

**Laboratório de Mutagênese Ambiental
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes
Universidade do Estado do Rio de Janeiro**



Efeitos da Formulação sobre a Inibição de Riscos Genotóxicos de Alisantes para Cabelo

José Luiz Mazzei da Costa
jl_mazzei@hotmail.com

Requisitos Toxicológicos para Ingredientes em Cosméticos – CE e EUA



INFORMAÇÕES NO DOSSIER

- Toxicologia Oral e Dérmica Aguda
- Irritação Ocular, Dérmica e Percutânea
- Sensibilidade Dérmica
- Toxicidade na Reprodução e Teratogenicidade
- Toxicocinética
- Toxicidade Fotoinduzida
- Mutagenicidade (*in vitro* / *in vivo*) – (Genotoxicidade)
- Carcinogenicidade

GENOTOXICIDADE – potencial de uma substância química em reagir com DNA – podendo converter em mutação.

MUTAGENICIDADE – mudança permanente na quantidade ou estrutura no material genético de um organismo.

Requisitos em Cosméticos - Barreiras Técnicas



1976 - COUNCIL DIRECTIVE (EUROPEAN COMMUNITIE) 76/768/EEC

Estabeleceu listas de substâncias proibidas ou de uso restrito como ingredientes em produtos cosméticos:

- **Anexo II** – que não devem fazer parte da composição incluindo pirogalol;
- **Anexo VI** – permitidos como conservantes incluindo formaldeído ao máximo 0,2%.

**1992 - ACORDO DE COOPERAÇÃO INTER-INSTITUCIONAL ENTRE
COMUNIDADE EUROPÉIA E MERCOSUL**

2003 - X RODADA DO COMITÊ DE NEGOCIAÇÕES BIRREGIONAIS

Normas e Regulamentos Técnicos. Acordos de reconhecimento mútuo entre os Estados-partes da Comunidade Européia e do Mercosul.

Lista de Substâncias Proibidas no MERCOSUL



2004 - RESOLUÇÃO Nº 16 DA XXIII REUNIÃO ORDINÁRIA DO SUB-GRUPO DE TRABALHO Nº 11 "SAÚDE"/MERCOSUL

2005 - PORTARIA Nº 19 DA ANVISA

- torna pública a proposta de Projeto de Resolução Atualização da Resolução GMC Nº 6/99 (MERCOSUL) "Lista de Substâncias que não podem ser utilizadas em Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes" em conformidade com o Anexo II da Council Directive 76/768/EEC;
- declara aberto prazo para apresentação de críticas e sugestões.

2005 - SUNSET® E EMBELLEZE®

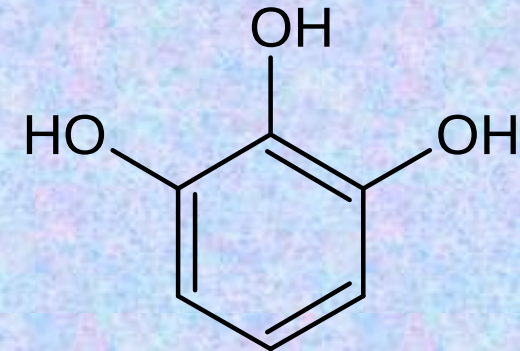
- manifestação de críticas à inclusão do pirogalol na Lista;
- submissão dos produtos próprios à testes de mutagenicidade;
- parceria com o LABMUT → avaliação científica dos resultados.

Pirogalol e Henné



ÁCIDO PIROGÁLICO

- Ingrediente em tinturas capilares oxidativas.
- Propriedades singulares de tingimento e alisamento.
- Regulamentação nos EUA: uso restrito até 5%, baseado em revisão de 1991.



HENNÉS

- 20% do volume de vendas no Brasil dentre “Produtos de transformação de cabelo” no Brasil.
- Mercado de mulheres de 20-55 anos.
- Classes econômicas B2/C.
- Consumo característico “Afro-Étnico”.
- Pirogalol em meio ácido (pH 3,5 – 4,5).

Revisões na Literatura - Indução à Mutagenicidade



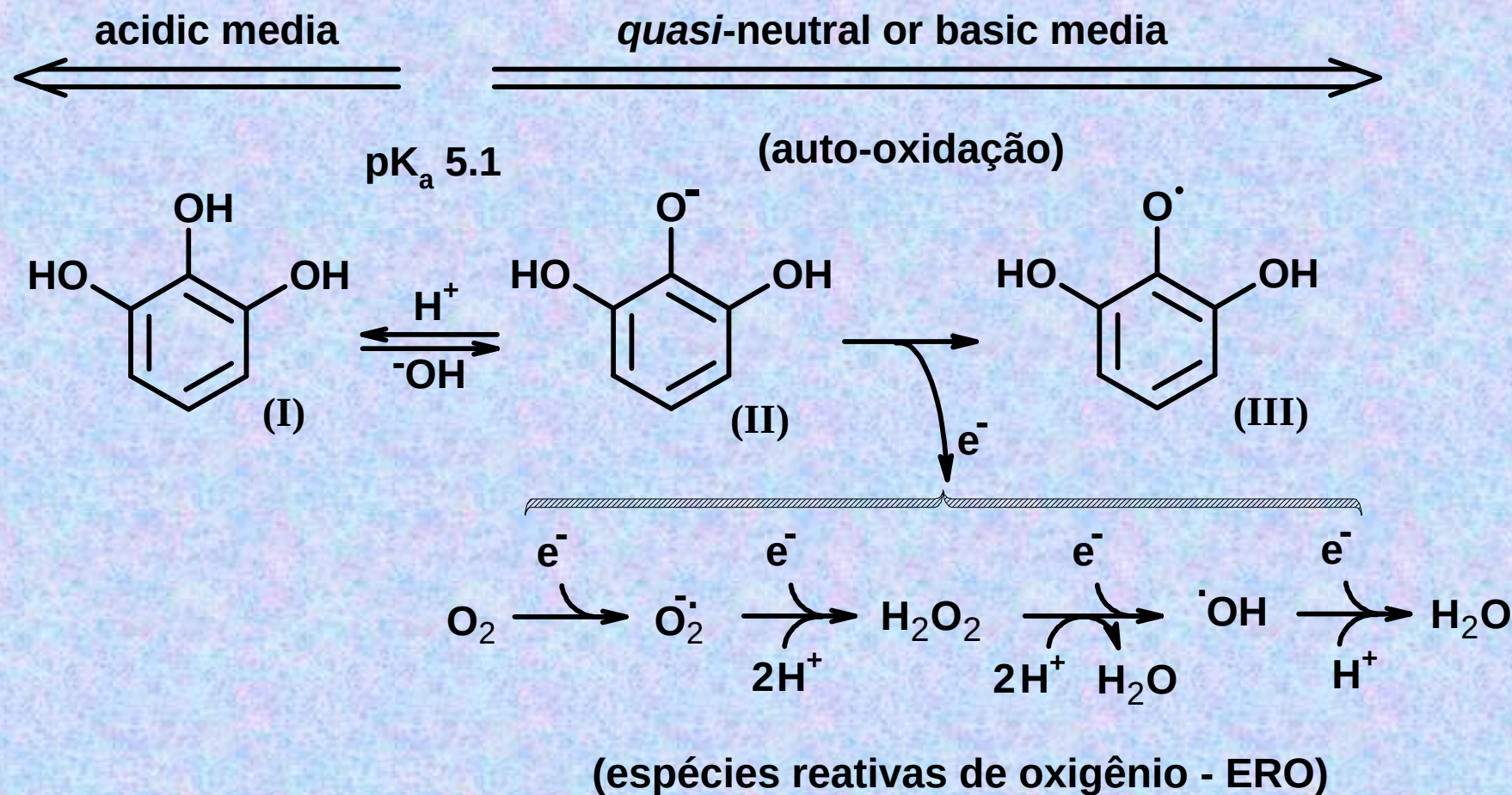
PRODUTOS COSMÉTICOS - Nenhum contendo pirogalol foi testado.

CARCINOGENICIDADE - Estudos não demonstraram atividade do pirogalol.

MUTAGENICIDADE - Matéria-prima e padrões foram positivos:

- Mutação bacteriana reversa de algumas cepas de *Salmonella typhimurium* (pH 7,4), com algumas contradições.
- Micronúcleo em medula óssea de camundongos.
- Mutação recessiva em *Drosophila melanogaster*, sendo um provável “falso-positivo”.
- Quebra da cromátide em células de ovário de hamsteres chineses.

Revisões na Literatura - Auto-oxidação do Pirogallol *versus* ERO



Revisões na Literatura - Efeito de pH na geração de ERO



Inibição da geração de H_2O_2 com o pH abaixo de 7,4.

Akagawa et al., 2003.

Inibição da taxa de autooxidação do pirogalol com o pH abaixo de 8.

Gao et al., 1998.

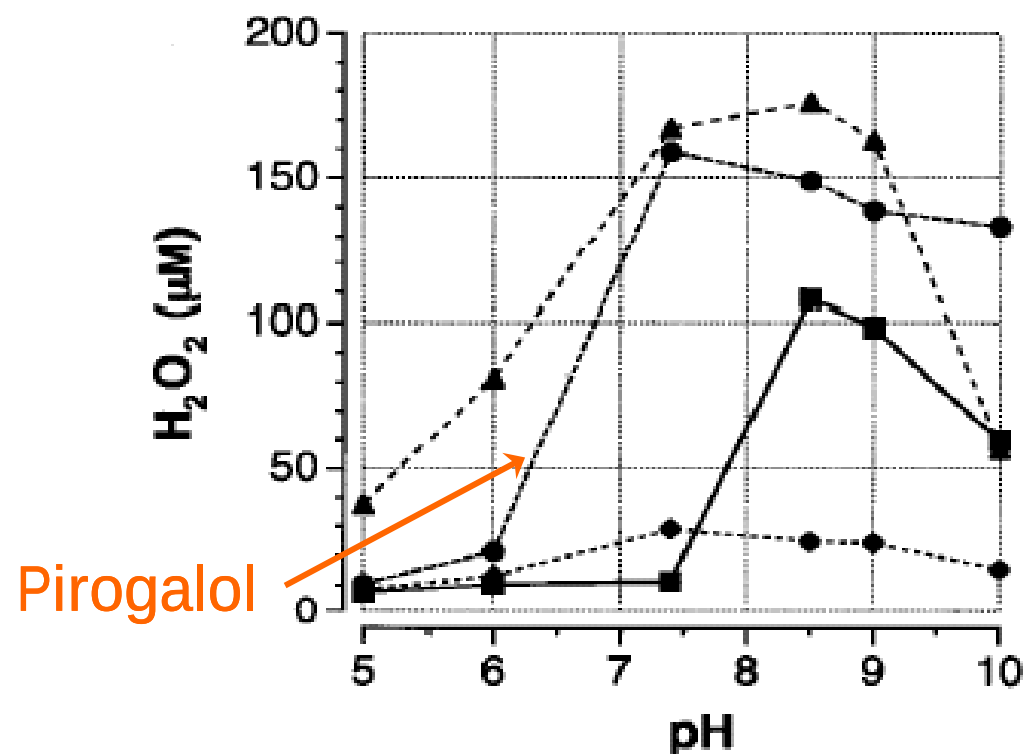


Fig. 7. Effects of pH on Production of H_2O_2 by Pyrocatechol, Hydroquinone, Pyrogallol, and 1,2,4-Benzenetriol.

Each phenolic compound ($250 \mu M$) was incubated in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 5–10) at $37^\circ C$ for 3 h, and then the formation of H_2O_2 was measured by the FOX assay. Data are averages of at least two determinations. S.D. did not exceed $\pm 5\%$ of mean values.

Revisões na Literatura - Efeito de pH *versus* Atividade Mutagênica



Indução de conversão gênica mitótica de *Saccharomyces cerevisiae* e inibição a pH abaixo de 7.

Rosin, 1984.

Inibição, a pH abaixo de pH 7,4, na indução à aberração cromossomal de células V79 de hamsteres chineses.

Céu Silva et al., 2003.

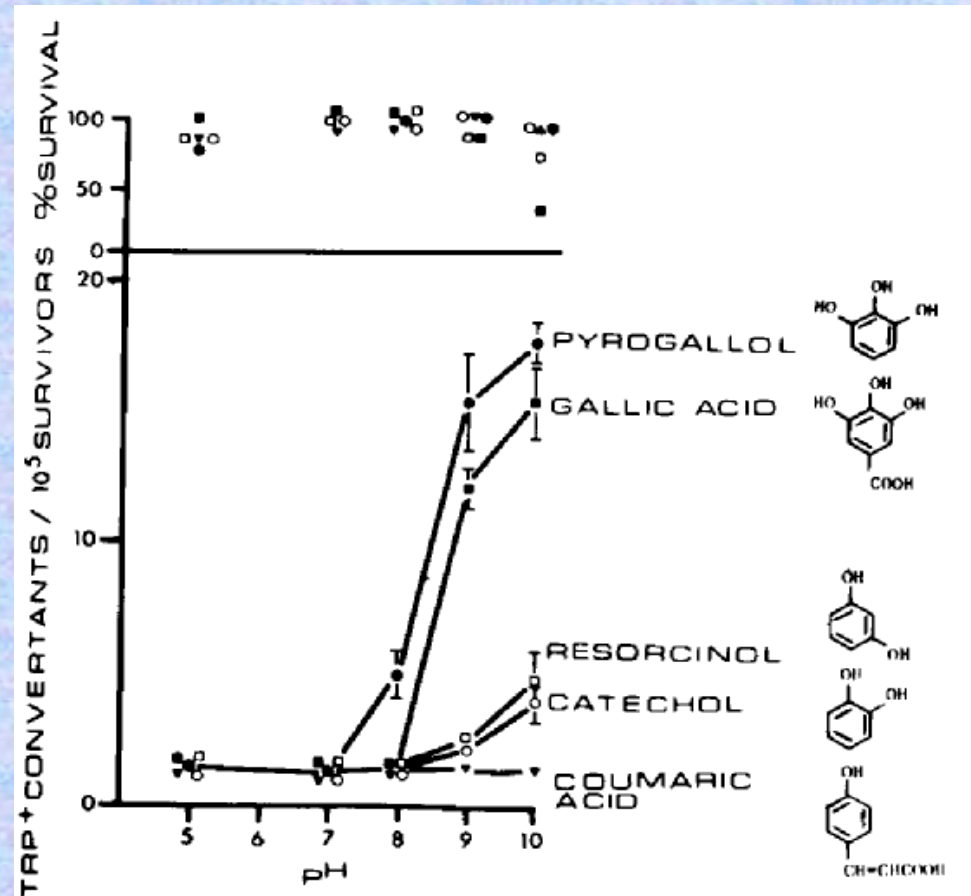


Fig. 1. Frequency of mitotic gene convertants and percent survival of *S. cerevisiae* exposed to phenolics at different pH levels. Concentrations of phenolics used were: pyrogallol (0.1 mg/ml); gallic acid (0.1 mg/ml); resorcinol (1.0 mg/ml); catechol (0.3 mg/ml); and coumaric acid (10.0 mg/ml).

Avaliação Mutagênica de Hennés - Metodologia



Produtos submetidos a testes de mutagenicidade

- Alizador Negro (SunSet® Cosméticos)
- Alizador Negro Forte (SunSet® Cosméticos)
- Henê Gel (Embeleze®)

Laboratório acreditado pela ANVISA e Suíça

Procedimentos validados seguindo OECD

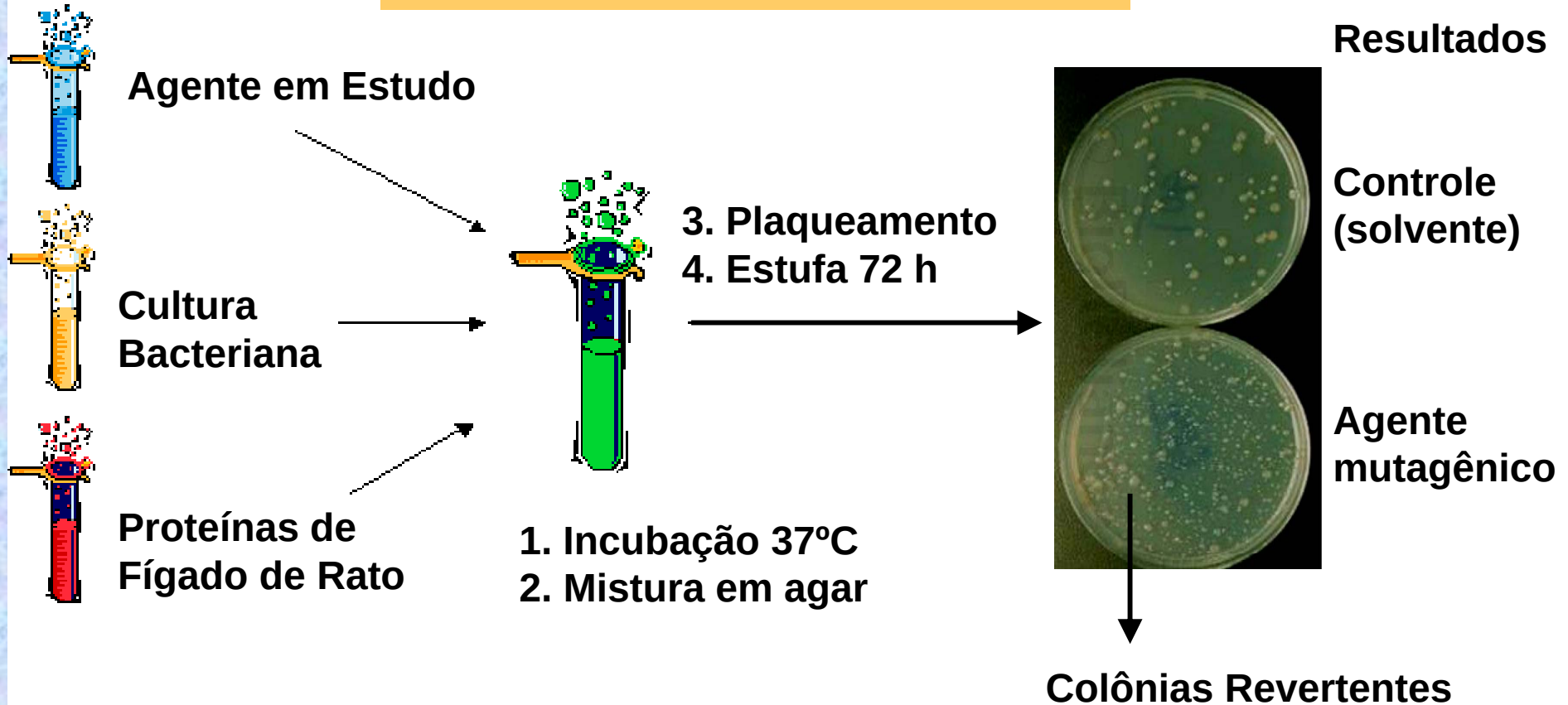
Testes recomendados pela Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental (SBMCTA):

- Mutação Bacteriana Reversa
- Micronúcleo em Medula Óssea de Camundongo

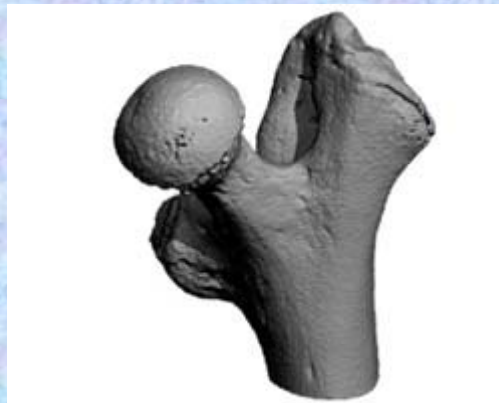
Mutação Bacteriana Reversa



Incubação com cepas bacterianas deficientes da síntese de histidina

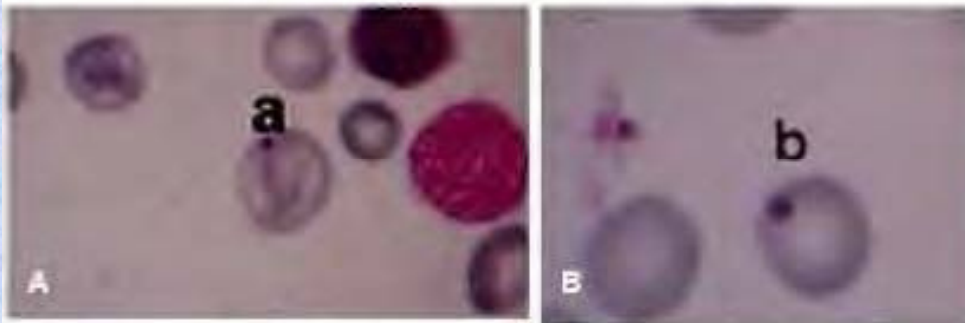


Micronúcleo em Medula Óssea



- Camundongos Swiss
- Grupos de dez animais
- 7 semanas e ~ 30 g
- via gavage
- dose máxima 2 x 2000 mg/kg
- Critérios por comparação com o controle negativo
 - PE/NE ~ 1
 - aumento significativo ($p < 0,05$) de nº PE micronucleados

Figure 1. Photomicrograph showing micronucleated erythrocytes. A) MNPCE in bone marrow (a). B) MNNE in bone marrow (b)



Avaliação Mutagênica de Hennés - Resultados e Conclusão



- Não detectada indução à mutagenicidade pelos produtos testados.
- Possivelmente devido à formulação ácida.
- Não pode-se atribuir riscos de mutagenicidade aos produtos.



Available online at www.sciencedirect.com



Food and Chemical Toxicology 45 (2007) 643–648



www.elsevier.com/locate/foodchemtox

Absence of mutagenicity of acid pyrogallol-containing hair gels

J.L. Mazzei ^a, D.N. da Silva ^b, V. Oliveira ^c, R.Z. Hosomi ^d, R.R. do Val ^d,
C.B. Pestana ^d, I. Felzenszwalb ^{a,*}

^a Departamento de Biofísica e Biometria, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Av. 28 Setembro 87-fd. 4º andar, Vila Isabel, 20551-050 Rio de Janeiro, Brazil

^b Bisdexe Comercial and Industrial, Estr. Engenho da Pedra, 36, 21031-030 Rio de Janeiro, Brazil

^c Phitoteraphia Biofitogenia Laboratorial Biota, Rua Maria de Andrade 79-A, 26261-200 Nova Iguaçu, Brazil

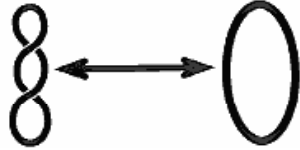
^d TECAM – Tecnologia Ambiental, Rua Fábila 59, 05051-030 São Paulo, Brazil

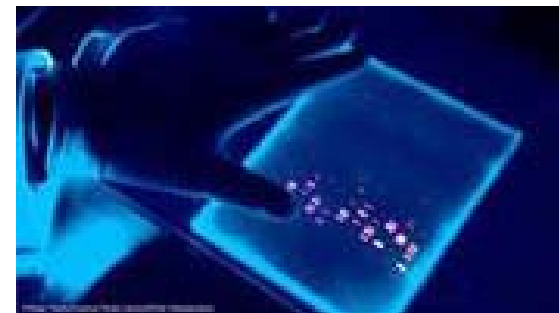
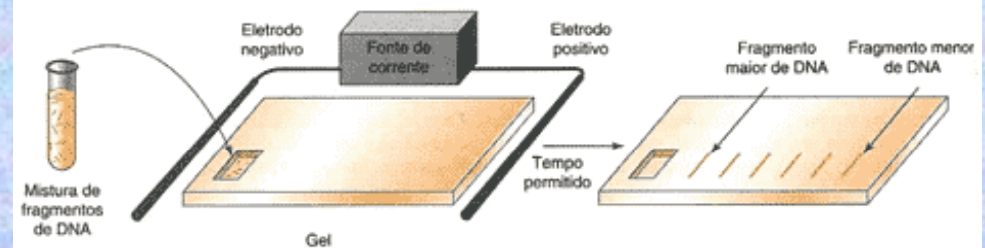
Pirogalol – Efeitos de Formulação Metodologia



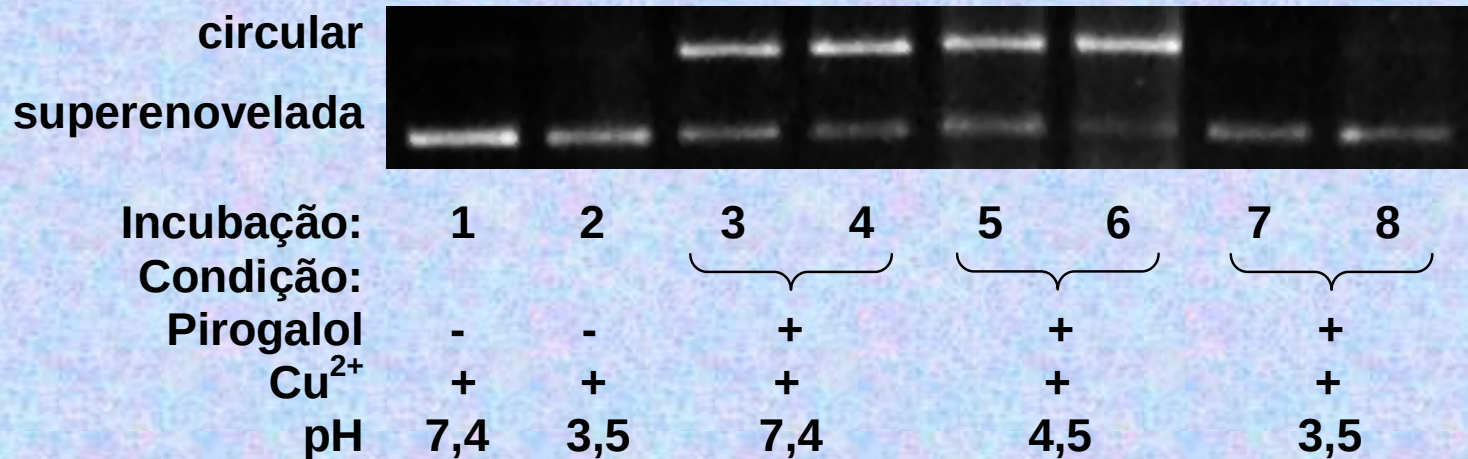
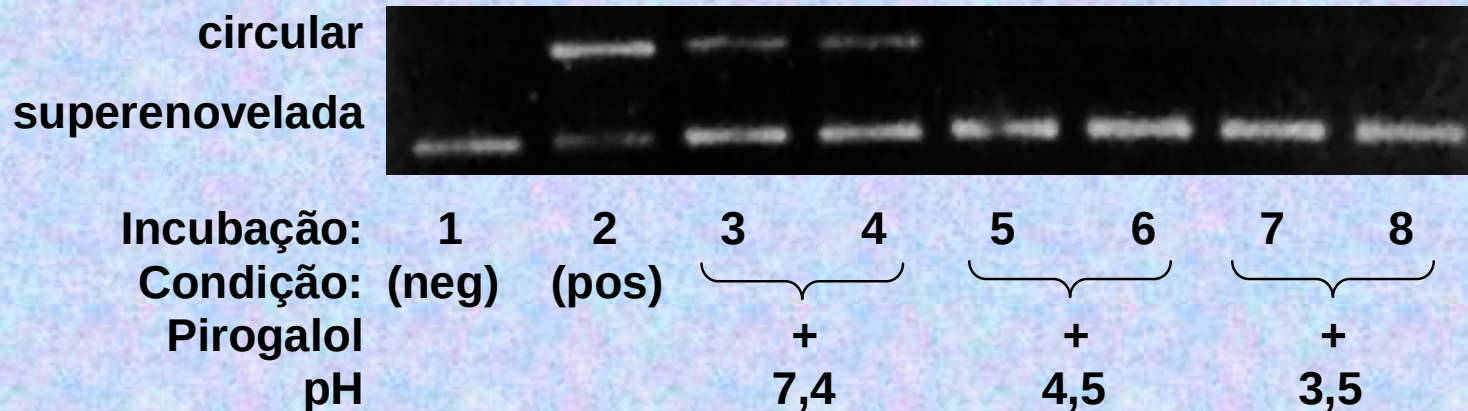
INCUBAÇÃO DO PIROGALOL COM DNA (ENSAIO SENSÍVEL A ERO)

- Pirogalol (99% Pharm grade).
- DNA plasmidial (pBSK)
forma superenovelada
- Incubação 37°C por 1, 3 ou 5 h
- Diferentes pH's 3,5 – 4,5 – 7,4
- Ausência ou presença de Cu^{2+}
- Separação das formas superenovelada e circular relaxada por eletroforese
- Identificação por coloração e fotografia


superenovelada e circular
formas de DNA plasmidial



Pirogalol – Efeitos de Formulação Resultados



Pirogalol – Efeitos de Formulação

Conclusão



- A quebra de cadeia é rápida (1 h = 3 h = 5 h).
- Efeito significativo para pH > 4,5 na ausência de íon bivalente.
- Efeito significativo para pH > 3,5 na presença de Cu²⁺.



VIII Congresso Brasileiro de Mutagenese,
Carcinogênese e Teratogênese Ambiental

MANGARATIBA
Angra dos Reis - RJ
28 a 31 de outubro

Effects of pH and Cupric Ion on the DNA Cleavage Induced by Pyrogallol

José L Mazzei, Juliana de S. Lapa, Israel Felzenszwalb

***Departamento de Biofísica e Biometria, Instituto de Biologia Roberto
Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro***

Escova Progressiva – Riscos de Preparações Domésticas



Denúncias de formulação de cremes alisantes caseiros com formol (2004) no Estado do Rio de Janeiro (ANVISA e Vigilância Sanitária Municipal)

É permitido uso de formaldeído em cosméticos como conservante até 0,2% (EUA, CE, MERCOSUL)

Formaldeído é suspeito de causar câncer em humanos (IARC, EPA, OSHA e NTP).

Perigo nos salões de beleza



ASSISTA AO VÍDEO

Ardência nos olhos, conjuntivite e dificuldades para respirar: há duas semanas a enfermeira Sandra Helena Marques fez, pela terceira vez, a chamada escova progressiva ou restauração capilar. Ela procurou um médico e está usando

um medicamento a base de cortisona, que é um antiinflamatório.

RJTV – 15 / 03 / 2004

Alerta: produto para alisar cabelos tem substâncias nocivas à saúde

15/03/2004

Substâncias químicas nocivas à saúde foram encontradas num novo produto usado nos salões para alisar os cabelos. Só no Rio de Janeiro, a Vigilância Sanitária recebeu mais de 50 denúncias de pessoas que tiveram reação ao creme.

Jornal Nacional – 15 / 03 / 2004

Escova Progressiva – Metodologia

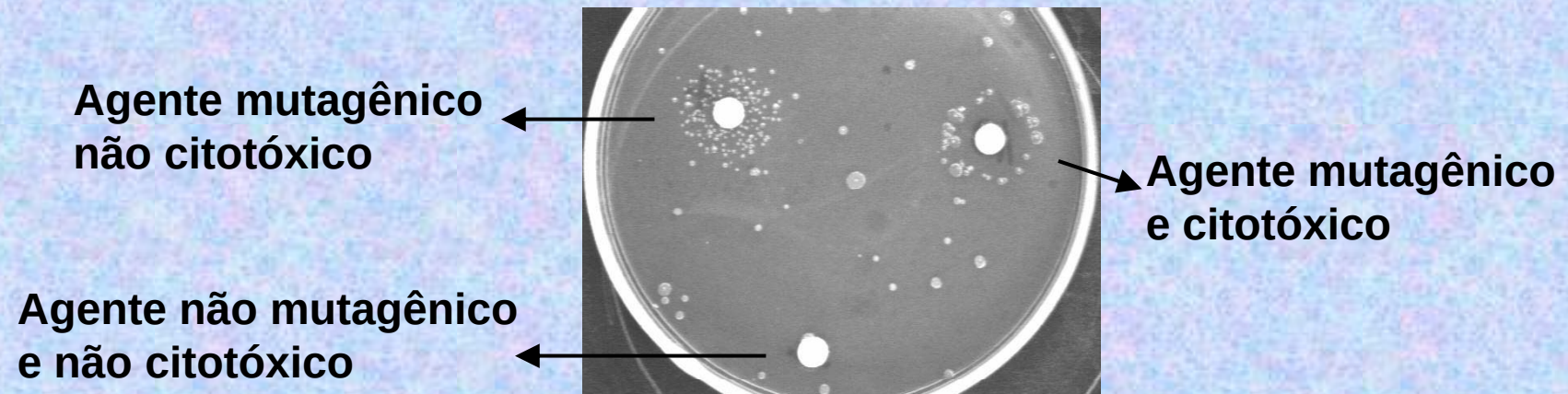


Três cremes alisantes fornecidos por usuárias anônimas

Quantificação de formaldeído por cromatografia líquida

Ensaio *in vitro* de Citotoxicidade/Mutagenicidade:

- **Mutação Bacteriana Reversa – Spot test**



Escova Progressiva - Resultados e Conclusão



- Formadeído em teores preocupantes: **1,6 - 10,5%p/p**.
- Citotoxicidade elevada por todos os cremes.
- Mutação Bacteriana Reversa significativa pelo creme de mais alto grau em formaldeído.

DIVULGAÇÃO NO JORNAL DA CIÊNCIA (SBPC) EM OUTUBRO / 2006

TRABALHO A SER SUBMETIDO A "FOOD AND CHEMICAL TOXICOLOGY"

Genetic Risks of House-Made Creams Used for Progressive Hairy Straightening

**JL Mazzei, EVC Figueiredo, LJ da Veiga, CAF Aiub, PIC Guimarães,
I Felzenszwalb**

***Institute of Biology Roberto Alcantara Gomes / Institute of Chemistry
University of the Rio de Janeiro State, Rio de Janeiro, Brazil***

Regulamentação de Ensaio de Mutagenicidade/Genotoxicidade na CE



THE SCIENTIFIC COMMITTEE ON COSMETIC PRODUCTS AND NON-FOOD PRODUCTS (SCCNFP)

- 2003 (SCCNFP/0720/03) – Estratégia Atualizada Recomendada para Testar Corantes Capilares quanto às Atividades **Genotóxica**, **Mutagênica** e **Carcinogênica**.
- 2003 (SCCNFP/0755/03) – Testes de Ingredientes Cosméticos e Avaliação de suas Seguranças (nota de orientação - 5ª revisão).
- 2004 – Ensaio de **Mutagenicidade/ Genotoxicidade** Recomendados para Testar a Segurança de Ingredientes Cosméticos - a ser incluído nos anexos do Council Directive 76/768/EEC.
- “Por suas propriedades químicas, todos ingredientes dos Anexos III, IV, VI e VII podem apresentar riscos à saúde humana, e desse modo requerem um adequado planejamento de estudos toxicológicos, incluindo estudos de mutagenicidade”**

Ensaio *in vitro* Mutagenicidade/Genotoxicidade

Estratégia Recomendada pela SCCNFP

