

BANAT, I. M.; NIGAM, O.; SINGH, D.; MARCHANT, R. Microbial decolorization of Textile dye containing effluents: A Review. **Bioresources Technology**, London, v. 58, n. 7, p. 217-227, 1996.

BANOUB, J.H.; LIMBACH, P.A. **Mass spectrometry of nucleosides and nucleic acids**. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 1^oED, 2010.

BARBER, D.J.; THOMAS, J.K. **Reaction of radicals with lecithin bilayers**. Radiation Research: April 1979, v. 74, n.1, pp. 51-65.

BARTSCH, H. DNA adducts in human carcinogenesis: etiological relevance and structure-activity relationship. **Mutation Research**, v. 340, n.3, p.67-79, 1996.

BASET-SEGUIN, N.; MOLES, V.; MILS, O. DEREURE, J.J.; GUILHOU, G. TP53 tumor suppressor gene and skin carcinogenesis, **Journal of Investigative Dermatology**, v. 103, p. 102S-106S, 1994. Supplement.

BASU, A. K.; MARNETT, L. J. Unequivocal demonstration that malonaldehyde is a mutagen. **Carcinogenesis**, v.4, n. 3, p. 331-333, 1983.

BASU, T.K; Temple, N.J, Garg, M. L. **Antioxidants in human health and disease**, London: British Library; 1999, 451p.

BENAMIRA, M.; JOHNSON, K, CHAUDHARY, A.; BRUNER, K.; TIBBETS, C.; MARNETT, L.J. Induction of mutation by replication of malonaldehyde-modified M13 DNA in Escherichia coli: determination of the extent of DNA modification, genetic requirements for mutagenesis, and types of mutation induced. **Carcinogenesis**, v. 16, n. 1, p. 93-99, 1995.

BENZIE, I, F. F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. **International Journal of Food Sciences & Nutrition**, v. 61,n. 47, p. 233-261, 1996.

BERGER, P.; LEITNER, N.K.V.; DORE, M.; LEGUBE, B. Ozone and hydroxyl radicals induced oxidation of clycine. **Water Resources**, v. 33, p. 433-441, 1999.

BERNSTEIN, L., KALDOR, J., MCCANN, J., PIKE, M.C.. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from Salmonella test. **Mutation Research**, v.97, p.267-281, 1982.

BLOMEKE, B.; PIETZCH, T.; MERCK, H.F. Elicitation response characteristics to mono- and to N,N'Diacetyl para-phenylenodiamine. **Contact Dermatitis**. v, 58, p. 355-358, 2008.

BOLDUC, C.; SHAPIRO, J. Hair care products: waving, straightening, conditioning and coloring. **Clinics in Dermatology**, New York, v.19, n.4, p.431-436, 2001.

BOLT, M.; GOLKA,K. The debate on carcinogenicity of permanent hair dyes: new insights. Critical reviews in toxicology, London, v. 37,n. 6, p. 521-36, 2007.

BOUILLON, C.; WILKINSON, J. **The Science of Hair Care**. 2nd ed. Oxford: Taylor and Francis,2005, p. 252-253.

BOUWSTRA, J. A.; HONEYWELL-NGUYEN, P. P.; GOORIS, G.S .; PONEC, M. Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. **Progress in Lipid Research**, Oxford, v.42, p.1-36, 2003.

BRASIL. Guia de avaliação de produtos cosméticos. Brasília: ANVISA, 2004, p. 47.

BREEN, A.P.; MURPHY, J.A. Reactions of oxyl radicals with dna. **Free Radical Biology Medicine**, v. 18, p. 1033-1077, 1995.

BROEDBAEK, K.; WEIMANN, A.; STOVGAARD, E.S.; POULSEN, H.E. Urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine as a biomarker in type 2 diabetes. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 51, p. 1473-1479, 2011.

BROHEM, C. A.; CARDEAL, L. B. S.; TIAGO, M.; SOENGAS, M.S.; BARROS, S.B.M.; MARIA-ENGLER, S.S. Artificial skin in perspective: concepts and applications. **Pigment Cell Melanoma Research**, v. 24, n. 1, p. 35-50, 2010.

BROHEM, C. A.; MASSARO, R.; TIAGO, M.; MARINHO, C.E.; JASIULIONIS, M.G.; ALMEIDA, R.L.; RIVELLI, D.P.; ALBUQUERQUE, R.C.; OLIVEIRA, T.F.; LOUREIRO, A.P.M.L.; OKADA, S.; SOENGAS, M.S.; BARROS, S.B.M.; MARIA-ENGLER, S.S. Proteasome inhibition and ROS generation by 4-nerolidylcatechol induces melanoma cell death. **Pigment cell & melanoma**, v. 3, p. 354-369, 2012.

BROWN, K.C.; CORBETT, J.F. The role of meta difunctional benzene derivatives in oxidative hair dyeing. II. Reaction with p-aminophenols. **Journal of Society of Cosmetics**, New York, v.30, n.4, p.191-211, 1979.

BRUCE, A.; ALEXANDER, J.; JULIAN, L.; MARTIN, R.; KEITH, R.; PETER, W. **Molecular Biology of the Cell**. 4 ed. New York: Garland Science, 2002. 1616p.

BUKHOLM, I.K.; NESLAND, J.M. Protein expression of p53, p21 (WAF1/CIP1), bcl-2, Bax, cyclin D1 and pRb in human colon carcinomas. **Virchows Arch**, v. 436, n. 3, p. 224-228, 2000.

CADENAS, E. Cadenas E. Biochemistry of oxygen toxicity. **Annual Review Biochemistry**, v. 58, p.79-110, 1989.

CADET, J.; DOUKI, T.; POUGET, J.P.; RAVANAT, J.L.; TEIXEIRA, P.C.; ONUKI, J.; MEDEIROS, M.H.G.; BECHARA, E.J.H.; DI MASCIO, P. In: **New Aspects of Trace Element Research**, 2^oed, London: Smith-Gordon, 1999, p.163.

CADET, J.; DOUKI, T.; RAVANAT, J.L. Measurement of oxidatively generated base damage in cellular DNA. **Mutation Research**, v.711, n. 2, p.3-12, 2011.

CADET, J.; DOUKI, T.; RAVANAT, J.L. Oxidatively generated damage to the guanine moiety of DNA: mechanistic aspects and formation in cells. **Accounts of Chemical Research**, v. 41, n. 8, p. 1075-1083, 2008.

CECCARELLI, C.; SANTINI, D.; CHIECO, P.; LANCIOTTI, C.; TAFFURELLI, M.; PALADINI, G.; MARRANO, D. Quantitative p21(waf-1)/p53 immunohistochemical analysis defines groups of primary invasive breast carcinomas with different prognostic indicators, **International Journal of Cancer**, v. 95, n.2, p. 128-134, 2001.

CHAUDHARY, A.K.; NOKUBO, M.; REDDY, G.R.; YEOLA, S.N.; MORROW, J.D.; BLAIR, L.; MARNETT, L.J. Detection of endogenous malonaldehyde-deoxyguanosine adducts in human liver. **Science**, v. 265, p. 1580-1582, 1994.

CHISVERT, D. A.; SALVADOR, A. **Analysis of Cosmetic Products**. Amsterdam: Elsevier, Cap.5, p. 192-200, 2007.

CHO, J. A.; OH, E.; LEE, E.; SUL, D. Effects of hair dyeing on DNA damage in human lymphocytes, **Journal Occupational Health**, v. 45, p. 376–381, 2003.

CHYE, S.M.; TIONG, Y.L.; YIP, W.K.; KOH, R.Y.; LEN, Y.W.; SEOW, H.F.; NG, K.; RANJIT, D.A.; CHEN, S.C. Apoptosis Induced by para-Phenylenediamine Involves Formation of ROS and Activation of p38 and JNK in chang liver cells, **Environmental Toxicology**, 2012.

COHEN, S.M, ELLWEIN, L.B. Cell proliferation in carcinogenesis. **Science**, v. 249, n. 4, p. 1007-1011, 1990. **Genes & Development**, v. 9, n. 10, p. 1149-1163, 1995.

CORBET, J.F. Chemistry of hair colorant processes-science as an aid to formulation and development. **Journal of Society of Cosmetic Chemists**, New York, v.35, n.5, p.297-310, 1984.

CORBETT, J. F. An historical review oft he use of dye precursors in the formulation of commercial oxidation hair dyes. **Dyes and Pigments**, London, v. 41, n. 3, p. 127-136, 1999.

CORBETT, J. F. **Hair colorants: chemistry and toxicology**. 3 ed. Weymouth,UK . Butler: Micelle Press, Cosmetic Science Monographs, 1998, p. 37-49.

COSETTA, B.; SKOTHELM, J.M.; BRUIN, R.A.M. Cell cycle-regulated transcription during the G1 and S phase. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.14, p. 518-528, 2013.

CZENE, K.; TIIKKAJA, S.; HEMMINKI, K. Cancer risks in hairdressers: assessment of carcinogenicity of hair dyes and gels. **International Journal of Cancer**. New York. v.105, n.1, p.108-112, 2003.

DANIAL, N.N.; KORSEMEYER, S.J. Cell death: Critical control points. **Cell**, v. 19, p. 116-205, 2004.

De LEO, V. A. Contact allergen of the year: p-Phenylenediamine. **Dermatitis**, v.17, n.2. p. 53-55, 2006.

DE LIMA, T.M., AMARANTES-MENDES, G.P.; CURI, R. Docosahexaenoic acid enhances the toxic effect of imatinib on Bcr-Abl expressing HL-60 cells. **Toxicology in vitro**, v. 21, n.8., p. 1678-1685, 2007.

DEDON, P.C. The chemical toxicology of 2-deoxyribose oxidation in DNA. **Chemical Research in Toxicology**, v. 21, n. 1, p. 206-209, 2007.

DEDON, P.C.; PLASTARAS, J.P.; ROUZER, C.A.; MARNETT, J.L. Indirect mutagenesis by oxidative DNA damage: formation of the pyrimidopurine adduct of deoxyguanosine by base propenal. **Proceedings of the National Academy Sciences, USA**, v. 95, p. 11113-11116, 1998.

DIAMANTIS, J.D.; MCGANDY, C.; CHENT, T. J.; LIAW, Y.F.; GUDAT, F.; BIANCHI, L. A new mutation hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinoma. **Journal Hepathology**, v. 20, n. 129, p. 665-679, 1994.

DIPPLE, A. DNA adducts of chemical carcinogens. **Carcinogenesis**, v. 16, n. 3, p. 437-441, 1995.

DOUKI, T.; ONUKI, J.; MEDEIROS, M. H. G.; BECHARA, E. J.; CADET, J.; DI MASCO, P. Hydroxy radicals are involved in the oxidation of isolated and cellular DNA bases by 5-aminolevulinic acid. Cadet, J.; DiMascio, P.; **FEBS Letters**, v.428, n.2, p. 93-96, 1998.

DRAETTA, G. Cell cycle control in eukaryotes: molecular mechanisms of cdc2 activation. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 15, n. 10, p. 378-383, 1990.

EDINGER, A.J.; THOMPSON, C.B. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 16, p. 663-669, 2004.

EL-DEIRY, W.S.; TOKINO, T.; VELCULESCU, V.E.; VELY, D.B.; PARSON, R.; TRENT, J.M.; LIN, D.; MERCER, W.E.; KINZLER, K.W.; VOGELSTEIN, B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression, **Cell**, v.74, n. 4, p.817-825, 1993.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicology Pathology**, v. 35, n.4, p. 495-516, 2007.

ESTEBAUER, H. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 57, p. 779S-785S, 1993. Supplement.

EUROPEAN STANDARDS COMMITTEE ON OXIDATIVE DNA DAMAGE (ESCODD). Comparison of different methods of measuring 8-oxaguanine as a marker of oxidative DNA damage. **Free Radical Biology**, v. 32, p.333-341, 2000.

FABER, E. Programmed cell death: necrosis versus apoptosis. **Modern Pathology**, v. 7, p. 605–609, 1994.

FARMER, F.B. DNA and protein adducts as markers of genotoxicity. **Toxicology Letters**, v.149, n. 3, p.3-9, 2004.

FESSEL, J.P.; PORTNER, N.A.; MOORE, K.P.; MOORE, K.P.; SELLER, K.P.; ROBERTS, L.J. Portner, N.A, Moore,K.P., Sheller, J.P., Roberts, L.J. Discovery of lipid peroxidation products formed in vivo with a substituted tetrahydrofuran ring (isofurans) that are favored by increasing oxygen tension. **Proceedings of the National Academy Sciences USA**, v.99, n.26, p. 16713, 16718, 2002.

FESTJENS, N.; BERGUE, T.V.; VANDENABEELE. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 1757, n. 10, p. 1371-1387, 2007.

FEUGHELMAN, M. Morphology and properties of hair. In: JOHNSON,D.H (Ed.) **Hair and Hair Care**. New York: Marcel Dekker, 1997, p. 1-12.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N.J.; Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, n. 6, p. 239-247, 2000.

FORMANEK, F.; DE WILDE, Y.; LUENGO, G. S.; QUERLEUX, B. Investigation of dyed human hair fibers using apertureless near-field scanning optical microscopy. **Journal of Microscopy**, Oxford, v. 224, n. 2, p. 197-202, 2006.

FRANKEN, N.A.P., RODERMOND, H.M., STAP, J., HAVEMAN, J., Bree, C.V., 2006. Clonogenic assay of cells *in vitro*. **Nature Protocols** 1, 2315 – 2319.

GAGO-DOMINGUESZ, 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**, New York, v.91, p.575-579, 2001.

GAGO-DOMINGUEZ, M.; CHAN, K.K.; ROSS, R.K.; YU, M.C. Permanent hair dyes and bladder cancer risk, **International of Journal of Cancer**, v. 94, p. 905–906, 2001b.

GAGO-DOMINGUEZ, M.; DOUGLAS, A. B.; WATSON, M.A.; JIAN-MIN, Y.; CASTELAO, J.E.; HEIN, D.W.; CHAN, K. K.; COETZEE, G. A.; ROSS, R. R.; YU, M.C. Permanent hair dyes and bladder cancer: risk modification by cytochrome P4501A2 and *N*-acetyltransferases 1 and 2. **Carcinogenesis**, v. 24, n. 3, p. 483-489, 2002.

GALIOETTE, M.P.; KOHLER, P.; MUSSI, G.; GATTAS, G.J.F. Assessment of Occupational Genotoxic Risk among Brazilian Hairdressers. **Annual Occupational hygiene**, v. 52, p. 645-651, 2008.

GARCÍAS-CAÑAS, V.; SIMÓ, C.; LÉON, C.; CIFUENTES, A. Advances in nutrigenomics research: novel and future analytical approaches to investigate the biological activity of natural compounds and food functions. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.20, n.2, p.290-304, 2010.

GARN, H.; KRAUSE, H.; ENZMANN, V.; DROLER, K. An improved MTT assay using the electron-coupling agent menadione. **Journal of Immunology Methods**, v. 168, p. 253-256, 1994.

GAYLOR, D. W.; GOLD, L. S. Quick estimate of the regulatory virtually safe dose based on the maximum tolerated dose for rodent bioassays. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 22, p. 57-63, 1995.

GELLER, F. Elevated bladder cancer risk due to colorants--a statewide case-control study in North Rhine-Westphalia, Germany. **Journal of toxicology and environmental health. Part A**. London, v.71,n. 13,p. 851-855, 2008.

GERHOLD, D.L.; JENSEN, R.V.; GULLANS, S.R. Better therapeutics through microarrays. **Nature Genetics**, v. 32, p. 547-551, 2002, Supplement.

GHOSH, P.; SINHA, A.K. Hair Colors: Classification, Chemistry and a Review of Chromatographic and Electrophoretic Methods for Analysis. **Analytical Letters**, New York, v. 41, n. 4, p. 2291-2321, 2008.

GLADE, M.J. The role of reactive oxygen species in Health and Disease Northeast Regional Environmental Public Health Center University of Massachusetts, Amherst. **Nutrition**, v. 19, P. 401-403, 2003.

GODSCHALK, R.W.; MAAS, L.M.; ZANDWIJK, N.; VANT VEER, L.; BREEDIJK, A.; BORN, P.J.; VERHAERT, J.; KLEINJANS, J.C.; VAN SCHOOTEN, F.J. Differences in aromatic-DNA adduct levels between alveolar macrophages and subpopulations of white blood cells from smokers. **Carcinogenesis**. v.19, p.819-825, 1998.

GOEBEL, C.; COENRAADS, P.; KOCK, M. & BLOEMEKE, B. Skin sensitization to p.p.d.: The role of the exposure time and dose for the elicitation response in allergic patients. **Toxicology Letters**, v. 189, p. 177-178, 2009.

GOLDBERG, B.G.; HERMAN, F.F.; HIRATA, I. Systemic anaphylaxis due to an oxidation product of p-phenylenediamine in hair dye. **Annual Allergy**, v. 3, p. 205-208, 1987.

GOLKA, K.; KOPPS, S.; MYSLAK, Z. W. Carcinogenicity of azo colorants: influence of solubility and bioavailability. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 51, p. 203-210, 2004.

GOMES, A. L. **O uso da tecnologia Cosmética no Trabalho do Profissional Cabelereiro**. São Paulo, 1999.

GRAMS, Y.Y.; ALARUIKKAS, S.; LASHLEY, L.; CAUSSIN, J.; WHITEHEAD, L.; BOUWSTRA, J. A. Permanent lipophilicity and vehicle composition influence accumulation of dyes in hair follicles of human skin, **European Journal of Pharmaceuticals Sciences**, v. 18, p. 329-336, 2003.

GRIFFITHS, A.J.F. **Introdução a genética**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998, cap 7, p. 169-194.

GRIFFITHS, A.J.F.; GELBART, W.M.; MILLER, J.H.; LEWONTIN, R.C. Mutações Gênicas in: **Genética Moderna**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001b. cap 7, p. 177-204

GROEMPING, Y., RITTINGER, K. Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. **Biochemical Journal**, v. 386, p. 401-16, 2005.

HADGRAFT, J. Skin, the final frontier. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 224, n.2, p. 1-18, 2001.

HAJIZADEH, S.; FEGROOT, J.; TEKOPPELE, J.M.; TARKOWSKI, A.; COLLINS, L.V. Extracellular mitochondrial DNA and oxidatively damaged DNA in synovial fluid patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis Research & Therapy**. v.5, p. 234-240, 2003.

HALIWELL, B. Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: measurement, mechanism and the effects of nutrition. **Mutation Research**, v. 443, n. 2. P. 37-52, 1999.

HALIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 246, n. 2.; 501-14, 1986.

HALLIWELL, B.; CROSS, C.E. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. **Environmental Health Perspective**, v. 102, p.5-12, 1994. Supplement 10.

HALLIWELL, B.; GUTERIDGE, J.M.C. **Free radical in biology and medicine**. 4^oed. Oxford: Biosciences 2007, p.171-186.

HARMAN, D. Aging-A theory based on free-radical and radiation-chemistry. *Journal of Gerontology*, v.11, p.298–300, 1956.

HARPER, J.W.; ELLEDGE, S.J.; KEYOMARSI, K.; DYNLACHT, B.; TSAI, L.H.; ZHANG, P.; DOBROWOLSKI, S.; BAI, C.; CONNEL-CROWLEY, L.; SWINDELL, E. Inhibition of cyclin dependent kinases by p21. **Molecular Biology of the cell**, v. 4, p. 387-400, 1995.

HARRISON, S.; SINCLAIR, R. Hair colouring, permanente styling and hair structure. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v.2, n. 34, p.180-185, 2004

HARRISON, S.; SINCLAIR,R. Hair colouring, permanente styling and hair structure. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 2, n. 4,p. 180-185, 2004.

HELZLSOUER, K.; ROLLINSON, D.; PINNEY, S. Overview of the epidemiology od hair dye exposure and incidente of neoplastic disease. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v.172 suplement. p.31, 2007.

HENNEKEN, C.H.; S'PEIZER, F.E.; ROSNER, B.; BAIN, C.J.; BELANGER, C.P. Use of permanent hair dyes and cancer among registered nurses, **The Lancet**, London, v.3, p.1390-1393, 1979.

HENTGARDNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, p.770-776, 2000.

HERSHEY, G.K.; FRIEDRICH, M.F.; ESSWEIN, L.A, THOMAS, M.L.; CHATILA, T.A. The association of atopy with again-of-function-mutation in the alpha subunit of the interleukin-4 receptor. **The New England Journal of Medicine**, v. 337, n, 24, p. 1720-1751, 1997.

HIROTA, K.; MATSUI, M.; IWATA, S.; NISHIYAMA, A.; MORI, K.; YODOI, J. Ap-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 94, n. 8, pp. 3633–3638, 1997.

HOFER, H.; BORNATOWICZ, N. E. Analysis of human chromosomes after repeated hair dyeing. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford. v. 21, p. 785–789, 1983.

HOUTGRAAF, J.H.; VERMISSENA, J.; GIESSEN, W.J.V.D. A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. **Cardiovascular Revascularization Medicine**, v.7, p.165-172, 2006.

HOWE, G.R.; BURCH, J.D.; MILLER, A.B.; COOK, G.M.; ESTEVE, J.; MORRISON, B.; HOFER, H. Tobacco use, occupation, coffee, various nutrients, and bladder cancer. **Journal Natural Cancer Institute**, v. 13, p. 640-701, 1980.

HUEBER-BECKER.; NOHYNEK, G.J.; MEULING, W.J.A. BENECH-KIEFFER, F.; TOUTAIN, H. Human systemic exposure to a-para-phenyldiamine containing oxidative hair dye and correlation with in vitro percutaneous absorption in human or pig skin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, n. 8, p. 1227-1236, 2004.

HUNCHAREK, M.; KUPELNICK, B. Personal use of hair dyes and the risk of bladder cancer: results of a meta-analysis. **Public Health Reports**, v. 120, n.1, p. 31-38, 2005.

INOUE, M.; SATO, E.F.; NISHIKAWA, M. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 2495–505, 2003

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, Q. e. T. Informações ao consumidor: tinturas decabelo: Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/consumidor/produtos/tintura_cabelo.asp Acesso em : 10/06/2013.

INTERNACIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANER (IARC). In: Hairdressers and barbers, and hair colourants. Disponível em : <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol99/mono99-17.pdf>, 2005.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. In: Some Aromatic Amines, Organic Dyes, and Related Exposures, Vol. 99. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2010.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **Preamble** (2006). Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Preamble/CurrentPreamble.pdf> (August 2011)]

JAIN, N.K. **Controlled and novel drug delivery**. New Delhi: CBS publishers & distributors, 2001. p.101-105.

JARDINE, D.; ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.D.; ROBARDS, K. Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) investigation of the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) reaction. **Journal of Agriculture Chemistry**, v.50, n.6, p. 1720-1724, 2002.

- JARVIS, A.S.; HOKEYCETT, M.E.; McFARLAND, V.A.; BULICH, A.A.; BOUNDS, H.C. A comparison of the Ames assay and Mutatox in assessing the mutagenic potential of contaminated dredged sediment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Amsterdam, v.33, p.193-200, 1996.
- JENSEN, J. M.; PROKSCH, E. The skin's barrier. **Giornale Italiano di Dermatologia e Venereologia**, Torino, v. 136, n.2. p. 267-274, 2010.
- JUN, D.J.; KIM, J.; JUNG, S.Y.; SONG, R.; NOH, J.H.; PARK, Y.S.; RYU, S.H.; KIM, J.H.; KONG, Y.Y.; CHUNG, J.M.; KIM, K.T. Extracellular ATP mediates necrotic cell swelling in SN4741 dopaminergic neurons through P2X7 receptors. **Journal of Biology Chemistry**, v. 28, p. 37350–37358, 2007
- KALOPISSIS, G. Opinion on p-phenylenediamine. In: ZYIAK, C. **The science of hair care**. 5th ed. New York: Marcel Dekker, 1988. p. 287-308.
- KANDUC, D.; MITTELMAN, R.; SERPICO, E.; SINIGAGLIA, A.A.; SINHA, C.; NATALE, R.; SANTACROCE, M.G.; DI CORCIA, A.; LUCCHESI, L.; DINI, P.; PANI, S.; SANTACROCE, S.; SIMONE, R.; BUCCIR, P.; FABER, B. Cell death: apoptosis versus necrosis (review). **Internacional Journal of oncology**, v.21, p. 1650-1701, 2002.
- KANITAKIS, J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. **European Journal of Dermatology**, France. v.12. p. 390-399, 2002.
- KAPLAN, C.; DIRIL, N.; SAHIN, S.; CEHRELI, M.C. Mutagenic potentials of dental cements as detected by the *Salmonella*/microsome test. **Biomaterials, Guildford**, v.25, p.4019-4027, 2004.
- KELL, D.B.; System biology, metabolic modelling and metabolomics in drug Discovery and development. **Drug Discovery Today**, v. 24, p. 1085-1092, 2006.
- KERR, J.F.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**. London, v. 26, n. 4, p. 239-257, 1972.
- KEVIN, J.T.; HISHAM, K.; HAMADEH, P.; RUPESH, P.; GERMOLÉ, D. R. Oxidative stress and its role in skin disease. **Antioxidants and Redox signaling**, New York, v. 4, n. 4, p. 665-673, 2002.
- KIELHORN, J., MELCHING-KOLLUMUSS, MANGELSDORF, I. 2006. Dermal absorption. Geneva, World Health Organization (Environmental Health Criteria 2), 285. Disponível em : <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc235.pdf>. Acesso em : 10/01/2014.

KIETZMANN, M. Penetration studies of vitamin E acetate applied from cosmetic formulations to stratum corneum of an vitro model using quantification by tape stripping UV spectroscopy, and HPLC. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, New York, v. 54, p. 119-131, 2003.

KIRKLAND, D. J., HONEYCOMBE, J.R.; LAWLER, S.D. Sister chromatid exchanges before and after hair dyeing. **Mutation Research**, v. 90, p. 279-286, 1981.

KIRKLAND, D. J.; HENDERSON, L.; MARZIN, D.; MUELLER, L.; PARRY, J. M.; SPEIT, G.; TWEATS, D. J.; WILLIAM, G. M. Testing strategies in mutagenicity and genotoxicology: An appraisal guidelines of the European Scientific Committee for Cosmetics and Non Food Products for the evaluation of hair dyes. **Mutation Research**, v.588, p.88-105, 2005.

KNAAPEN, A.M.; GUNGOR, R.P.; SCHINS, P.J.; BORN, F.J, VAN SCHOOTEN, J. Neutrophils and respiratory tract DNA damage and mutagenesis: a review, **Mutagenesis**, v. 21, p. 225-236, 2006.

KO, L.J.; PRIVES, C. p53: puzzle and paradigm. *Genes and Development*, v.10, p.1054-1072, 1996.

KOGEVINAS, M.; FERNADES, F.; CLOSAS, F. G.; TARDON, A.; CLOSAS, R, G.; SERRA, C.; CARRATO, A.; VINYALS, G. C.; YEAGER, M.; CHANOCK, S.; LROTE, J.; ROTHMAN, N.; REAL, F, X.; DOSEMECI, MUSTAFA.; MALTS, N.; SILVERMAN, D. Hair dye use is not associated with risk for bladder cancer: Evidence from a case-control study in Spain, **European Journal of Cancer**, v. 42. p. 1448-1454, 2006.

KREPAK, L.; BRIKI, F.; DUVALT, Y.; DOUCET, J.; MERIGOUX, G.; LEROY, F.; LÉVEQUE, J, L.; MILLER, L.; CARR, G.L.; WILLIAMS, G. P.; DUMAS, P. Profiling lipids across Caucasian and Afro-American hair transverse cuts, using synchrotron infrared microspectrometry. **Internacional Journal of Cosmetic Science**, Oxford, v.23, n.6, p. 369-374, 2001.

KREPLAK, J.; BRIKI, F.; DUVALT, Y.; DOUCET, J.; MERIGOUX, C.; LEROY, F.; LEVEQUE, L.; MILLER, L. Profiling lipids across Caucasian and Afro-American hair transverse cuts, using synchrotron infrared microspectrometry. **International Journal of Cosmetic Sciences**, v. 23, n.6, p. 369-374, 2001.

KROEMER, G.; GALUZZI, L.; VANDENBEELE, P.; ABRAMS, J.; ALNEMERIES, E. S.; BAEHRECKE, E. H.; BLAGOSKLONNY, M. V.; EL-DEIRY, W.S.; GOISTEIN, P.; GREEN, D. R.; HENTGARTNER, M.; KNIGHT, R.A.; KUMAR, S.; LIPTON, S.A.; MALORNI, W.; NUÑEZ, G.; PETER, M.E.; TSCHOPP, J.; YUAN, J.; PIACENTINI, M.; ZHIVOTOVSKY, B.; MELINO, G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death , v.16, n. 1, p. 3-11, 2009.

KRYSTONA, T.B.; ANASTASSIYA, B.; GEORGIEVA, P.; PISSIB, A, GEORGAKILASA, G. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. **Review Mutation Research**, v. 711, p. 193-201, 2011.

KUNZ, A.; ZAMORA, P. P.; MORAES, S. G.; DURÁN, N. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, p.78-82, 2002.

LADEMANN, J.; KNORR, F.; RICHTER, H.; BLUME-PEYTAVI, U.; VIGT, S. ANTONIUS, C. STERRY, A.; PATZELT, A. Hair follicles- an efficient strong and penetration pathway for topically applied substances. **Skin Pharmacology and Physiology**. v. 21, p. 150-155, 2008a.

LADEMANN, J.; KNORR, F.; RICHTER,H.; BLUME-PEYTAVI,U.; VOGT, A.; ANTONIOU, C.; STERRY,W.; PATZELT, A. Hair follicles- an efficient storage and penetration pathway for topically applied substances. **Skin Pharmacology and physiology**. New York, v.21, n.4, p 150-155, 2008b.

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

LAMBETH, J.D. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n.3,p. 181-189, 2004.

LAMPEN, P.; PITTERMANN,W.; HEISE,H.H.; SCHMITT,M.; JUNGSMANN,H.; LEONARDI, G. R. **Cosmetologia Aplicada**. São Paulo : Editora, 2^o ed. MEDFARMA, 2008.

LÉPORI, L. R. Miniatlas: a pele. São Paulo: Soriak Comércio e Promoções S.A., 2002. P. 204.

LINDAHL, T. Instability and decay of the primary structure of DNA. **Nature**, v. 362, n.6422, p. 709-715, 1993.

LINDAHL, T. Instability and decay of the primary structure of DNA, **Nature**, London, v. 362, n.7, p. 709–714, 1993.

LINDT, M.L.; BOMAN, A.; SOLLENBERG, J. Occupational dermal exposure to permanent hair dyes among hairdressers. **The Annals of Occupational Hygiene**, v.49, p. 473-801, 2005.

LIU, H.; CHEN,J.; JIANG, J.; GIESY, J.P.; YU, H.; WANG, G.; Cytotoxicity of HC Orange NO.1 to L929 fibroblast cells. **Environmental Toxicology Pharmacology**, v. 26, p.309-314, 2008.

LIZIER, T.M.; ZANONI, T.B.; de OLIVEIRA, D.P.; ZANONI, M.V.B. Electrochemical reduction as a powerful tool to highlight the possible formation of by-products more toxic than Sudan III dye. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 7, p. 7784-7796, 2012.

LOPACZYNSKI, W.; ZEISEL, S.H. Antioxidants, programmed cell death, and cancer. **Nutrition Research**, v.21, p.295-307, 2001.

LYNCH, B. S.; DANIELS, J.; NESTMANN, E.; WILSON, R.; MUNRO, I.; SHARMA, R.; GRABARZ, R.; DREASSLER, W. What does the clinician want to know from the toxicologist. **The Toxicologist**, Akron, Ohio, v. 42, n. 1, p. 225-240, 1998.

LYNCH, B. S.; DELZELL, E. S.; BECHREL, D. H. Toxicology review and Risk Assessment of resorcinol: Thyroid effects. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, New York, v.36,n.1, p.198-210, 2002.

MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. **American Journal of Pathology**, v. 15, p. 143-146, 1995.

MANGAL, D.; VUDATHALA, D.; PARK, J.H.; LEE, S.H.; PENNING, T.M.; BLAIR, I.A. Analysis of 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine in cellular DNA during oxidative stress. **Chemical Research in Toxicology**, v. 22, p.788-797, 2009.

MANGER, R.L.; LEJA, L.S.; HUNGERFORD, J.M.; WEKELL, M.M. Tetrazolium-based cell bioassay for neurotoxins active on voltage-sensitive sodium channels: semiautomated assay for saxitoxins, brevetoxins and ciguatoxins. **Analytical Biochemistry**, v. 214, p. 190-194, 1993.

MARNETT, L.H.; HURD, H.K.; HOLLSTEIN, M.C.; LEVIN, D.E.; ESTEBAUER, H.; AMES, B.N. Naturally occurring carbonyl compounds are mutagenic in Salmonella tester strain ta104. **Mutation Research**, v. 148, n. 1, p. 25-34, 1985.

MARNETT, L.J. Oxyradicals and DNA damage, **Carcinogenesis**, v.3, p. 361-370, 2000.

MARRONI, N.P.; MARRONI, C.A. **Estresse oxidativo e antioxidante**. Porto Alegre: Editora Ulbra; 2002.

MASUKAWA, Y. Separation and determination of basic dyes formulated in hair care products by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.1108, p.140-144, 2006.

MAZZOLENI, G.; DI LORENZO, D.; STEIMBERG, N. Modelling tissues in 3D: the next future of pharmaco-toxicology and food research?. **Genes Nutrition**, v. 4, 13-22, 2009.

McFADDEN, J.P.; YEO, L.; WHITE, J.L. Clinical and experimental aspects of allergic contact dermatitis to p-phenylenodiamine. **Clinics in Dermatology**, v.29, p. 316-324, 2011.

MIYACHI, Y. Biochemistry of the physiopathologic and clinical aspects of free radicals in skin diseases. **Nippon Rinsho**, v.46, p. 2252–2256, 1988.

MOLDOVAN, G.L.; PFANDER, B.; JENTSCH, S. PCNA, the maestro of the replication fork. **Cell**, v. 129, n. 3, p. 665-679, 2007.

MORGAN, D.O. **The cell cycle: principles of control**. 3 ed. Lawrence: New Science Press, 2007, p. 157–173.

MORIYA, M.; GROLLMAN, A.P. Mutations in the mut *v* gene of *E. coli* enhance the frequency of targeted G-C→T-A transversions induced by a single 8-oxoguanine residue in single strand DNA. **Molecular Genetics and Genomic**, v.239, p. 72-76, 1993.

MUKAI, F.H.; GOLDSTEIN, B.D. Mutagenicity of malonaldehyde, a decomposition product of peroxidized polyunsaturated fatty acids. **Science**, v. 191, n. 4229, p. 868-869, 1976.

NACHBAR, F.; KORTING, H.C. The role of vitamin E in normal and damaged skin, **Journal of molecular Medicine**, Berlin, v, 1, p. 7-17, 1995.

NAJEM, G.R.; LOURIA, D.B.; SEEBO, D.E.; THIND, I.S.; PRUSAKOWSKI, J.M.,

NIKITINA, T.V.; NAZAROVA, N; TISHCHENKO, L.I.; TUOHIMAA, P.; SEDOVA, V.M. Use of the real-time RT-PCR method for investigation of small stable RNA expression level in human epidermoid carcinoma cells A431. **Tsitologiia**, v, 45, n. 4, p. 392-402, 2003.

NOHYNEK, G. J.; FAUTZ, R.; BENECH-KIEFFER, F.; TOUTAIN, H. Toxicity and human health risk of hair dyes. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 42, n. 4, p. 517-543, 2004.

NOHYNEK, G.J.; ANTIGNAC, E.; RE, T.; TOUTAIN, H. Safety assessment of personal care products/cosmetics and their ingredients. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 243 ,n. 2, p. 239-259, 2010.

NOMURA, A.; KOLONEL, L N.; YOSHIZA, CN. Smoking, alcohol, occupation, and hair dye use in cancer of the lower urinary tract. **American Journal of Epidemiology**, v.63, p.1159–1163, 1989.

NORBURY, C.J.; HICKSON, I.D. Cellular responses to DNA damage. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 41, p.367-401, 2001.

OHNO, Y.; AOKI, K.; OBATA, K.; MORRISO, A.S. Case-control study of urinary bladder cancer in metropolitan Nagoya. **Natural Cancer Institute**, v. 69, p. 229-234, 1985.

OLIVEIRA, D.P/ **Corantes como importante classe de contaminantes ambientais- um estudo de caso** : USP, 2005. 120 páginas. Tese (doutorado). Programa de pós graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, 2005.

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.4, n.2, 2014. No prelo.

OTAKE, A.H. Papel de dissialogangliosídeos na proliferação e morte celular induzida de melanócitos e melanoma in vitro. Tese Doutorado. Universidade de São Paulo, 2005. Disponível em :< file:///Users/thalitaboldrinzanoni/Downloads/andreiahotake.pdf>. Acessado em : 03/06/2013.

PEREIRA, J. M. **Doenças dos cabelos e do couro cabeludo**. São Paulo: Atheneu; 2001. P.163-175.

PICARDO, M.; ZOMPETTA, C.; GRANDINETTI, M.; AMEGLIO, F.; SANTUCCI, B.; FAGGIONI, A.; PASSI, S. Paraphenylene diamine, a contact allergen, induces oxidative stress in normal human keratinocytes in culture. **British Journal of Dermatology**, v. 134, n, 4, p. 681-685, 1996.

PICARDO, M.; ZOMPETTA, C.; MARCHESI, C.; DE LUCA, C.; FAGGIONI, A.; SCHMIDT, R.J.; SANTUCCI, B. Paraphenylenediamine, a contact allergen, induces oxidative stress and ICAM-1 expression in human keratinocytes. **British Journal of Dermatology**, v. 126, n. 5, p. 450-455, 1992.

PIERCEALL, W.E.T.; MUKHOPADHYAY, L.H.; GOLDBERG, H.N. Mutation on the p53 tumor suppressor gene in human cutaneous squamous cell carcinomas, **Molecular Carcinogenesis**, v. 4, p. 445-49, 1991.

PINHEIRO, A. S.; TERCI, D.; GONÇALVES, D. A. C.; PEREIRA, M.; OLIVEIRA, P. S.; ALENCASTRE, J.; MAIA, A.C.; MONTEIRO, V.; LONGO, E. Mecanismos de degradação da cor de cabelos tingidos: um novo modelo de proteção. **Cosmetics & Toiletries** (Edição em Português), v.14,n. 3, p. 68-77, 2002.

PLATZEC, T. Current safety concerns about oxidative hair dyes. **Toxicology Letters**, v.172, p.32, 2007. Supplement.

POLI, G.; LEONARDUZZI, G.; BIAST, F. Oxidative stress and cell signaling. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 1163-1182, 2004.

POTTS, R.O.; BOMMANAN, B.; GUY, R.H. **Percutaneous absorption**, 2ed. Pharmacology of the skin, CRC Press, USA, 1992, pp, 12-27.

PRYOR, W.A.; LIGHTSEY, J.W. Mechanism of nitrogen dioxide reactions : Initiation of lipid peroxidation and production of nitrous acid. **Science**, v. 214, p. 435-437, 1981.

RAHMAN, K. Garlic and aging: new insights into an old remedy, **Ageing Research Review**, v. 2, n, 1, p. 39-56, 2003.

RAVANAT, J.L.; DI MASCIO, P.; MARTINEZ, G.R.; MEDEIROS, M.H.; CADET, J. Singlet oxygen induces oxidation of cellular DNA. **Journal of Biology Chemistry**, v. 22, n, 51, p. 40601-40604, 2000.

RILEY, P.A.; Free radicals in biology: oxidative stress and effects of ionizing radiation. **International Journal of Radical Biology**, v. 65, p.27-33, 1994.

ROBBINS, C. **Chemical and physical behavior of human hair**, 4th ed. Clermont: Springer-Verlag, 2002. p.711.

ROBINS, C. R. **Chemical and Physical Behavior of Human Hair**. 5th ed, Berlin: Springer-Verlag, 2012, p. 445-461.

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**, London, v. 77, n. 3, p. 247-255, 2001.

ROLLINSON. D. D, HELZSOUER. K. J, PINNEY, S. M. Personal hair dye use and cancer: a sistemic literature review and evaluation of exposure assessment in studies published since 1992. **Journal Toxicology and Enviromental Health. Part B, Critical reviews**, Washington, v.9, n.5, p.413-439, 2006.

ROSENKRANZ, A.R.; SCHMALDIENST,S.; STUHLMIER, K.M.; CHEN, W.; KNAPP, W.; ZLABINGER, G.J. A microplate assay for the detection of oxidative products using 2,'7-dichloro-fluorescin-diacetate. **Journal of Immunology Methods**, v. 156, p. 39-45, 1992.

ROSSNER, P.; MILCOVA, A.; LIBALOVA, H.; NOVAKOVA, Z.; TOPINKA, J. BALASCAK, SRAM, R.J.Biomarkers of exposure to tobacco smoke and enviromental pollutants in mothers and their transplacental transfer to the foetus. Parti II.Oxidative damage. **Mutation Research**, v. 669,p. 20-26, 2009.

SALVADORI, D.M.F.; RIBEIRO, L.R.; FENECH, M. **Teste do micronúcleo em células humanas**. Em: RIBEIRO,L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES,E.K. Mutagênese Ambiental. Canoas: Ulbra, 2003, p.201-223.

SANDER, C. S.; HAMM, F.; ELSNER, J.J. Oxidative stress in malignant melanoma and non-melanoma skin cancer. **British Journal of Dermatology**, v.148, p. 913–922, 2003.

SANTELLI, G. M. M. Mutagênese e Carcinogênese. In: SEIZI OGA. **Fundamentos de Toxicologia**. 2^o ed, São Paulo: Atheneu, 2003, v.1, p.76-88.

SARDAS, S.; AYGUN, N.; KARAKAYA, A.E. Genotoxicity studies on professional hair colorist exposed to oxidation hair dye. **Mutation Research**, v. 394, p. 153-161, 1997.

SCARPI, C.; NINCI, F.; CENTINI, M.; ANSELMINI, C. High-performance liquid chromatography determination of direct and temporary dyes in natural hair colourings. **Journal of Chromatography. A**, Amsterdam, v.796, n. 2, p. 319-325, 1998.

SCCNFP/0129/99: Opinion of the Scientific Committee on Consumer Products and non-Food Products Intended for Consumers(SCCNFP) opinion on p-phenylenediamine COLIPA no A7., 2002. Disponível em: http://ec.europa.eu/food/fs/sc/sccp/out156_en.pdf.

SCCP/0959/05: Opinion on Review of the Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products (SCCNFP) opinion on Hair Dye Strategy in the light of additional information. Adopted by the SCCP during the 8th plenary meeting of 20 June 2006.Disponível em: http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_068.pdf.

SCCP/1117/07: Opinion of the Scientific Committee on Consumer Products (SCCP) opinion on Resorcinol COLIPA n° A11. The SCCP adopted this opinion at its 15th plenary of 15 April 2008. Disponível em: http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_124.pdf

SCCS/1231/09: Opinion on Basic Yellow 57 COLIPA n° C10. Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS). The SCCS adopted this opinion at its 6th plenary meeting of 23 March, 2010. Disponível em: http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_020.pdf.

SCCS/1332/10: Opinion of the Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS) opinion on Basic Red 51 COLIPA n° B116. The SCCS adopted this opinion at its 10th plenary meeting of 22 March 2011.Disponível em: http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_059.pdf.

SCCS/1436/11: Opinion of the Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS) opinion on Basic Red 51 COLIPA n° B116., 2011. Acute oral toxicity study in rats with MIP 2985. Covance Laboratories, Inc. report n° 6623-145. Disponível em: http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_067.pdf.

SCCS/1436/11: Opinion of the Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS) opinion on Basic Red 51 COLIPA n° B116. 2011. Acute oral toxicity study in rats with MIP 2985. Covance Laboratories, Inc. report n° 6623-145. Disponível em: http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_067.pdf.

SCCS/1443/11: Opinion of the Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS) opinion on p-phenylenodiamine COLIPA n° A7. The SCCS adopted this opinion at its 15th plenary meeting of 26 – 27 June 2012. Disponível em: http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_094.pdf.

SCCS/1443/11: Opinion of the Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS) opinion on p-phenylenodiamine COLIPA n° A7. The SCCS adopted this opinion at its 15th plenary meeting of 26 – 27 June 2012. Disponível em : http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_094.pdf.

SCCS/1475/12: Opinion on oxidative hair dye substances and hydrogen peroxide used in products to clour eyelashes. The SCCS adopted this opinion by written procedure on 12 October 2012. Disponível em: http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_111.pdf.

SCHAFER, K.A. The cell cycle: review, Veterinary PSchafer 1998The cell cycle a review: **Veterinary Pathology**, v. 6, p. 461-478, 1998.

SCHOSTAK, M.; KRAUSE,H.; MILLER,K.; SCHARADER,M.; WELKERT,S.; CHRISTOPH, F.; KEMPKENSTEFFEN,C.; KOLLERMANN,J. Quantative real-time RT-PCR of CD24 mRNA in the detection of prostate cancer. **BCM Urology**, London, v.15, p.6-7, 2006.

SCHUELLER. R.; ROMANOWSKI, P. Inside the hair: in advanced hair biology model. **Cosmetics & Toiletries**, v.120, n.11, p.53-56, 2005.

SEDGWICK, B; BATES, P.A.; PAIK, J.; JACOBS, S.C.; LINDAHL, T. Repair of alkylated DNA: recent advances. **DNA Repair**, Amsterdam, v.6, n.4, p. 429-442,2007.

SEO, J. A.; BAE, I. H.; JANG, W. H.; KIM, J. H.; BAK, S. Y.; HAN, S. H.; PARK, Y.H.; LIM, K. M. Hydrogen peroxide and monoethanolamine are the key causative ingredients for hair dye-induced dermatitis and hair loss. **Journal of Dermatological Science**, v. 66, p. 12-19, 2012.

SHAMBERGER, R.J.; CORLETT, C.L.; BEAMAN, K.D.; KASTEN, B.L. Antioxidants reduce the mutagenic effect of malonaldehyde and beta-propiolactone. Part IX. Antioxidants and cancer. **Mutation Research**, v.66, n.4, p. 349-355, 1979.

SHANSKY, A. A controllable progressive hair dye process. **Cosmetic & Toiletries**, Washington, v.122, n.3, p. 67-72, 2007.

SHERR, C.J. Mammalian G1 cyclins. **Cell**, v. 73, n.6, p. 1059-1065, 1993.

SILVERMAN, D. T.; DEVESA, S. S.; MOORE, L. E.; ROTHMAN, N. Bladder cancer. *Cancer Epidemiology and Prevention*, Oxford University Press, 3rd ed, 2005.

SIMONE, S.; GORIN, Y.; VELAGAPUDIC, C.; ABOUD, H.E.; HABIB, S.L. Mechanism of oxidative DNA damage in diabetes: tuberin inactivation and downregulation of DNA repair enzyme 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine DNA glycosylase. **Diabetes**. v.57, p. 2626-2636, 2008.

SITAILO, L.A.; TIBUDAN, S.S.; DENNING, M.F. Activation of caspase-9 is required for UV-induced apoptosis of human keratinocytes. **Journal of Biology Chemistry**, v. 277, p. 19346-19352, 2002.

SMALLEY, K.S.; LIONI, M.; HERLYN, M. Life isn't flat: taking cancer biology to the next dimension. **In vitro. Cellular.Developmental.Biology.Animal**. 42, 242-247, 2006.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE MUTAGÊNESE, CARCINOGENESE E TERATOGENESE AMBIENTAL (SBMCTA). São Paulo, 2004. UMBUZEIRO, G.A.; VARGAS,V.M.F.; FELZENSWALB,I.; HENRIQUERS,J.A.P.; VARANDAS,E. **Orientações básicas de execução de teste de mutagenicidade para proteção da saúde humana e do meio ambiente**. Teste de mutação reversa com Salmonella typhimurium (Teste de Ames, Ensaio Salmonella/microsoma). Série de Documentos, 1). Disponível em <http://www.sbmcta.org.br>. Acesso em: 03/01/2014.

SØSTED,H.; BASKETTER,E.; JOHANSEN,J.D.; PATLEWICZ,G.Y. Ranking of hair dye substances according to predicted sensitization potency: quantitative structure-activity relationships. **Contact Dermatitis**, v. 51, 241-254, 2004.

SPALDING, J. **National Toxicology Program**, Washinton: DC, NTP Tech. Rep 331, p. 5, 1988.

SPALDING, J. W. NTP Toxicology and carcinogenesis studies of malonaldehyde, sodium salt (3-hydroxy-2-propenal, sodium salt) (CAS No. 24382-04-5) in F344/N rats and B6C3F1 mice (Gavage studies). **National Toxicology Program technical report series**. N, 331, p. 1-182, 1988.

STANLEY, L.A.; SKARE, J.A.; DOYLE, E.; POWRIE, R.; DANGELO, D.; ELCOMBE, C.R. Lack of evidence for metabolism of p-phenylenediamine by human hepatic cytochrome P450 enzymes. **Toxicology**, v. 1, n.3, p. 147-157, 2005.

SUHONEN, T. M.; BOUWSTRA, J.A.; URTTI, A. Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural alterations. **Journal of controlled release**, Amsterdam, v. 59, n.4, p. 149-161, 1999.

SWENBERG, J.A.; FRYAR-TITA, E.; JEONG, Y.C.; BOYSEN, G.; STARR, T.; WALKER, V.E.; ALBERTINI, R.J. Biomarkers in toxicology and risk assessment: informing critical dose-response relationships. *Chemical Research in Toxicology*, v. 21, p. 253-265, 2008.

SWIFT, J.A. Human hair cuticle : biologically conspired to the owner's advantage. **Journal of cosmetic Science**, New York, v.50, n.1, p.23-47, 1999.

TOLL, R.; JACOBI, H.; RICHTER, J.; LADEMANN, H. S.; BLUME-PEYTAVI, U. U. Penetration profile of microsphere in follicular targeting of terminal hair follicles. **Journal of Investigative dermatology**, New York, v. 123, p. 168-176, 2004.

TOPLEY, G.J.; OKYUYAMA, R.; GONZALES, J.G.; CONTI, C.; DOTTO, G. p21(WAF1/Cip1) functions as a suppressor of malignant skin tumor formation and a determinant of keratinocyte stem-cell potential. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, p. 9089 –9094, 1999.

UMBUZEIRO, G.A.; FREEMAN, H.; WARREN, S.H.; KUMMROW, F.; CLAXTON, L.D. Mutagenicity evaluation of the commercial product C.I. Disperse Blue 291 using different protocols of the Salmonella assay. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 49-56, 2005.

UMBUZEIRO, G.A.; VARGAS, V.M.F. 2003. Teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames) como indicador de carcinogenicidade em potencial para mamíferos. In: **Mutagênese Ambiental**, Eds. Lucia Regina Ribeiro, Daisy Maria Fávero Salvadori & Edmundo Kanan Marques, Editora da ULBRA, capítulo 4, pp. 81-112.

UNITED STATES. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. S. **Health and Environmental Effects Profile for Phenylenediamines**. EPA/600/x-85/113. Environmental Criteria and Assessment Office, Office of Health and Environmental Assessment, Office of Research and Development, Cincinnati, OH. 1985.

VISIOLI, F.; KEANEY, J.F.; HALLIWELL, B. Antioxidants and cardiovascular disease; panaceas or tonics for tired sheep? **Cardiovascular Research**, v. 47, n. 3, p. 409, 2000.

VOGELSTEIN, B., LANE, D., LEVINE, A.J. Surfing the p53 network. **Nature**, v. 408, p. 307-310, 2000.

VON SONNTAG. **The chemical basis of radiation biology**. London: Taylor and Francis, 2^oed, 1987.

VOUSDEN, K.H.; LANE, D.P. p53 in health and disease. **Nature reviews molecular cell biology**, v.8, n.4, p. 275-283, 2007.

WAJANT, H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. **Science**, v. 296, n3, p. 1635-1636, 2002.

WARDMAN, P. Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: progress, pitfalls, and prospects. **Free Radical Biology Medicine**, v, 43, n. 7, p. 995-1022, 2007.

WATANABE, T.; HIRAYAMA, T. FUKUI, S. The mutagenic modulating effect of p-phenylenediamine on the oxidation of 0- or m-phenylenediamine with hydrogen peroxide in the Salmonella test. **Mutation Research**, v. 245: 15-22, 1990.

WEISBURGER, J.H. Carcinogenicity and mutagenicity testing, then and now. **Mutation Research**, v. 437, p.105-112, 1999.

WIEDERSBERG, S.; GUY, R. H. **Dermatopharmacokinetics of betamethasone 17-valerate: Prediction of bioavailability**. In: Brain, K.R.; WALTERS, K.A, eds. Perspectives in percutaneous Penetration, vol.11. STS Publishing, Cardiff, p.101, 2008.

WISEMAN, H.; KAUR, H.; HALLIWELL, B. DNA damage and cancer: measurement and mechanism. **Cancer Letters**, v.93, n.1, p. 113-120, 1995.

WOLFRAM, L. J. Hair cosmetics. In: BAREL, A. O.; PAYE, M.; MAIBACH, H.I. 2 ed. **Hanbook of cosmetic science and technology**. New York: Marcel Dekker, 2001, cap.51, p.581-603.

WOLFRAM, L.J. Human hair: A unique physicochemical composite. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 48, n.6, p. S106-S114, 2013. Supplement.

WYLLIE, A.H.; KERR, J.F.; CURRIE, A.R. Cell death: the significance of apoptosis. **International Review of Cytology**, v. 68, p. 251–306, 1980.

WYNDER, E.L.; ONDERDONK, J.; MANTEL, N. An epidemiological investigation of cancer of the bladder, **Cancer**, p. 1388-1407, 1963.

XANTHOUDAKIS, S.; MIAO, G.; WANG, F.; PAN, Y.C.E.; CURRAN, T. Redox activation of Fos-Jun DNA binding activity is mediated by a DNA repair enzyme. **The EMBO Journal**, vol. 11, n. 9, pp. 3323–3335, 1992.

YAMAZAKI, L.; PIETTE, L.H. EPR spin trapping study on the oxidizing species formed in the reaction of the ferrous ion with hydrogen peroxide. *Journal American Chemistry*, v. 113, p. 7588-7593, 1991.

YAMAZAKI, L.; PIETTE, L.H. ESR spin trapping studies on the reaction of Fe^{+2} ions with H_2O_2 reactive oxygen species in oxygen toxicity in biology. **Journal of Biology Chemistry**, v. 265, p. 13589-13594, 1990.

YAN, A.; ZENGLIN, G.; ZHONGWEN, W.; SHAOHE, Y.; JIANFEN, L.; YAN.F.; KOICHI, K.; MASAYUKI, N.; SHOJI, O.; KENZO, Y. Immunohistochemical analysis of oxidative DNA damage in arsenic-related human skin samples from arsenic-contaminated area of China. **Cancer Letters**, v. 214, p. 11–18, 2004.

YENGI, L.G.; XIANG, Q.; PAN, J.; SCATINA, J.; KAO, J.; VALL, S.E.; FRUNCILLO, R.; FERRON, G.; ROLAND, W.C.; Quantitation of cytochrome P450 mRNA levels in human skin. **Analytical Biochemistry**, v. 316, n.1, p.103, 110.

YONEI, S.; FURUI, H. Lethal and mutagenic effects of malonaldehyde, a decomposition product of peroxidation lipids, on *Escheria coli* with different DNA-repair capacities. **Mutation Research**, v.88, n. 1, p.22-23, 1981.

YOUNG-JIN, S.; CHAN-YOUNG, S.; SOONG, M.; YOUNG-AH. R.; RYU, J.C. Gene expression profiling of hair-dyeing agent para-phenylenediamine, in human keratinocytes (HaCaT) cells. **Molecular Cell Toxicology**, v. 7, p. 339-346, 2011.

YU.H, MOSLEY-FOREMAN, WANG,S. Phototoxicity of Phenylenediamine hair dyes chemicals in *Salmonella typhimurium* TA102 and human skin keratinocytes. **Food and chemical toxicology**,v. 46, n.12, p. 3780-3784, 2008.

YUAN, J. Divergence from a dedicated cellular suicide mechanism: exploring evolution of cell death. **Molecular Cell**, v. 23,n. 1, p. 1–12, 2006.

ZAHN, H. Progress report on hair keratin research. **International Journal of Cosmetic Science**, Oxford, v. 24, n. 2, p.163-169, 2002.

ZANONI, T. B.; LIZIER, T. M.; ASSIS, M. D.; ZANONI, M. V. B; de OLIVEIRA, D.P. CYP-450 isoenzymes catalyze the generation of hazardous aromatic amines after reaction with the azo dye Sudan III. **Food and Chemical Toxicology**, Amsterdam, v. 57, p. 217–226. 2013.

ZHOU, X.; TAGHIZADEH, K.; DEDON, P.C. Chemical and biological evidence for base propenals as the major source of the endogenous M₁dG adduct in cellular DNA. **Journal Biology Chemistry**, v. 280, p. 25377–25382, 2005.

ZINEB, E.; NORDDINE, H, MOUNAJIL, K.; SAID, M.; CADIL, R. Induction of oxidative stress and apoptosis in human neutrophils by p-phenylenediamine. **Journal of Toxicology and Enviromental Health Sciences**, v. 5, p. 142-149, 2013.

ZITVOGEL, L.; CASARES,N.; PÉQUIGNOT, M.O.; CHAPUT, N.; ALBERT, M.L.; KROEMER, G. The immune response against dying tumor cells. **Advances in immunology**, v. 84, p. 131–17, 2004.

ZONG, W-X.; THOMPSON, C.B.; Necrotic death as a cell fate. **Genes & Development**, v. 20, 1–15, 2006.

ZVIAC, C. **The Science of Hair Care**. 4th.San Francisco: Mercel Dekker, 1986. p.1-44.