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

**AVALIAÇÃO TOXICOGENÉTICA DE EFLUENTES GERADOS EM SALÕES DE
BELEZA, APÓS USO DE TINTURA CAPILAR**

LETÍCIA CRISTINA GONÇALVES

**Rio Claro - SP
2024**

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

**AVALIAÇÃO TOXICOGENÉTICA DE EFLUENTES GERADOS EM SALÕES DE
BELEZA, APÓS USO DE TINTURA CAPILAR**

LETÍCIA CRISTINA GONÇALVES

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do
Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutora em Ciências
Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida
Marin-Morales

Coorientador: Prof. Dr. Matheus Mantuanelli
Roberto

Rio Claro - SP

2024

G635a Gonçalves, Leticia Cristina
Avaliação toxicogenética de efluentes gerados em salões de beleza,
após uso de tintura capilar / Leticia Cristina Gonçalves. -- Rio Claro,
2024
177 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientadora: Maria Aparecida Marin Morales
Coorientadora: Matheus Mantuanelli Roberto

1. Ecotoxicidade. 2. Genotoxicidade. 3. Mutagenicidade. 4. Testes
in vitro. 5. Testes in vivo. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: AVALIAÇÃO TOXICOGENÉTICA DE EFLUENTES GERADOS EM SALÕES DE BELEZA, APÓS USO DE TINTURA CAPILAR

AUTORA: LETÍCIA CRISTINA GONÇALVES

ORIENTADORA: MARIA APARECIDA MARIN MORALES

COORIENTADOR: MATHEUS MANTUANELLI ROBERTO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular), pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. MARIA APARECIDA MARIN MORALES (Participação Virtual)
Depto de Biologia Geral e Aplicada / Unesp - IB Rio Claro



Documento assinado digitalmente
MARIA APARECIDA MARIN MORALES
Data: 2024/02/24 10:45:41 -0500
Verifique em: <https://validar.ri.gov.br>

Profa. Dra. LARISSA FONSECA ANDRADE VIEIRA (Participação Virtual)
Departamento de Biologia / Universidade Federal de Lavras



Documento assinado digitalmente
LARISSA FONSECA ANDRADE VIEIRA
Data: 2024/02/24 18:34:33 -0500
Verifique em: <https://validar.ri.gov.br>

Prof. Dr. BRUNO FIORELINI PEREIRA (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas / Universidade Federal de São Paulo



Documento assinado digitalmente
BRUNO FIORELINI PEREIRA
Data: 2024/02/24 18:32:35 -0500
Verifique em: <https://validar.ri.gov.br>

Prof. Dr. BRUNO DO AMARAL CRISPIM (Participação Virtual)
Universidade Federal de Grande Dourados



Documento assinado digitalmente
BRUNO DO AMARAL CRISPIM
Data: 2024/02/24 18:37:39 -0500
Verifique em: <https://validar.ri.gov.br>

Profa. Dra. BRUNA DE CAMPOS VENTURA CAMARGO (Participação Virtual)
Centro Universitário Sudoeste Paulista



Documento assinado digitalmente
BRUNA DE CAMPOS VENTURA CAMARGO
Data: 2024/02/24 20:03:22 -0500
Verifique em: <https://validar.ri.gov.br>

Rio Claro, 20 de fevereiro de 2024

*Dedico este trabalho aos meus pais, Sergio (in memorian) e Carmem,
a minha irmã Priscila e ao meu marido Diego,
por todo o amor e apoio nas minhas decisões.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me dar forças para vencer os obstáculos e colocar sempre pessoas iluminadas no meu caminho. Por ser meu refúgio, coragem e porto seguro.

Aos meus queridos pais, Sergio e Carmem, por sonharem meus sonhos comigo. Vocês são os grandes responsáveis por essa conquista e tantas outras na minha vida! Pai, obrigada pelas melhores lembranças e ensinamentos. Você sempre será meu grande amor e permanecerá vivo em meu coração, sinto muito a sua falta!

Ao meu marido Diego, pelo apoio, ajuda, companheirismo e sempre estar ao meu lado, não me deixando desistir! Obrigada pela companhia durante esse trabalho, pela paciência, pelo colo, pelos mimos, amor e carinho. Obrigada por partilhar a vida ao meu lado.

À minha irmã Priscila, por todos os cuidados, conversas, apoio, amizade e, acima de tudo, ser uma segunda mãe para mim nessa vida.

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Aparecida Marin Morales, por me aceitar como integrante do seu grupo de pesquisa por tantos anos. Sou eternamente grata pela oportunidade! Obrigada pela paciência, compreensão, todos os ensinamentos sempre com muito carinho e dedicação, os conselhos e acima de tudo sua amizade.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Matheus Mantuanelli Roberto, por aceitar me coorientar nesta jornada, ser uma pessoa sempre presente, compreensiva e paciente. Obrigada por todo carinho e pela amizade.

À Profa. Dra. Lilian Cristina Pereira, pela parceria eficaz e recepção carinhosa estabelecida para o desenvolvimento dos experimentos com *Danio rerio* em seu laboratório TOXICAM, na UNESP de Botucatu/SP.

À Profa. Dra. Dejanira de Franceschi de Angelis e ao Valdenilson José Alves de Oliveira (Zito), por proporcionarem os experimentos com *Daphnia* sp. em seu laboratório.

À Profa. Dra. Mariza Campagnolli Chiaradia Nardi, pelo auxílio nas análises químicas.

Às minhas parceiras de trabalho de Botucatu, Paloma e Cristina, por todos os ensinamentos, ajuda e desenvolvimento dos experimentos com *Danio rerio*.

À todos os meus amigos e colegas mutagênicos: Adriana, Nádia, Laís, Letícia Gigeck, Letícia Rocha, Letícia Rosa, pelo convívio mais que especial.

Às duas mutagênicas especiais, Adriana e Letícia Gigeck, as quais sempre estavam presentes me auxiliando nos experimentos, independente de dias e horários. Obrigada por me ajudarem a executar esse trabalho e, acima de tudo, pela amizade!

Às minhas amigas de trabalho, Júlia, Bianca e Jennifer, por me ajudarem sempre que necessário e serem minhas fiéis escudeiras.

A Fundação Hermínio Ometto-FHO, por permitir o desenvolvimento de alguns experimentos e por fornecer os materiais utilizados.

A todos os professores do Departamento de Biologia e do Programa de Pós-Graduação, área de Biologia Celular e Molecular, pela transmissão de conhecimento durante o doutorado.

A todos os colegas do Departamento de Biologia pelo convívio agradável.

Muito obrigada!!

*"Aqueles que passam por nós, não vão
sós, não nos deixam sós. Deixam um
pouco de si, levam um pouco de nós"*

O Pequeno Príncipe

RESUMO

O processo de coloração capilar é caracterizado como uma técnica milenar de embelezamento humano que perdura até os tempos atuais. Entretanto, esta técnica gera efluentes que impactam diretamente o meio ambiente e a saúde humana. Diante deste cenário, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial toxicogenético de dois efluentes gerados em salões de beleza, após tingimento capilar com a coloração castanha: EC- efluentes provenientes da lavagem capilar, após uso da tintura, com xampus e condicionadores e ET- efluentes provenientes da lavagem capilar, após uso da tintura, somente com água. As avaliações da ecotoxicidade destas amostras foram realizadas por meio de bioensaios *in vivo*, com os organismos-testes *Allium cepa*, *Lactuca sativa*, *Danio rerio*, *Artemia salina* e *Daphnia similis*, e *in vitro*, com cultura de células hepáticas humanas HepG2/C3A. A avaliação da carga poluidora dos efluentes estudados (EC e ET) foi realizada por meio de análises físico-químicas básicas, com sonda multiparâmetro (Horiba®). Os resultados demonstraram um aumento da condutividade e turbidez, indicando que ambos os efluentes podem comprometer o corpo receptor, principalmente, se lançado sem tratamento em corpos hídricos de baixa vazão. Os bioensaios com *A. cepa* mostraram citotoxicidade (alteração do índice mitótico) e genotoxicidade (presença de alterações cromossômicas) para ambos os efluentes (EC e ET), inferindo uma ação aneugênica para os tratamentos realizados com amostras filtradas (F) e não filtradas (NF) em filtro de PVDF (0,45 µm), para as mais altas concentrações. Não foi observado nos ensaios realizados com esse bioindicador a indução de micronúcleos em F1, para nenhum dos tratamentos e diluições testadas. Já os bioensaios com *L. sativa*, apresentaram diminuições nas taxas de crescimento e de germinação. As diluições testadas do EC-NF apresentaram IC₅₀ de 63.14%, enquanto que para EC-F, este índice foi de 65.05%. Já em relação ao tratamento ET-NF, foi verificado um IC₅₀ igual a 73.59%, enquanto que o ET-F apresentou um valor de 90,28%. Por esses resultados, é possível inferir que os efluentes de salão de beleza, contaminados com a tintura capilar castanha e resíduos de xampu e condicionador, apresentaram menor fitotoxicidade, quando filtradas em filtro PVDF, em comparação ao mesmo tratamento sem a filtragem em PVDF. Os bioensaios aquáticos demonstraram toxicidade para ambos efluentes: *D. similis* (CE₅₀ de 3,43% para EC; 0,54% para ET); *A. salina* (CL₅₀ de 8,327% para EC; 3,874% para ET); *D. rerio* (CL₅₀ de 3,90-4,93% para EC; de 6,37-6,59% para ET). Além do parâmetro CL₅₀, foram avaliados também outros *endpoints*, por ensaios realizados com o bioindicador *D. rerio*. Nestes ensaios, foi constatado a mortalidade e processo de coagulação dos ovos, após 144 hpf, para a exposição EC (3,25 e 6,125%) e ET (12,5%), assim como edema de pericárdio e do saco vitelino, após 72 hpf, para a concentração do ET (6,25%). Os resultados das avaliações de ecotoxicidade aquática indicam que as tinturas capilares, mesmo em concentrações residuais, apresentam alto potencial tóxico para a biota aquática, efeito este comprovado pela indução de danos em todos os bioindicadores aquáticos utilizados no estudo. Por fim, pelo ensaio do MTT, realizados com células HepG2/C3A, foi observado citotoxicidade para as concentrações de 100,0% e 50% do EC, e para as concentrações de 100,0%, 50% e 25% do ET. As amostras 100,0% dos EC e ET, assim como as amostras diluídas 50% e 25% para ET também demonstraram citotoxicidade, pelo teste de exclusão do Azul de Tripán. Esses resultados indicam o comprometimento na integridade e permeabilidade da membrana plasmática, além de prejuízos nas atividades mitocondriais. Os resultados do ensaio do cometa demonstraram genotoxicidade para todas as amostras testadas, enquanto nenhum efeito mutagênico foi identificado pelo teste do MN, como também observado para o bioindicador *A. cepa*. Dessa forma, os resultados *in vitro* indicam que concentrações residuais dos efluentes causaram danos primários ao DNA. Foi observado ainda uma diminuição no índice de proliferação após-bloqueio da citocinese (IPBC) e no índice de replicação celular (IR) das culturas submetidas aos efluentes, sugerindo interferências e atrasos

no ciclo celular. Todos os resultados obtidos, tanto pelos bioensaios *in vivo* quanto *in vitro*, evidenciam que as tinturas capilares, mesmo em concentrações residuais, podem comprometer a qualidade ambiental e causar danos à saúde humana. Esses dados alertam para a necessidade desses efluentes passarem por tratamentos prévios, antes de serem lançados no ambiente.

Palavras-chave: ecotoxicidade aquática; citotoxicidade; genotoxicidade; mutagenicidade; embriotoxicidade, testes *in vivo* e *in vitro*.

ABSTRACT

The hair coloring process is characterized as an ancient technique of human beautification that lasts until the the current times. However, this technique generates effluents that directly impact the environment and human health. In view of this scenario, the present study aimed to evaluate the toxicogenetic potential of two effluents generated in beauty salons after hair dyeing with brown coloring: EC - effluents from hair washing, after use of the dye, with shampoos and conditioners and ET - effluents from hair washing, after use of the dye, only with water. The ecotoxicity evaluations of these samples were carried out by means of *in vivo* bioassays, with the test organisms *Allium cepa*, *Lactuca sativa*, *Danio rerio*, *Artemia salina* and *Daphnia similis*, and *in vitro*, with HepG2/C3A human liver cell culture. Assessment of the polluting load of effluents studied (EC and ET) was carried out by means of basic physicochemical analyses, with a multiparameter (Horiba®). The results showed an increase in conductivity and turbidity, indicating that both effluents can compromise the receiving body, especially if discharged without treatment into low flow water bodies. The bioassays with *A. cepa* showed cytotoxicity (alteration of the mitotic index) and genotoxicity (presence of chromosomal alterations) for both effluents (EC and ET), inferring an aneugenic action for the treatments performed with filtered (F) and unfiltered (NF) samples in a PVDF filter (0.45 µm), for the highest concentrations. In the assays performed with this bioindicator, the induction of micronuclei in F1 was not observed for any of the treatments and dilutions tested. On the other hand, the bioassays with *L. sativa* showed decreases in growth and germination rates. The dilutions of EC-NF tested showed CI₅₀ of 63.14%, while for EC-F, this index was 65.05%. Regarding the ET-NF treatment, a CI₅₀ equal to 73.59% was verified, while the ET-F presented a value of 90.28%. From these results, it is possible to infer that beauty salon effluents, contaminated with brown hair dye and shampoo and conditioner residues, showed lower phytotoxicity when filtered in a PVDF filter, compared to the same treatment without PVDF filtration. Aquatic bioassays showed toxicity to both effluents: *D. similis* (EC₅₀ of 3.43% for EC; 0.54% for ET); *A. salina* (LC₅₀ of 8.327% for CE; 3.874% for ET); *D. rerio* (LC₅₀ from 3.90-4.93% for CE; from 6.37-6.59% for ET). In addition to the LC₅₀ parameter, other endpoints were also evaluated by assays performed with the *D. rerio* bioindicator. In these trials, mortality and coagulation process of eggs after 144 hpf were observed for EC (3.25 and 6.125%) and ET (12.5%) exposures, as well as pericardial and yolk sac edema after 72 hpf for ET concentration (6.25%). The results of the aquatic ecotoxicity evaluations indicate that hair dyes, even in residual concentrations, have a high toxic potential for the aquatic biota, an effect proven by the induction of damage in all aquatic bioindicators used in the study. Finally, the MTT assay, performed with HepG2/C3A cells, showed cytotoxicity for concentrations of 100.0% and 50% of EC, and for concentrations of 100.0%, 50% and 25% of ET. The 100.0% EC and ET samples, as well as the 50% and 25% diluted ET samples, were also shown to be cytotoxic by the Tripán Blue exclusion test. These results indicate a compromise in the integrity and permeability of the plasma membrane, as well as impairments in mitochondrial activities. The results of the comet assay demonstrated genotoxicity for all samples tested, while no mutagenic effect was identified by the MN test, as also observed for the bioindicator *A. cepa*. Thus, the *in vitro* results indicate that residual concentrations of the effluents caused primary DNA damage. A decrease in the post-cytokinesis blockade proliferation index (IPBC) and in the cell replication index (RI) of the cultures submitted to effluents was also observed, suggesting interference and delays in the cell cycle. All the results obtained, both by *in vivo* and *in vitro* bioassays, show that hair dyes, even in residual concentrations, can compromise environmental quality and cause damage to human health. These data alert to the need for these effluents to undergo prior treatments, before being released into the environment.

Keywords: aquatic ecotoxicity; cytotoxicity; genotoxicity; mutagenicity; embryotoxicity, *in vivo* and *in vitro* tests.

LISTA DE FIGURAS

3. Revisão de Literatura.....	24
Figura 1- Exemplificação da <i>Daphnia similis</i>	29
Figura 2- Exemplificação de náuplio <i>Artemia salina</i> nas fases II e III.	31
Figura 3- Dimorfismo sexual em zebrafish	33
4. Material e Métodos.....	37
Figura 4- Delineamento experimental da avaliação ecotoxicogenética dos efluentes de salão de beleza, contaminados com resíduos de tintura capilar	39
Artigo 1. Aspectos ecotoxicológicos das tinturas capilares - uma revisão.....	43
Figura 1- Estrutura da Lawsone (2-hidroxi-1,4-naftoquinona), o corante natural da Henna. ..	47
Figura 2- Fórmula estrutural de p-fenilenodiamina (PPD):.....	55
Figura 3- Fórmula estrutural do p-aminofenol (PAP):	55
Artigo 2. Influência da Filtração em Membranas de PVDF na Redução da Toxicidade de Efluentes de Salões de Beleza	74
Figura 1 – Curvas de regressão obtida com os dados germinação de sementes de <i>Lactuca sativa</i> submetidas aos diferentes tratamentos avaliados.	82
Figura 2 - Resultados do teste de citotoxicidade (índice mitótico), realizado com <i>A. cepa</i> , após exposição aos diferentes efluentes, nas suas correspondentes diluições.	85
Figura 3 - Resultados do teste de genotoxicidade (indução de alterações cromossômicas e nucleares), realizado com <i>A. cepa</i> , após exposição aos diferentes efluentes, nas suas correspondentes diluições.....	85
Artigo 3. Avaliação da toxicidade residual de efluentes de salão de beleza sob células humanas.....	103
Figura 1 - Viabilidade celular avaliada pelos testes do MTT e do Azul de Tripan em células HepG2/C3A, após a exposição a efluentes de tintura capilar castanha.....	113
Figura 2 – Comparação dos resultados obtidos nos testes do MTT e do Azul de Tripan realizados com células HepG2/C3A, após a exposição a efluentes de tintura capilar.	114
Artigo 4 - Toxicity of beauty salon effluents contaminated with hair dye on aquatic organisms.....	131

Figure 1. Mortality in zebrafish (<i>Danio rerio</i>) embryos	141
Figure 2. Pericardial and yolk sac edema in zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	142
Figure 3. Standard curve for hair dye mixture obtained by linear regression. Readings were performed at 290 nm, the most suitable wavelength for maximum light absorption.....	144

LISTA DE TABELAS

4. Material e Métodos.....	37
Tabela 1 - Componentes da tintura capilar castanha avaliada no presente estudo.	37
5. Resultados e Discussões.....	42
Artigo 1. Aspectos ecotoxicológicos das tinturas capilares - uma revisão.....	43
Tabela 1- Fórmulas estruturais e moleculares de corantes ácidos utilizados na formulação de corantes temporário e seus efeitos adversos:	48
Tabela 2- Fórmulas estruturais e moleculares de nitroanilinas utilizadas nas formulações de corantes semipermanentes e seus efeitos adversos:.....	50
Tabela 3- Fórmulas estruturais e moleculares de compostos catiônicos utilizadas nas formulações de corantes semipermanentes e seus efeitos adversos:	51
Tabela 4- Fórmulas moleculares e estruturais de acopladores de reação e seus efeitos adversos:	53
Tabela 5 - Resumo das principais patologias cancerígenas relacionadas à exposição humana a corantes capilares.....	61
Artigo 2. Influência da Filtração em Membranas de PVDF na Redução da Toxicidade de Efluentes de Salões de Beleza	74
Tabela 1 - Resultados e os desvios padrão das taxas de germinação de sementes de alface, crescimento de raiz e de fitotoxicidade, após a exposição às amostras do efluente completo (EC).	83
Tabela 2 - Resultados e os desvios padrão das taxas de germinação de sementes de alface, crescimento de raiz e de fitotoxicidade, após a exposição às amostras do efluente da tintura capilar (ET).....	83
Artigo 3. Avaliação da toxicidade residual de efluentes de salão de beleza sob células humanas.....	103
Tabela 1 - Resultados do Ensaio do Cometa realizado com células HepG2/C3A, após a exposição aos efluentes de tintura capilar castanha.....	115
Tabela 2 - Resultados do teste do micronúcleo realizado com células C3A/HepG2, após a exposição às amostras de efluentes contendo tintura capilar castanha.....	116

Artigo 4 - Toxicity of beauty salon effluents contaminated with hair dye on aquatic organisms..... 131

Table 1. Mean mortality of *Artemia salina* during the 48-h exposure to different concentrations of DE and CE..... 139

Table 2. Mean mortality of *Daphnia similis* for 48 h exposure to different concentrations of DE and CE. 140

Table 3. Results of LC₅₀ after exposure to DE and CE during different periods (24, 96, and 144 hpf). 142

Table 4. Results of physicochemical analyses of DE and CE samples, obtained with the multiparameter probe..... 143

LISTA DE ABREVIATURAS

ABIHPEC - Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas

ABSB - Associação Brasileira dos Salões de Beleza

AC - Aberrações cromossômicas

ACit - Atividade citostática

ANABEL - Associação Nacional dos Distribuidores de Artigos de Beleza

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BB - Base de Bandrowski

BCRJ - Banco de Células do Rio de Janeiro

BOD - Biological Oxygen Demand

CAS - Chemical Abstract Service

CBPI - Índice de proliferação por bloqueio de citocinese

CL₅₀ - Concentração letal a 50% da população exposta

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CN - Controle Negativo

CP - Controle Positivo

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DSS - Dodecil Sulfato de Sódio

EEC - European Economic Community

EC - Efluente complete

EC₅₀ - Concentração efetiva em 50% da população exposta

ET - Efluente da tintura

ETEs - Estações de Tratamento de Esgoto

F - Filtrado

FET - The Fish Embryo Acute Toxicity

HepG2/C3A - Linhagem celular de carcinoma hepatocelular humano

IARC - *International Agency for Research on Cancer* (Agência Internacional de Pesquisa em Câncer)

IGen - Índice de Genotoxicidade

IM - Índice Mitótico

IMutF1 - Índice de mutagenicidade

INCI - Nomenclatura Internacional de Ingredientes Cosméticos

IPBC - Índice de Proliferação com Bloqueio de Citocinese

IPCS - Programa Internacional de Segurança Química

IR - Índice de replicação

MMS - Metilmetanosulfonato

MN – Micronúcleo

MTT - *Thiazolyl blue tetrazolium bromide*

NF- Não filtrado

NHL - Linfoma não Hodgkin

NP - Nanopartículas

OD - Oxigênio dissolvido

OECD - *Organisation for Economic Co-operation and Development* (Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico)

OMS - Organização Mundial de Saúde

PAP - Para-aminofenol

PBS - Solução salina tamponada com fosfato

PCPs - Produtos de cuidados pessoais

PPD - P-fenilenodiamina

PMut - Potencial Mutagênico

PPD - Parafenilenodiamina

PNUMA - Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente

PTD - Para-toluenodiamina

PVDF - Filtro de fluoreto de polivinilideno

RSC - Resorcinol

SABRAE - Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas

SDM - Síndrome Mielodisplásica

SDS - Sodium Dodecyl Sulfate

TDS - Sólidos totais dissolvidos

TF - Taxa de fitotoxicidade

USEPA - *United States Environmental Protection Agency* (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos)

WHO - *World Health Organization* (Organização Mundial de Saúde)

SUMÁRIO

1. Introdução	20
2. Objetivos.....	23
2.1 Objetivo geral	23
2.2 Objetivos específicos.....	23
3. Revisão de Literatura.....	24
3.1 Breve histórico da utilização de tinturas capilares	24
3.3 Bioindicadores de ensaios ecotoxicológicos <i>in vivo</i>	26
3.3.1 Bioindicadores vegetais.....	26
3.3.2 Bioindicadores aquáticos.....	28
3.4 Bioindicadores de ensaios ecotoxicológicos <i>in vitro</i>	33
4. Material e Métodos	37
4.1 Característica da tintura capilar utilizada no estudo	37
4.2 Obtenção e processamento dos efluentes para uso nos bioensaios	37
4.3 Lavagem das vidrarias para realização dos bioensaios	38
4.4 Delineamento experimental.....	39
4.5 Bioindicadores <i>in vivo</i>	40
4.5.1 Bioindicadores vegetais.....	40
4.5.2 Bioindicadores aquáticos.....	40
4.6 Bioindicador <i>in vitro</i>	40
4.7 Análises físico-químicas.....	41
4.8 Análise espectrofotométrica	41
4.9 Análise estatística	41
5. Resultados e Discussões	42
Artigo 1. Aspectos ecotoxicológicos das tinturas capilares - uma revisão.....	43
1. Introdução.....	44

2. Revisão bibliográfica.....	45
2.1 Tipos de colorações capilares	46
2.1.1. Coloração Natural.....	46
2.1.2. Coloração Sintética.....	47
2.2 Corante capilar como agente tóxico	56
2.3 Corante capilar como agente tóxico para humanos	57
2.4 Corantes capilares como contaminantes ambientais	63
3. Conclusão	65
4. Referências bibliográficas	65
Artigo 2. Influência da Filtração em Membranas de PVDF na Redução da Toxicidade de Efluentes de Salões de Beleza	74
1. Introdução	75
2. Materiais e métodos.....	77
2.1. Obtenção, preparação e armazenamento das amostras de efluentes	77
2.2. Organismos-teste	77
2.2.1. <i>Lactuca sativa</i>	77
2.2.2. <i>Allium cepa</i>	78
2.3. Bioensaios.....	78
2.3.1. Fitotoxicidade em <i>Lactuca sativa</i>	78
2.3.2. Citotoxicidade e genotoxicidade em <i>Allium cepa</i>	79
2.4. Análise estatística	80
3. Resultados.....	80
4. Discussão	86
5. Conclusão	93
6. Referências Bibliográficas.....	94
Artigo 3. Avaliação da toxicidade residual de efluentes de tingimento capilar: impactos na saúde humana e no meio ambiente	103
1. Introdução	104

2. Materiais e métodos.....	106
2.1. Obtenção, armazenamento e preparação das amostras de efluentes	106
2.2 Cultivo das células HepG2/C3A.....	107
2.3 Tratamentos	107
2.4 Ensaio de citotoxicidade	108
2.4.1 Viabilidade celular (Azul de Tripán).....	108
2.4.2 Teste do MTT.....	108
2.5 Ensaio de genotoxicidade e mutagenicidade	109
2.5.1 Diluições.....	109
2.5.2 Ensaio do Cometa.....	109
2.5.3 Teste do micronúcleo (MN)	110
2.6 Análise estatística	112
3. Resultados.....	113
3.1. Ensaio de citotoxicidade	113
3.2 Ensaio do cometa.....	41
3.3 Teste do micronúcleo.....	115
4. Discussão	116
5. Conclusão	122
6. Referências Bibliográficas.....	122
Artigo 4 - Toxicity of beauty salon effluents contaminated with hair dye on aquatic organisms.	131
1. Introduction	132
2. Materials and Methods	134
2.1. Obtaining, Storing, and Determining Effluent Samples.....	134
2.2. Treatments	135
2.3. Bioassays	135
2.3.1. Test Method with <i>Artemia salina</i>	135
2.3.2. Test Method with <i>Daphnia similis</i>	136

2.3.3. FET Test	136
2.4. Physicochemical Analysis	138
2.5. Spectrophotometric Analysis.....	138
2.6. Statistical Analysis	138
3. Results	139
3.1. <i>Artemia salina</i>	139
3.2. <i>Daphnia similis</i>	139
3.3. FET Test	140
3.4. Physicochemical Analysis	143
3.5. Spectrophotometric Analysis.....	143
4. Discussion.....	144
5. Conclusions	149
6. Conclusões Gerais	161
7. Referências Bibliográficas.....	164

1. INTRODUÇÃO

A busca pela "beleza" é uma constante ao longo da trajetória da humanidade (OLIVEIRA *et al.*, 2014; RIBEIRO *et al.*, 2017; TALON-HUGON, 2018; RAKHMATOVA, 2019). Incessantemente, as pessoas almejam alcançar uma concepção estética, que se modifica em consonância com os padrões e modelos estéticos vigentes, reflexos do conhecimento cultural e étnico característico de um determinado período (FERREIRA, 2010; SISTI; ARYAN; SADEGHI, 2021). Nesse contexto, o ato de tingir os cabelos se estabeleceu como uma prática intrínseca ao estilo de vida da população, impulsionando o crescimento exponencial no número de estabelecimentos comerciais que oferecem esse tipo de serviço (ACHILLES, 2019).

Em 2021, o Brasil alcançou a quarta posição entre os maiores mercados consumidores global de produtos de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos (HPPC), com um valor investido de, aproximadamente, de US\$ 23.738 bilhões. Essa mesma posição é ocupada no setor específico de produtos destinados aos cuidados capilares (ACHILLES, 2019; ABIHPEC, 2021). Até o segundo trimestre de 2021, o setor brasileiro de salões de beleza gerou, aproximadamente, 1,9 milhões de oportunidades de emprego, o que correspondeu a um aumento de 5,6%, em relação ao ano anterior (ABIHPEC, 2021). Dentre os serviços oferecidos, aproximadamente 35 a 40% do faturamento dos salões de beleza é proveniente dos serviços vinculados à coloração capilar, conforme dados da Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos- ABIHPEC, em parceria com o Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas- SEBRAE (2019).

Embora as tinturas capilares venham sendo amplamente usadas desde a antiguidade, ainda há uma preocupação crescente, com relação aos seus efeitos sobre a saúde humana e as consequências da presença de resíduos desses compostos no ambiente. Essa preocupação se deve ao fato dessas tinturas conterem uma variedade de compostos químicos, como corantes, precursores, acopladores e aditivos, que podem causar reações adversas nos sistemas biológicos, que variam desde irritações e sensibilizações cutâneas até efeitos sistêmicos graves, (OLIVEIRA *et al.*, 2014; KIM; KABIR; JAHAN, 2016; HE *et al.*, 2022). Dentre os compostos tóxicos estão o parafenilenodiamina (PPD), para-toluenodiamina (PTD), para-aminofenol (PAP), base de Bandrowski (BB) e resorcinol (RSC) (BESSEGATO *et al.*, 2015; MAIFADI *et al.*, 2020).

A International Agency for Research on Cancer (IARC) alerta que certos compostos presentes nas tinturas capilares podem apresentar efeitos carcinogênicos para humanos. Entre

os compostos tóxicos, estão as substâncias que com grupamento azo (N=N) e as aminas aromáticas (IARC, 2010). Estudos têm sugerido uma possível associação entre a exposição aos corantes e outros componentes das tinturas capilares (como o-toluidina e anilina) e o desenvolvimento de certos tipos de câncer, incluindo de bexiga, mama e hematopoiéticos, como os linfomas (VINEIS; PIRASTU, 1997; GENERATE *et al.*, 2018; EBERLE *et al.*, 2020; PARK; CARREÓN; HANLEY, 2021; AHMADI *et al.*, 2022). Além disso, o uso de tinturas capilares também foi relacionado à irritação da pele, sensibilização e alergias (KIM; KABIR; JAHAN, 2016; ZANONI *et al.*, 2017; TSIMPIDAKIS *et al.*, 2023).

Em termos de volume, os salões de beleza utilizam água como recurso principal dos processos de lavagem. A água resultante da lavagem pode conter contaminantes da tintura, pois, de acordo com os estudos conduzidos por Hueber-Becker *et al.* (2004), apenas cerca de 13% da tintura permanente aplicada no cabelo é retida no processo de tingimento. A maior parte, aproximadamente 87%, é removida durante a etapa de lavagem, contribuindo para a formação de um efluente específico, contaminado pelos constituintes da coloração capilar. Sendo assim, estas águas residuais podem carregar uma grande diversidade de substâncias, que incluem conservantes, umectantes, solventes orgânicos, óleos tensoativos e corantes à base de metais potencialmente tóxicos, como chumbo, cádmio, cromo e arsênio (KHALILI *et al.*, 2019; SCANLON; OSCHMANN, 2023).

A complexidade do efluente se intensifica, proporcionalmente, ao aumento dos procedimentos realizados nos salões de beleza e, conseqüentemente, quanto mais complexo o efluente, maior é a dificuldade em seu tratamento. Segundo a norma ABNT NBR 16383/2015 (ABNT, 2015), as águas residuais, provenientes de salões de beleza, devem ser encaminhadas para a rede de esgoto sanitário ou para sistemas individuais de esgoto sanitário, como as fossas sépticas. No entanto, os efluentes dos salões de beleza têm sido descartados como um efluente doméstico comum, levando esta natureza complexa para a rede de esgoto municipal, onde se mescla aos esgotos de outras fontes poluidoras, tais como residências, indústrias e estabelecimentos comerciais (MAIFADI *et al.*, 2020). Diante desse cenário, torna-se cada vez mais evidente a necessidade de se implementar medidas mais efetivas, que minimizem os impactos ambientais e reduzam os riscos à saúde pública promovidos pelos efluentes de salões de beleza. Outro aspecto igualmente importante é a necessidade de mais estudos que possam avaliar os efeitos desses efluentes sobre a biota aquática e demais organismos eventualmente expostos a essa mistura.

A realização de bioensaios é uma estratégia fundamental e de grande importância a serem usadas em avaliações de impacto ambientais promovidos por contaminantes de origem

antrópica (PLAZA *et al.*, 2005; DOŁĘGOWSKA; GAŁUSZKA; MIGASZEWSKI, 2021). De acordo com Houk (1992), para garantir uma análise ambiental eficaz, é imprescindível realizar uma seleção adequada dos testes, que considere, além das alterações das características físico-químicas do local impacto, os efeitos dessas alterações para o meio biológico relacionado. Assim, o potencial tóxico do contaminante deve ser avaliado por meio de bioensaios realizados com sistemas testes sensíveis, de baixo custo, de fácil manipulação e que respondam prontamente aos efeitos dos contaminantes. Além disso, para se obter uma diversidade maior de dados, é recomendável o uso de diferentes biomarcadores na avaliação (ZHANG; ZHANG, 2012; ZHANG *et al.*, 2020).

No presente estudo, foram realizados ensaios para avaliar o potencial toxicogenético de corante capilar castanho e seus derivados, presentes em efluentes de salão de beleza, coletados pós processo de tingimento capilar. Para avaliação da ecotoxicidade destas amostras, foram realizados bioensaios *in vivo* com os organismos-testes *Allium cepa* (cebola), *Lactuca sativa* (alface), *Danio rerio* (peixe zebra), e com os invertebrados *Artemia salina* e *Daphnia similis* (pulga d'água), além de bioensaios *in vitro*, realizados com a linhagem celular de hepatócitos humanos HepG2/C3A.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve por objetivo geral avaliar o potencial tóxico, citotóxico, fitotóxico, genotóxico, mutagênico e embriotóxico de efluentes de salão de beleza, gerados pelo tingimento capilar com a tintura castanha. Foram avaliados, por meio de ensaios realizados com sistemas-testes *in vitro* e *in vivo*, efluentes gerados das lavagens dos cabelos tingidos somente com água e realizadas com xampus e condicionadores.

2.2 Objetivos específicos

- Investigar o potencial fitotóxico dos efluentes de salões de beleza, por meio de ensaios de germinação de sementes e de inibição de alongamento de plântulas, realizados com o bioindicador *Lactuca sativa*;
- Avaliar o potencial citogenotóxico dos efluentes de salões de beleza, por meio de ensaios de citotoxicidade (alterações do índice mitótico) e de genotoxicidade (alterações cromossômicas e indução de formação de micronúcleos), realizados com bioindicador *Allium cepa*;
- Avaliar o potencial citogenotóxico dos efluentes de salões de beleza para células hepáticas humanas HepG2/C3A, por meio de testes de citotoxicidade (Azul de Tripan e MTT), genotoxicidade (ensaio do cometa) e mutagenicidade (teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese);
- Avaliar a toxicidade aguda dos efluentes de salões de beleza, por meio do teste de letalidade, realizados com bioindicadores invertebrados *Artemia salina* e *Daphnia similis*;
- Investigar o potencial embriotóxico dos efluentes de salões de beleza, por meio de ensaios de efeitos letais e subletais para embriões e larvas de *Danio rerio*, (FET Test);
- Elucidar os possíveis impactos dos efluentes de salões de beleza sob o conceito de Saúde Única.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Breve histórico da utilização de tinturas capilares

As tinturas capilares são consideradas um dos recursos estéticos mais antigos da história da humanidade, sendo amplamente utilizadas em diversas civilizações, há mais de 4.000 anos (OLIVEIRA *et al.*, 2014; REHMAN *et al.*, 2019). Evidências históricas indicam que a coloração capilar, feita a partir de corantes naturais de origem vegetal e mineral, era praticada por homens e mulheres de diferentes origens culturais, como egípcios, gregos, romanos, persas, entre outras (YILDIRIM *et al.*, 2022).

Dentre os corantes capilares naturais, destaca-se a utilização da hena, desde a antiguidade, prática esta comprovada por estudos antropológicos realizados no antigo Egito. Os pesquisadores observaram que as múmias apresentavam indícios de uso de hena em seus cabelos, o que, conseqüentemente, levou esses antropólogos a deduzir que os egípcios usavam a *Lawsonia inermis* (hena) misturada com água quente, para produzir cor laranja-avermelhada aos cabelos (LOYSON, 2011; YATSISHINA *et al.*, 2020). Durante a monarquia inglesa, as mulheres também utilizavam a hena ou até mesmo a decocção do ruibarbo (uma hortaliça comestível), a fim de obter cabelos avermelhados, semelhantes ao ruivo natural da rainha Elizabeth I (TIEGS *et al.*, 2018).

Além da utilização de plantas, várias substâncias inorgânicas exógenas estão associadas à modificação da coloração capilar. Elementos como cromo, cobre, cobalto e níquel são utilizados para obter pigmentação verde, enquanto o ferro é empregado para alcançar a coloração castanha e outros metais para produzir a cor cinza escuro (HOREV, 2004). Registros antigos indicam que, na cultura romana, os homens tonalizavam seus cabelos utilizando pentes de chumbo embebidos em vinho azedo, a fim de escurecer os cabelos grisalhos, assim como obter um aspecto metálico aos fios. Já as mulheres romanas clareavam seus cabelos aplicando lixívia seguida da exposição solar (HUEBER-BECKER *et al.*, 2004; ELMANSOURI, 2023).

Com o passar do tempo, durante a idade moderna, o processo de clareamento tornou-se popular, onde se usava uma mistura de enxofre negro, mel e alúmen, associada à exposição solar. Já durante a renascença, os italianos também clareavam seus cabelos por meio da exposição solar, porém utilizando decocções de cinzas, para se obter o cobiçado loiro veneziano (KUSHWAHA; PANDEY; KUSHWAHA, 2021).

Assim, até ao último terço do século XVIII a coloração capilar era fruto de misturas de plantas e compostos metálicos. Entretanto, a partir de 1800 ocorreu o marco inicial da indústria sintética de corantes capilares, dada pelo relato do químico Dr. August Wilhelm Von Hofmann

sobre as propriedades do composto parafenilenodiamina (PPD) conferir tons de marrom aos cabelos, após exposição a um agente oxidante (LEWIS *et al.*, 2013; JOSEPHY; ALLEN-VERCOE, 2023).

Thiellay e o cabeleireiro parisiense Leon Hugot também contribuíram para o desenvolvimento de tinturas capilares. Nestes casos, eles demonstraram, vantagens da utilização do peróxido de hidrogênio para o clareamento de cabelo, ao invés da aplicação das soluções alcalinas da época (WOLFRAM, 2016). A descoberta do peróxido de hidrogênio teve uma ampla repercussão acerca da sua eficiência e, devido a isso, é utilizado como oxidante base de preparações de tinturas capilares até os dias atuais (CORBETT, 1999; ZANONI, 2017).

Em 1907, o químico Eugene Schueller, fundador da L’Oreal, desenvolveu uma tintura sintética denominada “Aureole”, que se tornou a primeira tintura capilar comercializada. Posteriormente, em 1931, Lawrence M. Gelb lançou o primeiro xampu tonalizante, denominado “Clairol”, um produto de tingimento mais eficiente, devido à ausência de agentes oxidantes (WOLFRAM, 2016; MARSH *et al.*, 2017).

Com os avanços na área química, houve uma intensificação no uso de tinturas capilares, sendo hoje uma prática mundialmente divulgada e usada. De acordo com a IARC (2010), 50 a 80% das mulheres dos Estados Unidos, da União Europeia e do Japão têm seus cabelos tingidos. No Brasil, cerca de 26% da população faz uso de tinturas de cabelo, sendo que desses, 85% são mulheres e 15% homens (INMETRO, 2017).

De acordo com dados da Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (ABIHPEC), o mercado nacional de tinturas capilares também possui foco nas exportações. O Brasil exporta artigos de higiene pessoal para mais de 40 países, sendo que cerca de 75% das exportações destinam-se a países da América do Sul (ABIHPEC, 2012; ABIHPEC, 2021).

A utilização de tinturas capilares se tornou uma ferramenta de transformação da aparência pessoal, mas que também compõe uma área muito importante da indústria de cosméticos (TIEGS *et al.*, 2018). Devido a esta grande demanda, as indústrias enfrentam um grande desafio diário para oferecerem produtos cada vez mais eficazes, de alta fixação e duração da cor e grande variedade de tonalidades (MOREL; CHRISTIE, 2011). Mais recentemente, há uma grande preocupação, quanto à segurança dos produtos, tanto para o meio ambiente quanto para a saúde humana (LORENZON; FACCIO, 2022). Porém, essa preocupação referente ao risco das tinturas para a saúde humana não é recente. No Brasil, a autoridade regulamentadora desta classe de produto (Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA) estabelece uma avaliação prévia acerca da segurança do cosmético, antes de sua liberação para o mercado. Ou

seja, o fabricante é responsável pela segurança do produto cosmético, declarando que possui dados comprobatórios que atestem a eficácia e segurança dos mesmos (IMETRO, 2017).

3.2 Toxicidade e tipos de colorações capilares

Este tópico está detalhadamente apresentado no Artigo 1, intitulado "Aspectos ecotoxicológicos das tinturas capilares", constituindo-se em uma revisão exploratória da literatura científica, acerca das tinturas capilares, seus impactos à saúde humana e ao meio ambiente.

3.3 Bioindicadores de ensaios ecotoxicológicos *in vivo*

Os ensaios ecotoxicológicos, realizados com biossensores, desempenham um papel fundamental para o diagnóstico de qualidade ambiental, por isso são considerados ferramentas essenciais para compreender os efeitos dos contaminantes em ambientes específicos e os possíveis impactos causados por eles (DORNFELD *et al.*, 2000; ESPÍNDOLA; BRIGANTE; DORNFELD, 2003; HALMI, 2016). Assim, entende-se que estes organismos atuam como indicadores biológicos, que fornecem informações valiosas sobre a qualidade do ambiente e a presença de substâncias tóxicas.

3.3.1 Bioindicadores vegetais

Os bioindicadores vegetais são reconhecidos e validados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como eficientes modelos para avaliação do potencial fitotóxico e citogenotóxico (PALMIERI *et al.*, 2016). Os bioindicadores *Allium cepa* (LEME; MARIN-MORALES, 2009; BIANCHI *et al.*, 2016; HARA; MARIN-MORALES, 2017; PAMPLONA-SILVA; GONÇALVES; MARIN-MORALES, 2018; SOMMAGGIO *et al.*, 2018; CARITÁ; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2019) e *Lactuca sativa* (SOBRERO; RONCO, 2004; CHARLES *et al.*, 2011; BAGUR-GONZÁLEZ *et al.*, 2011; PRIAC; BADOT; CRINI, 2017; ARAGÃO *et al.*, 2021) são descritos na literatura científica como organismos eficazes para avaliações de contaminantes ambientais.

O sistema-teste *A. cepa* é considerado um excelente bioindicador toxicológico, reconhecido pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS) e pelo Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (PNUMA), que o certificaram como um método padrão para monitorar a genotoxicidade de poluentes ambientais (GRANT, 1982; GRANT, 1994; MA *et al.*, 1995). Sendo assim, essa espécie se tornou a mais indicada como material-teste padrão

pela “Royal Swedish Academy of Science” (FISKESJÖ, 1985) e pelo “Gene-Tox Program” (GRANT, 1982).

Devido à sua sensibilidade e exatidão deste teste, *A. cepa* é caracterizada como um bioindicador ideal para um primeiro *screening* de citogenotoxicidade de recursos hídricos contaminados, produtos químicos, dejetos industriais e substâncias complexas (CUCHIARA; BORGES; DOBROWS, 2012). Além disso, este sistema possui outras vantagens como, cinética de proliferação rápida, que confere rápido crescimento de suas raízes; grande número de células em divisão; alta tolerância a diferentes condições de cultivo; disponibilidade durante o ano todo; baixo custo e fácil manuseio, devido ao seu número de cromossomos reduzidos ($2n = 16$) e de grande tamanho (LEME; MARIN-MORALES, 2009; BIANCHI; ESPINDOLA; MARIN-MORALES, 2011; NUNES *et al.*, 2011; HERRERO *et al.*, 2012; MAZZEO *et al.*, 2015; HARA; MARIN-MORALES, 2017; SOMMAGGIO *et al.*, 2018; CARITÁ; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2019).

De acordo com Grant (1982), este modelo *in vivo* é indicado para ser usado em avaliações de efeitos tóxicos de poluentes ambientais, por conferir resposta rápida da ação do contaminante e por permitir que suas raízes cresçam em contato direto em qualquer amostra de interesse. O autor descreve algumas características específicas vantajosas deste sistema: (I) clara fase mitótica; (II) número estável de cromossomos; e, (III) rara ocorrência de danos espontâneos. Além das razões expostas, o amplo uso do sistema teste *A. cepa* se dá pelo fato de constituir um sistema conveniente, tanto para parâmetros macroscópicos (crescimento e deformidade), quanto para parâmetros microscópicos (alterações cromossômicas e formação de micronúcleos) (AMARAL, 2007).

Devido a isto, o bioindicador *A. cepa* possui confiabilidade e equivalência com os mais conceituados testes de citogenotoxicidade. De acordo com Fiskesjö (1985), uma substância que induz danos ao sistema-teste de *A. cepa* também pode ocasionar danos biológicos em outros organismos (CHAUHAN *et al.*, 1999; RANK; NIELSEN, 2005; TEIXEIRA *et al.*, 2003). Perante isto, Caritá e Marin-Morales (2008) descrevem *A. cepa* como um bioindicador de grande sensibilidade e boa correlação com sistemas-teste de mamíferos (DOS REIS *et al.*, 2017).

Diversos estudos têm utilizado o sistema-teste de *A. cepa* como uma técnica muito eficaz para determinar a toxicidade e os níveis de poluição do meio ambiente (LIMAN *et al.*, 2010; BIANCHI; ESPINDOLA; MARIN-MORALES, 2011; NUNES *et al.*, 2011; HERRERO *et al.*, 2012), pois é possível levantar informações acerca da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade de várias substâncias (GRANT, 1982; FISKESJÖ, 1985).

A citotoxicidade de uma substância pode ser estimada por meio do índice mitótico (IM), índice este dado pela razão entre as células em divisão celular e o número total de células meristemáticas observadas. As alterações nesse parâmetro, como a sua diminuição, podem indicar que a substância-teste interfere nos processos de crescimento e desenvolvimento. Por outro lado, IM elevado sugere um aumento na taxa de divisão celular, cujo descontrole pode ocasionar a formação de tumores (HOSHINA; MARIN-MORALES, 2009). As alterações cromossômicas e nucleares (AC) podem ser analisadas em células meristemáticas do vegetal em qualquer fase do ciclo celular e, de acordo com o tipo predominante encontrado durante as análises, pode-se inferir o modo de ação do agente investigado (aneugênico e/ou clastogênico) (VIDAKOVIĆ-CIFREK *et al.*, 2002).

O bioensaio com *Lactuca sativa*, uma hortaliça comumente conhecida como alface, é amplamente utilizado em testes de fitotoxicidade (DING *et al.*, 2009) e genotoxicidade (MONTEIRO *et al.*, 2009; EOM *et al.*, 2007). Este vegetal apresenta características citogenéticas estáveis e bem definidas, como o número de cromossomos reduzidos ($2n = 18$) e de grande tamanho (CAMPOS *et al.*, 2008;).

Sendo assim, o teste com esta espécie é caracterizado como simples, confiável, sensível, econômico, de germinação rápida, homogênea, crescimento linear insensível às diferenças de pH em ampla faixa de variação e insensibilidade aos potenciais osmóticos das soluções (GONÇALVES; COELHO; CAMILI, 2016). De acordo com Pelegrini *et al.* (2009), as sementes de alface constituem excelentes materiais bioindicadores da toxicidade de efluentes, pois este organismo-teste possui alta sensibilidade ao estresse químico, o que assegura a reprodutibilidade do ensaio.

Com isto, os bioensaios que utilizam *L. sativa* têm sido preconizados e aplicados por diversas agências de proteção ambiental (OECD, 1984; USEPA, 1989), como o National Water Research Institute, que recomenda a utilização deste bioindicador em testes de toxicidade de efluentes, solos ou sedimentos (DUTKA, 1989).

O teste consiste em expor sementes de *L. sativa* ao composto potencialmente tóxico, para posterior análise da inibição do processo germinativo e do grau de alongamento das raízes (PALMIERI *et al.*, 2016). Tais parâmetros fornecem indicações do grau de toxicidade do composto, podendo indicar seus possíveis efeitos biológicos deletérios.

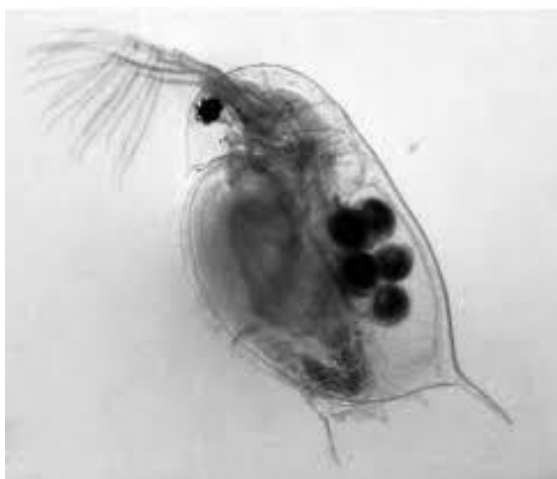
3.3.2 Bioindicadores aquáticos

Na área da toxicologia aquática, os microcrustáceos, como por exemplo *Daphnia similis* e *Artemia salina*, são amplamente utilizados em avaliações ecotoxicológicas. A *D. similis*,

também conhecida como pulga d'água, é um microcrustáceo bentônico de água doce, pertencente à subordem *Cladocera* da família *Daphniidae*. Esta espécie é considerada um dos organismos mais significativos, quantitativamente, em corpos hídricos superficiais (RUPPERT; FOX; BARNES, 2005; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Estes invertebrados são filtradores suspensívoros que se alimentam de partículas em suspensão, como bactérias, fitoplâncton e detritos. Possuem tamanho médio de 0,5 a 5,0 mm de comprimento (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006) e possuem uma carapaça que funciona como uma câmara incubadora dorsal. Este organismo-teste possui dois pares de apêndices sensoriais: um primeiro par de antenas pequenas, com pelos sensitivos, e um segundo par de antenas maiores, que são a principal estrutura de locomoção, permitindo a realização de "saltos" (RUPPERT; FOX; BARNES, 2005) (Figura 1). A captação dos alimentos se dá por movimentos das cerdas, que atuam como peneiras para reter o alimento presente na água. O alimento preso nas cerdas é transferido para a boca, onde é triturado pelas mandíbulas e encaminhado para o trato digestivo. O tempo de retenção do alimento no trato digestivo varia de 30 minutos a três horas (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Figura 1- Exemplificação da *Daphnia similis*



Fonte: ABNT NBR 12713/2016

D. similis apresenta um ciclo de vida de curto. Sua reprodução se dá, preferencialmente, por partenogênese. Nesse tipo de reprodução, a população é composta, exclusivamente, de fêmeas. O desenvolvimento é direto e ocorre na câmara incubadora dorsal. Após a eclosão da prole, a fêmea passa por ecdise e realiza uma nova desova na câmara incubadora. A presença de machos na população está relacionada a fatores ambientais, como variações de temperatura, escassez de alimento e alta densidade populacional. Com a presença de machos, ocorre a

reprodução sexuada, e as fêmeas começam a produzir ovos de resistência, que são liberados e armazenados em um efípio, uma cápsula quitinosa protetora. Esses ovos de resistência são capazes de sobreviver a condições adversas, como dessecação e congelamento, e servem como uma forma de dispersão para os cladóceros (ABNT, 2004; KNIE; LOPES, 2004; RUPPERT; FOX; BARNES, 2005).

A utilização de *D. similis* como bioindicador da qualidade de recursos hídricos se deve a sua alta sensibilidade à ação sinérgica de substâncias presentes na água. Além disso, os ensaios de toxicidade aguda são experimentos de curta duração, que proporcionam respostas rápidas na avaliação dos efeitos tóxicos de produtos químicos, contaminantes de ambientes aquáticos (COSTA *et al.*, 2008; MAGALHÃES; FERRÃO-FILHO, 2008). Com esses ensaios, é possível determinar a concentração de um agente tóxico, que causa um efeito adverso em 50% dos organismos testados, em determinado período de exposição, geralmente entre 24 a 96 horas. É comum calcular, em ensaios com invertebrados, a CE_{50} , isto é, a concentração média efetiva capaz de imobilizar/matar metade da população exposta, sendo expressa em concentração da substância-teste e duração do ensaio. Assim, estes ensaios fornecem informações fundamentais que podem ser utilizadas em estudos mais específicos, como ensaios de toxicidade crônica e avaliação de risco ecotoxicológico (GHERARDI-GOLGSTEIN *et al.*, 1990; JANSSEN; HEIJERICK, 2003; OLIVI *et al.*, 2008).

Além de *D. similis*, outros microcrustáceos também são utilizados em ensaios ecotoxicológicos. A espécie *Artemia salina*, comumente conhecida como camarão de salobra (brine shrimp), é um invertebrado halófilo (que vive em águas salinas) com representatividade importante nesses ecossistemas. Esses organismos são conhecidos por sua capacidade adaptativa de viver em uma ampla gama de variações ambientais (KANWAR, 2007; BARAHONA; SÁNCHEZ-FORTÚN, 1999).

Esses crustáceos são capazes de sobreviver em condições de baixa disponibilidade de oxigênio, podendo habitar águas com teores de O_2 entre 1 e 2 mg/L. A faixa de temperatura ambiente ótima, para esses organismos, varia de 25 a 28 °C, sendo capazes de tolerar temperaturas acima de 35 °C, porém não sobrevivem em temperaturas abaixo de 5 °C. Na fase juvenil, apresentam fototropismo positivo, mas, à medida que crescem, a reação à luz se torna negativa. A alimentação ocorre por meio da filtração de água, com a capacidade de ingerir partículas de alimento com dimensões entre 5 e 50 μm (VEIGA; VITAL, 2002; NUNES *et al.*, 2006) (Figura 2).

Figura 2- Exemplificação de náuplio *Artemia salina* nas fases II e III.



Fonte: ABNT NBR 16530/2016.

As artêmias, devido à sua ampla distribuição, facilidade de obtenção de seus cistos, ausência de necessidade de manutenção das culturas, alta fecundidade, reprodução por partenogênese e tamanho corporal pequeno, tem sido usada, desde a década de 1950, em testes de toxicidade para uma ampla variedade de produtos, como agrotóxicos, petroquímicos, dispersantes, metais pesados, metabólitos de microrganismos e produtos carcinogênicos (MICHAEL *et al.*, 1956; CALOW, 1993; VEIGA; VITAL, 2002). O teste de toxicidade aguda com este bioindicador é de abordagem rápida, de baixo custo e que requer uma pequena quantidade de amostra. O objetivo desse teste é avaliar a relação entre a taxa de sobrevivência das larvas e a concentração da substância ou da amostra testada. Para obter resultados confiáveis, é fundamental que as larvas sejam mantidas em condições ideais de crescimento, incluindo temperatura entre 25 e 35 °C, salinidade em torno de 3,2% e pH levemente alcalino, em torno de 8,0 (MEYER *et al.*, 1982).

Estudos realizados por Nunes *et al.* (2006) destacam a vantagem da tolerância natural desses microcrustáceos, em relação a outras espécies menos adaptadas às variações abióticas do ambiente. Há diversos estudos que utilizaram *A. salina* para testar a toxicidade de inseticidas (SÁNCHEZ-FORTÚN; BARAHONA, 2009), extratos de plantas (PARRA *et al.*, 2001), metabólitos fúngicos (GONZÁLEZ *et al.*, 2007; NIETO *et al.*, 2008), toxinas produzidas por cianobactérias (BEATTIE *et al.*, 2003) e corantes (MANAL *et al.*, 2005; SOUZA *et al.*, 2007; PALÁCIO *et al.*, 2009; AYED *et al.*, 2011; DOJCINOVIC *et al.*, 2011; STAMBOLOVA *et*

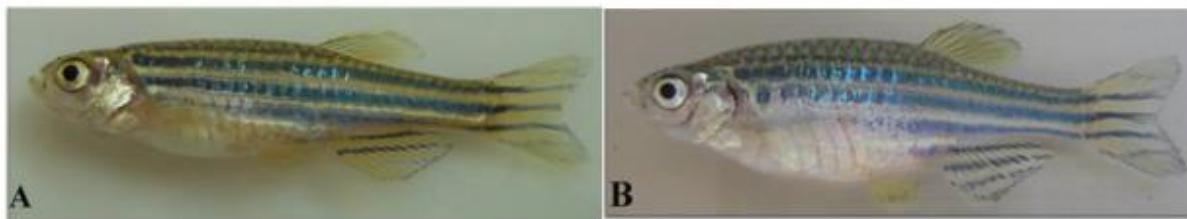
al., 2012). Esses estudos evidenciam a versatilidade desses organismos e a possibilidade de utilizá-los em testes toxicológicos com diferentes compostos.

Outro bioindicador aquático amplamente utilizado é o peixe *Danio rerio*, popularmente conhecido como paulistinha ou zebrafish, tem se consolidado como um organismo modelo amplamente reconhecido para a investigação da toxicidade de contaminantes presentes na água. Cada vez mais, o zebrafish tem sido utilizado como ferramenta alternativa para a avaliação de compostos e amostras ambientais potencialmente tóxicas, como agrotóxicos, fármacos, metais pesados, micro e nanoplásticos (HORZMANN *et al.*, 2018; ALESTROM *et al.*, 2020).

O zebrafish também se destaca por sua notável versatilidade quanto aos seus biomarcadores, pois é possível executar avaliações de desenvolvimento, imunotoxicidade, genotoxicidade, mutagenicidade, neurotoxicidade, embriotoxicidade, alterações comportamentais, toxicidade reprodutiva, desregulação endócrina, além de estresse oxidativo e alterações metabólicas (HILL *et al.*, 2005; GONÇALVES *et al.*, 2020). Consequentemente, observa-se um aumento exponencial no número de publicações científicas que envolvem o zebrafish em suas pesquisas (CASSAR *et al.*, 2016).

Outra vantagem na utilização do *Danio rerio* como organismo-teste, é o seu uso na avaliação de amostras ambientais, pois são necessários poucos exemplares para realização dos ensaios e é possível considerar a ocorrência de diferentes vias de exposição. A via dérmica é uma das vias sugeridas para serem utilizadas nas avaliações, por estar exposta durante todo o período de análise, independente da fase do desenvolvimento após a eclosão, e a oral, devido a abertura da cavidade bucal também estar em constante exposição no meio aquático (KIMMEL *et al.*, 1995).

Esta espécie de peixe de água doce tropical pertence à família *Cyprinidae* e é nativa da região sul da Ásia e Índia. Os adultos podem atingir até 5 cm de comprimento e, em geral, o animal apresenta dimorfismo sexual, ou seja, características fenotípicas distintas entre os sexos, distinguindo-se machos e fêmeas pela forma e cor do corpo (NASIADKA *et al.*, 2012). Os machos apresentam a região ventral mais lisa, enquanto as fêmeas exibem esta região mais proeminente, arredondada e prateada (NASIADKA *et al.*, 2012; GOODWIN *et al.*, 2016). Além disso, os machos possuem uma tonalidade dourada entre as listras azuis ao longo do corpo, especialmente nas nadadeiras caudais. Nas fêmeas, as listras azuis são alternadas com listras prateadas e sua nadadeira dorsal apresenta um tom amarelo mais intenso (NASIADKA *et al.*, 2012; NAGEL, 2002; SCHOLZ *et al.*, 2008) (Figura 3).

Figura 3- Dimorfismo sexual em zebrafish

A- Adulto macho e B- Adulto fêmea.

Fonte: Adaptado de Avdesh et al. (2012).

O ciclo reprodutivo do zebrafish é uma característica atrativa para a sua utilização em testes toxicológicos, pois esse organismo tem uma alta taxa de reprodução e um rápido desenvolvimento até a fase adulta (aproximadamente 3 a 4 meses), após a fertilização (SPENCE *et al.*, 2008). Os embriões passam pelos estágios larval, juvenil e adulto, sendo que o larval é iniciado após a eclosão do ovo, que ocorre entre 48 e 72 horas pós-fertilização. Em 24 a 48 horas, após a eclosão, ocorre a inflação das bexigas natatórias larvais e, em cerca de 5 dias, a organogênese é concluída (SCHOLZ *et al.*, 2008). A transparência dos ovos e das larvas é uma característica adicional, que torna o zebrafish vantajoso como organismo-teste, pois essa permite o acompanhamento do processo de desenvolvimento por horas ou até mesmo dias, após a fertilização (NAGEL, 2002; SPENCE *et al.*, 2008).

O zebrafish, por ter um perfil metabólico conservado e semelhante ao de humanos, tem sido muito utilizado em pesquisas que visam avaliar o metabolismo de xenobiontes com relevância toxicológica (ANSELMO *et al.*, 2018; HORZMANN *et al.*, 2018). Devido à complexidade fisiológica, singularidade no desenvolvimento e adequação em testes *in vitro* e *in vivo*, o zebrafish tem sido fundamental na aplicação de métodos alternativos bem estabelecidos e reconhecidos pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) (OECD, 2013; KAWAKAMI *et al.*, 2016; SOBANSKA *et al.*, 2018).

O genoma do zebrafish é bem mapeado e exibe uma taxa de 70% de homologia com os genes humanos, o que permite a extrapolação dos resultados obtidos com este organismo para a espécie humana (KIMMEL *et al.*, 1995; NAGEL, 2002; SCHOLZ *et al.*, 2008; SPENCE *et al.*, 2008; TEIXIDÓ *et al.*, 2013). Além disso, esse organismo apresenta grande relevância para estudos de biologia do desenvolvimento de vertebrados, especialmente devido à similaridade fisiológica dos sistemas cardiovascular, nervoso e digestivo (NAGEL, 2002).

3.4 Bioindicadores de ensaios ecotoxicológicos *in vitro*

As linhagens celulares de mamíferos têm sido reconhecidas com eficientes modelos a serem usados em avaliações toxicológicas, devido à similaridade que apresentam na

organização do material genético, comparado com sistemas *in vivo*. Além disso, esses modelos oferecem facilidade na padronização das condições dos ensaios (RABELLO-GAY, 1991), alta reprodutibilidade, sensibilidade elevada, rapidez na obtenção dos resultados, bom custo-benefício (ROGERO *et al.*, 2003) e demanda de pequenas quantidades de amostras para a realização dos testes, o que atende as questões éticas de experimentações animal, no âmbito da pesquisa (CARVALHO, 1996). Portanto, de acordo com Rogero *et al.* (2003), são modelos que trazem uma alternativa viável para substituir o uso de animais em testes conduzidos em laboratório.

Dentre as linhagens celulares usadas na avaliação da toxicidade de compostos, destaca-se as células HepG2/C3A, um subclone patentado da linhagem de hepatócitos humanos HepG2. Esta linhagem mantém as características biológicas do fígado humano adulto, pois apresentam atividade enzimática de metabolização de xenobióticos similar, ou um pouco mais baixa, que a atividade regular *in vivo*. Sendo assim, devido à sua competência metabólica, a linhagem celular HepG2/C3A tem sido utilizada em diversos ensaios de citogenotoxicidade (CHEN *et al.*, 2001).

A citotoxicidade é um parâmetro importante que pode ser avaliado em células cultivadas, pois demonstra o efeito de um contaminante sobre a viabilidade celular. O teste de viabilidade celular é, frequentemente, utilizado como um teste preliminar de avaliação da relação dose-resposta da substância ou amostra investigada. Para dar continuidade a outros ensaios com a cultura celular, como avaliação de genotoxicidade e mutagenicidade, é necessária a certificação de uma viabilidade celular maior ou igual a 80%, o que torna os testes prévios de citotoxicidade uma exigência fundamental na análise (KOMISSAROVA, SAHA, ROSSMAN, 2005). Dentre os testes de citotoxicidade, dois deles são amplamente conhecidos: o ensaio de exclusão do azul de Tripan e o teste do MTT.

O teste de citotoxicidade, realizado com o corante azul de Tripan, é um teste colorimétrico que avalia a integridade da membrana celular. Neste teste, como as células viáveis são impermeáveis ao corante, elas não se coram, enquanto que as células lesadas ou mortas são permeáveis e ele, portanto adquirem a coloração azulada (FRESHNEY, 2005). Esta técnica é relativamente barata e efetiva para avaliar agentes tóxicos que causam rompimento da membrana plasmática, portanto indicativos de indução de morte celular. Já o teste do MTT, outro ensaio também colorimétrico, é utilizado para avaliar a citotoxicidade de compostos isolados ou misturas. Este se baseia no metabolismo celular, cujas células ativas absorvem o sal MTT (3-(4,5-dimethylthiazolil-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) e o reduzem a cristais de formazan (1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difenilformazan), dentro das mitocôndrias,

induzindo uma mudança de coloração amarela para roxa. O sinal gerado é dependente do grau de ativação celular, ou seja, no final da reação é possível inferir a quantidade de formazan gerada, que é proporcional à quantidade de células vivas, avaliação esta realizada em espectrofotômetro (HOLST; OREDSSON, 2005). Vários autores têm utilizado testes de citotoxicidade para monitorar a qualidade ambiental e viabilizar ensaios mais elucidativos, como o teste do micronúcleo (MN) e o ensaio do cometa (BIANCHI; CABRAL-DE-MELLO; MARIN-MORALES, 2016; MAZZEO; FERNANDES; MARIN-MORALES, 2016; SOMMAGIO *et al.*, 2018).

De acordo com Mazzeo *et al.* (2013), as linhagens celulares de mamíferos têm sido amplamente utilizadas em avaliações do potencial genotóxico e mutagênico de poluentes ambientais. O teste do MN com bloqueio de citocinese é um teste validado e padronizado para uso em estudos de toxicologia (VRAL; FENECH; THIERENS, 2011). De acordo com Heddle *et al.* (1983), este teste permite inferir o tipo de ação do agente avaliado (clastogênica ou aneugênica). Deste modo, o teste do MN vem sendo utilizado em avaliações do potencial genotóxico e mutagênico de amostras e contaminantes ambientais (BOETTCHER *et al.*, 2010; BIANCHI; CABRAL-DE-MELLO; MARIN-MORALES, 2016; MAZZEO; FERNANDES; MARIN-MORALES, 2016; HARA; MARIN-MORALES, 2017).

Os micronúcleos são estruturas circulares, encontradas no citoplasma das células, compostas por cromatina nuclear, cujo tamanho varia entre 1/5 a 1/20 do tamanho do núcleo principal da célula. Em geral, os MN são resultantes de fragmentação cromossômica, (fragmentos acêntricos) ou de cromossomos inteiros que se perderam durante o processo de divisão celular e não foram reincorporados em nenhum dos núcleos das células filhas. Essa estrutura, geralmente se mantém altamente condensadas (AL-SABTI; METCALFE, 1995). O ensaio do MN é realizado, com sucesso, em diferentes culturas celulares (FENECH, 2000), como HTC (COSTA *et al.*, 2008), HepG2 (MIYAJI *et al.*, 2006) e HeLa (JAGETIA; ARUNA, 2003). A presença de micronúcleo em uma célula geralmente é um indicativo de instabilidade genômica e de danos cromossômicos (LAJMANOVICH *et al.*, 2014), uma vez que eles aparecem quando os danos não foram reparados ou reparados erroneamente nas células parentais, durante a divisão celular.

Uma outra abordagem frequentemente utilizada em avaliação do potencial genotóxico de amostras ambientais, por linhagens celulares, é o ensaio do cometa (KAMER; RINKEVICH, 2002; BOETTCHER *et al.*, 2010; MANZANO *et al.*, 2015). De acordo com Singh *et al.* (1988), o ensaio do cometa é uma técnica capaz de detectar diferentes tipos de danos no DNA, como quebras de fita simples ou dupla, lesões de sítios alcali-lábeis, locais incompletos e crosslinks

(BRIANEZI; CAMARGO; MIOT, 2009). No entanto, para maximizar a detecção de sítios alcali-lábeis e quebras de fita simples de DNA, é recomendada a utilização de pH elevado (pH > 13) nos ensaios (TICE *et al.*, 2000).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Característica da tintura capilar utilizada no estudo

Neste estudo foi utilizada a tintura capilar castanha (Color Touch, código 5/0). A escolha desta tonalidade de deu por esta ser uma das mais utilizadas nos salões de beleza brasileiros. Esta tintura, de acordo com o fabricante, é considerada como tintura semipermanente, mas suas características químicas, conforme descrição da literatura científica, a enquadram como tintura permanente. Os componentes desta tintura capilar comercial estão dispostos na Tabela 1 (também divulgada como material suplementar no artigo 4 da tese, intitulado “Toxicity of Beauty Salon Effluents Contaminated with Hair Dye on Aquatic Organisms” e publicado no periódico Toxics).

Tabela 1 - Componentes da tintura capilar castanha avaliada no presente estudo.

Água	Hidroxietilamido - 3,4 -
Álcool cetosteárico	metilemedioxianililina HCl
Etanolamina	Resorcinol
Lauriléter	Sulfito de sódio
Lauril éter sulfato de sódio	M-Aminofenol
Monoestearato de glicerol	Ácido ascórbico
2,5-Diaminotolueno	EDTA- Fosfato dissódico
Sulfato de sódio	Queratina hidrolizada
Álcool miristílico	2-metilresorcinol
Lauril sulfato de sódio	Dióxido de titânio (CI 77891)
Cera de abelha	Hexil cinamaldeído
Isotionato de cocoyl de sódio	Limoneno
Perfume	Benzoato de benzilo
Pigmento cintilante / perolado	Fenilenodiaminas (Diaminotoluenos)
	1-naftol

Fonte: Rótulo do produto.

4.2 Obtenção e processamento dos efluentes para uso nos bioensaios

Os efluentes gerados em salão de beleza foram obtidos junto a um profissional da área de estética capilar da cidade de Rio Claro/SP, Brasil, que, cordialmente cedeu as amostras do estudo.

A tintura capilar castanha foi aplicada nos cabelos, de acordo com as instruções do rótulo do produto cosmético. O preparo do produto a ser aplicado nos cabelos dos clientes consistiu de uma associação da tintura capilar (40 g) e água oxigenada 40 volumes (40 mL). A mistura desses ingredientes permaneceu por 40 minutos na cabeça do cliente. Após esse

período, a tintura foi retirada da cabeça, por lavagem com água de torneira, até a remoção completa da tintura não fixada. Essa água da lavagem do cabelo foi coletada e caracterizada como efluente da tintura (ET). Foi realizada também uma coleta de outros efluentes da lavagem dos cabelos tingidos que continha, além dos resíduos da tintura, resíduos de xampu e de condicionador, caracterizando a amostra de lavagem completa (água de torneira, para a remoção prévia da tintura não fixada, xampu e condicionador, para a complementação da lavagem capilar), denominada como efluente completo (EC). Esse processo foi realizado, simultaneamente, em duas diferentes voluntárias, o que resultou em apenas uma amostragem de cada efluente citado. Ambos os efluentes foram coletados diretamente da saída do lavatório, no momento da lavagem capilar de cada processo.

As amostras dos dois efluentes foram previamente filtradas em papel filtro qualitativo (gramatura 80 g/m² e diâmetro 9 cm), para a retirada de resíduos grosseiros (ex.: fios de cabelos). Separadamente, os efluentes foram adequadamente armazenados em galões, devidamente identificados e estocados em freezer (-10°C), com o intuito de evitar a degradação de seus componentes, até a montagem dos experimentos. Para alguns bioensaios, os efluentes passaram por filtrações específicas, feitas no dia da realização dos experimentos. Os bioensaios com *Allium cepa* e *Lactuca sativa* foram realizados de duas formas: com o efluente filtrado, como descrito acima, e com filtragem adicional em filtro de fluoreto de polivinilideno (PVDF), de 0,45 µm de poro. Nos bioensaios com a linhagem celular HepG2/C3A, os efluentes passaram por filtragem adicional em membrana de 0,22 µm, necessária para evitar contaminação microbiológica da cultura. Os ensaios com *Danio rerio*, *Daphnia similis* e *Artemia salina* foram realizados com as amostras armazenadas, sem filtrações adicionais.

4.3 Lavagem das vidrarias para realização dos bioensaios

Todas as vidrarias utilizadas para a realização dos bioensaios (frascos e placas de Petri) foram devidamente higienizadas, estabelecendo-se um processo de lavagem composto por diversas etapas. Inicialmente, as vidrarias foram submergidas em água destilada e detergente Extran[®] (Merck, Alemanha), onde foram mantidas “overnight”. Em seguida, foram lavadas em água corrente, até a retirada completa dos resíduos do detergente.

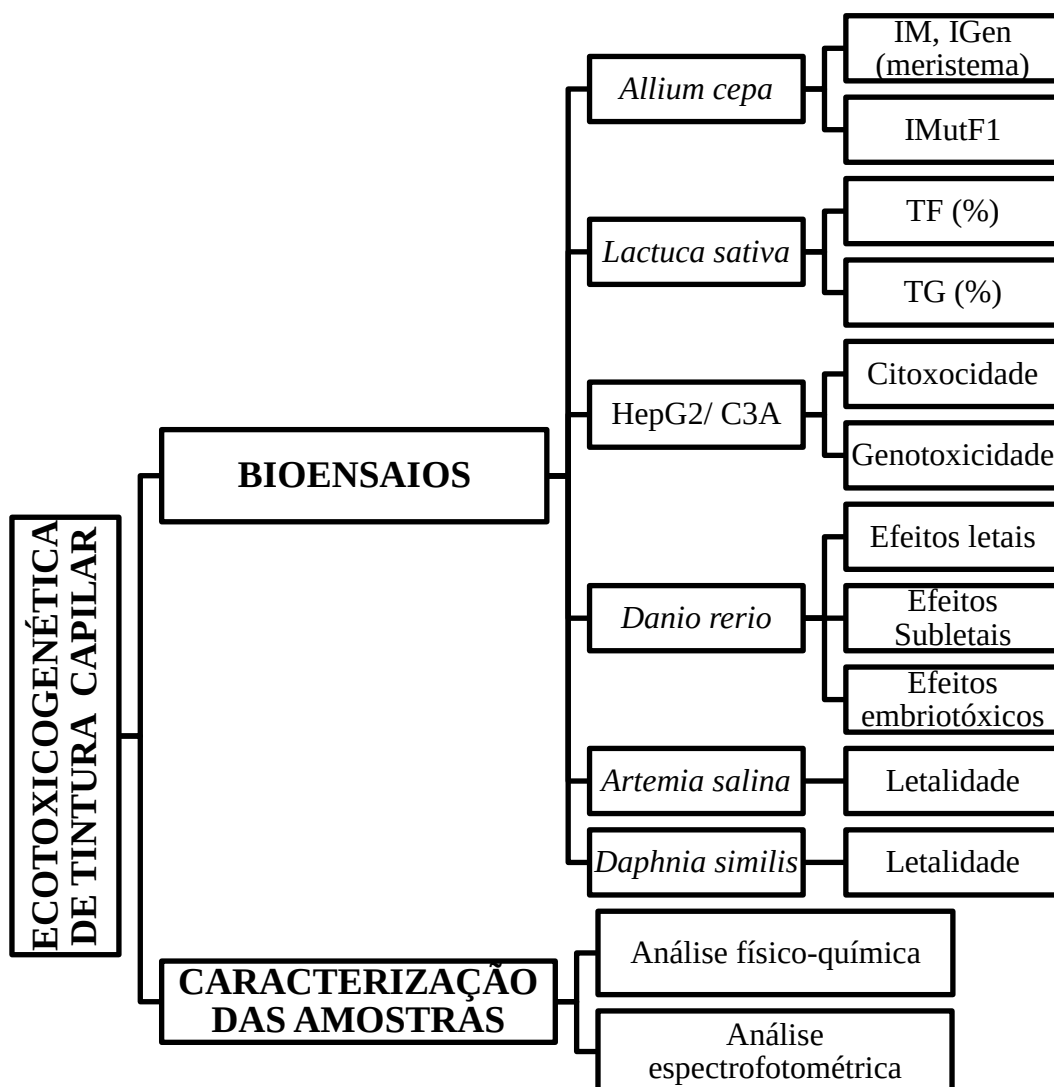
Posteriormente, as vidrarias foram colocadas em estufa a 37 °C, onde permaneceram até a secagem completa. Após este processo, foram colocadas em água destilada e, novamente, mantidas em estufa, nas mesmas condições descritas anteriormente. As vidrarias secas foram submetidas a uma desinfecção com etanol P.A., seguindo, novamente, por uma secagem em estufa. Em seguida, repetiu-se a imersão em água destilada e, mais uma vez, foram secas em

estufa. Ao final, as vidrarias foram borrifadas com acetona P.A., para a retirada de eventuais resíduos orgânico, sendo, a seguir, secas em estufa.

4.4 Delineamento experimental

Os materiais usados e avaliados, bem como os métodos aplicados neste estudo estão resumidamente apresentados na Figura 1 e, detalhadamente, apresentados nos três primeiros artigos, que fazem parte dos resultados desta tese.

Figura 4- Delineamento experimental da avaliação ecotoxicogenética dos efluentes de salão de beleza, contaminados com resíduos de tinta capilar



IM: índice mitótico; IGen: índice de genotoxicidade; TF: taxa de fitotoxicidade; TG: porcentagem relativa de germinação. Fonte: elaborado pela autora.

4.5 Bioindicadores *in vivo*

4.5.1 Bioindicadores vegetais

Foram desenvolvidos ensaios de citotoxicidade (índice mitótico), genotoxicidade (alterações cromossômicas e presença de micronúcleos) com sementes de *Allium cepa* (2n=16), variedade Baia Periforme, e ensaios de fitotoxicidade com sementes de *Lactuca sativa* (2n=18), variedade crespa Grand Rapids. Ambas as sementes utilizadas são isentas de defensivos e foram obtidas junto à empresa Isla Sementes Ltda[®] (Porto Alegre/RS, Brasil).

4.5.2 Bioindicadores aquáticos

4.5.2.1 *Artemia salina*

As larvas de *A. salina* (náuplios) foram obtidas por meio da eclosão de cistos selecionados e embalados a vácuo (*Artemia salina* do RN[®], Brasil), adquiridos em uma loja de aquarismo da cidade de Rio Claro/SP.

4.5.2.2 *Daphnia similis*

Os indivíduos de *D. similis*, utilizados nos ensaios de toxicidade aguda, foram obtidos a partir de culturas mantidas no Laboratório de Ensino e Pesquisa de Toxicidade de Águas, do Departamento de Biologia Geral e Microbiologia da UNESP, Câmpus de Rio Claro/SP.

4.5.2.3 *Danio rerio*

As matrizes utilizadas para obtenção dos ovos de *Danio rerio* foram obtidas no Núcleo de Avaliação do Impacto Ambiental sobre a Saúde Humana (TOXICAM), vinculado ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, câmpus de Botucatu/SP.

4.6 Bioindicador *in vitro*

A linhagem de hepatoma humano HepG2/C3A (ATCC CRL-10741) (BCRJ: 0291), um clone derivado das células HepG2 (ATCC HB-8065, CRL-3581) (BCRJ: 0103), foi adquirida junto ao Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) e são mantidas em cultura no Laboratório de Mutagênese Ambiental do Instituto de Biociências da UNESP, câmpus de Rio Claro/SP.

4.7 Análises físico-químicas

As análises físico-químicas, para determinação de temperatura, pH, condutividade, turbidez, oxigênio dissolvido (OD), sólidos totais dissolvidos (TDS) e salinidade, de ambos efluentes (EC e ET), foram realizadas com a sonda multiparâmetro Horiba (Multi Water Quality Checker U-50 Series, Kyoto, Japão).

4.8 Análise espectrofotométrica

A determinação da concentração da tintura capilar, associada ao peróxido de hidrogênio (água oxigenada), presente nos efluentes estudados (EC e ET), foi realizada por análise espectrofotométrica UV-Visível, conforme descrito no Artigo 4.

4.9 Análise estatística

Todos os ensaios realizados passaram por análise estatística correspondente, que podem ser vistas, com detalhe, nos diferentes artigos apresentados no item **5. Resultados e Discussões**.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados e discussões pertinentes a esse estudo estão apresentados na forma de artigos:

Artigo 1 - Aspectos ecotoxicológicos das tinturas capilares- uma revisão

Artigo 2 - Influência da Filtração em Membranas de PVDF na Redução da Toxicidade de Efluentes de Salões de Beleza

Artigo 3 - Avaliação da toxicidade residual de efluentes de tingimento capilar: impactos na saúde humana e no meio ambiente

Artigo 4 - Toxicity of beauty salon effluents contaminated with hair dye on aquatic organisms

ARTIGO 1. ASPECTOS ECOTOXICOLÓGICOS DAS TINTURAS CAPILARES - UMA REVISÃO

Letícia Cristina Gonçalves^{1,2}, Matheus Mantuanelli Roberto², Maria Aparecida Marin-Morales¹

¹Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Av. 24-A, 1515, 13.506-900, Rio Claro, SP, Brasil.

²Centro Universitário da Fundação Hermínio Ometto (FHO), Av. Dr. Maximiliano Baruto, 500, 13.607-339, Araras, SP, Brasil.

Resumo

As tinturas capilares são amplamente usadas em todas as faixas socioeconômicas e regiões do mundo, embora alguns estudos mostrem que esses produtos contêm substâncias reconhecidamente tóxicas nas suas formulações. Estas práticas de tingimento geram efluentes que podem carrear a toxicidade das tinturas para o meio ambiente. Devido a estes fatos, existe uma grande preocupação quanto aos impactos que esses produtos podem promover tanto ao ambiente, quanto à saúde de seus usuários e dos profissionais desta área da cosmetologia. O presente estudo teve como objetivo compilar informações sobre os impactos e risco das tinturas capilares para a saúde humana e para o meio ambiente, por meio de uma revisão exploratória de estudos científicos divulgados nos principais periódicos indexados nas bases de dados da PubMed, SciELO, Scopus, Google Scholar e MEDLINE. De acordo com a literatura, os componentes das tinturas capilares podem induzir reações adversas nos sistemas biológicos, que vão desde irritações tóxicas reversíveis até efeitos sistêmicos graves. Os componentes desses produtos estão frequentemente associados a diversos tipos de cânceres humanos, como os de mama, próstata, bexiga, pele, oculares e a tumores cerebrais. Além desta ação em humanos, as tinturas capilares também apresentam ecotoxicidade, que pode colocar em risco a manutenção dos ecossistemas eventualmente expostos a resíduos desses produtos. Os impactos ambientais citados são decorrentes de emissões de efluentes obtidos após sucessivas lavagens dos cabelos, para a retirada dos resíduos de tinturas, que não ficaram aderidas aos fios. As características de biodegradação lenta ou não biodegradáveis dos resíduos das tinturas, dificulta a sua retirada das águas residuais, pelos métodos convencionais de tratamento de esgoto. Isso pode levar ao acúmulo desses resíduos no ambiente e alterações dos sistemas hídricos, que decorrem em impactos à vida aquática, à fertilidade do solo e à saúde humana. Os dados sobre a toxicidade dos efluentes de tinturas capilares ainda são escassos e contraditórios, principalmente quanto aos efeitos de seus metabólitos. As informações apresentadas neste estudo podem alertar para o desenvolvimento de mais estudos que possam auxiliar nas tomadas de decisões dos órgãos públicos gestores, quanto a necessidade de implementação de tratamento específicos de efluentes de salões de beleza, principalmente os relacionados com as atividades de tingimento capilar.

Palavras-chaves: impactos ambientais; riscos à saúde; contaminantes emergentes; toxicidade; corantes capilares; metabólitos de corantes.

1. INTRODUÇÃO

A tintura capilar possui uma crescente popularidade mundial, sendo usada por diferentes faixas etárias e sexos, caracterizando um meio de identidade individual e de auto expressão (KIM *et al.*, 2012). Cerca de mais de um terço da população feminina dos países asiáticos, assim como a região europeia e norte-americana estão altamente expostos às tinturas capilares (GAGO-DOMINGUEZ *et al.*, 2001; VEDEL-KROGH *et al.*, 2016). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (IARC, 1993 e 2010), houve um aumento de 35% para 50-80% do uso de tinturas capilares por mulheres. Technavio (2015) também cita um aumento (~5,6%) de uso de tinturas capilares entre jovens do sexo masculino entre o período de 2013-2014). O painel de dados de mercado da Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (ABIHPEC) indicou que o uso mundial de tintura capilar se intensificou ainda mais durante o período de pandemia do COVID-19, resultando em um aumento de 5,8% de vendas em 2020, quando comparado com 2019 (ABIHPEC, 2021). As mudanças das tendências de moda e estilos dos países asiáticos, que se equiparam cada vez mais às ocidentais, também vêm aumentando a popularização dos tratamentos capilares. Esse aumento tem impulsionado o crescimento deste setor industrial, que deverá chegar, em 2024, a um montante de 40,08 mil milhões de dólares (TECHNAVIO, 2019).

Atualmente, o consumo brasileiro de tintura capilar atinge, aproximadamente, 51,4% dos lares brasileiros, sendo que 44,6% dos usuários aplicam as tinturas em suas residências e não em salões de beleza (LADISLAY, 2020). Estudos de Hueber-Becker (2004) mostraram que, independentemente do local (residência ou salões de beleza) ou de quem aplica as tinturas capilares (profissional ou leigo), apenas 13% dela permanece no cabelo, após a coloração, pois é esse percentual que consegue chegar na haste capilar. A maior parte da tintura aplicada é removida pela lavagem dos cabelos e descartado como efluente doméstico, sem nenhum tipo de tratamento prévio. Esse descarte gera um grande problema ambiental, pois os resíduos da tintura são persistentes na água, mesmo após tratamento convencional de efluentes pelas Estações de Tratamento de Efluentes (ETE). Além disso, os corantes capilares também alteram as características do corpo hídrico receptor, devido à sua cor, diversidade, reatividade, solubilidade, volatilidade e estabilidade (MAITI; SINHA; SINGH, 2017).

Outro problema ambiental relacionado às tinturas capilares é que a maioria das marcas mantém suas formulações sob sigilo, o que dificulta ainda mais o tratamento dos efluentes gerados por estes produtos. Dentre os componentes conhecidos das diversas tinturas capilares estão compostos tóxicos e recalcitrantes, como p-fenilenodiamina, p-toluenodiamina, p-diaminas substituídas orto ou para-aminofenóis, derivados aromáticos meta-substituídos, resorcinol e peróxido de hidrogênio (MAITI; SINHA; SINGH, 2017). Tais questões ambientais despertaram preocupações sobre a geração dos efluentes líquidos, tanto pelo próprio usuário final quanto pelas indústrias de cosméticos.

A geração de efluentes líquidos nas indústrias de cosméticos possui basicamente dois grandes interferentes na composição: a frequência das operações de lavagem de equipamentos (CETESB; ABIHPEC, 2005; ABIHPEC, 2015) e o tipo de produto elaborado. Comumente os efluentes apresentam elevada demanda química de oxigênio (DQO), com altas concentrações de compostos orgânicos, cuja biodegradabilidade é reduzida, como por exemplo, os conservantes, misturas de surfactantes, corante e fragrâncias (BAUTISTA *et al.*, 2007; EL-GOHARY *et al.*, 2010; PERDIGÓN-MELÓN *et al.*, 2010).

Frente a problemática apresentada, o presente estudo teve por objetivo compilar informações da literatura científica sobre os impactos que os corantes capilares promovem no ambiente, bem como os riscos destes compostos para a saúde humana. Embora existam muitos artigos publicados na literatura sobre a toxicidade dos corantes capilares, ainda há uma lacuna quanto aos impactos ocasionados pelos efluentes de salões de beleza portadores desses corantes.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Muitos produtos da indústria da beleza podem conter substâncias não regulamentadas, de alta toxicidade, o que pode colocar em risco tanto o consumidor como o ambiente. Muitas desses produtos podem liberar compostos perigosos (hidróxido de lítio, hidróxido de cálcio, carbonato de guanidina e tioglicolato de amônia), muitos deles de característica genotóxica (IARC, 1993; LEINO *et al.*, 1998; NKANSAH *et al.*, 2020). Neste contexto, os salões de beleza geram uma grande variedade de resíduos (álcalis, ácidos, relaxantes, corantes e outros produtos químicos) que comprometem à saúde da população e alteram as características ambientais do local onde estão lançados (ISGS, 2016).

O presente estudo foi delineado com o objetivo realizar uma revisão exploratória da literatura acerca das tinturas capilares, investigando o impacto destas na saúde humana e no

meio ambiente. Esta revisão teve por base estudos científicos publicados em periódicos indexados nas bases de dados da PubMed, SciELO, Scopus, Google Scholar e MEDLINE.

2.1 TIPOS DE COLORAÇÕES CAPILARES

2.1.1. Coloração Natural

As colorações naturais possuem uma composição de peso molecular elevado, que leva a uma fraca afinidade com a queratina do cabelo, ou seja, não penetram ou penetram muito pouco no fio, permanecendo, praticamente, na superfície capilar (PINHEIRO *et al.*, 2002; PRUNIÉRAS, 1994; HEMIELEWSKI, SILVEIRA, 2016). Geralmente, este tipo de tintura deriva de plantas como, por exemplo, a noqueira (*Juglans regia*), para obtenção do pigmento marrom; camomila (*Matricaria chamomilla*), para pigmentação amarela; hena (*Lawsonia inermis*) e índigo (*Indigofera tinctoria*), para tons de preto escuro (HUENER-BECKER *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

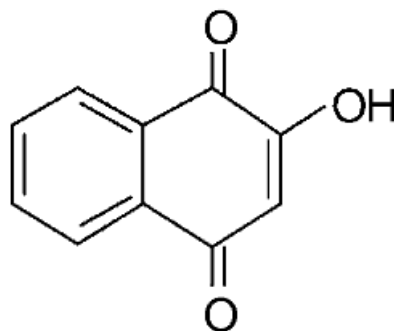
A utilização das colorações naturais, teve origem há cerca de 4000 anos (OLIVEIRA *et al.*, 2014). De acordo com Chua & Levell (2005), as mulheres Venezianas do sec. XVI seguiam uma publicação (Dicionário Feminino de 1694), que fornecia fórmulas para modificar a coloração de seus cabelos. Dentre as fórmulas sugeridas como tinturas, a maioria delas eram constituídas de uma mistura de bagas de sabugueiro com vinho para conferir uma coloração preta; uso do extrato do radish, para a cor castanho claro; e uma mistura de cal e açafraão para as tonalidades loiras (CHUA; LEVELL, 2005).

Os corantes naturais apresentam diversos benefícios, quando comparadas com as tinturas sintéticas, sendo o principal deles a baixa alergenicidade, o que a faz com que sejam altamente recomendados para usuários sensíveis as tinturas oxidativas. Entretanto, a coloração natural oferece uma faixa de cores limitada devido à baixa estabilidade de suas formulações, em comparação à grande variedade de cores das tinturas permanentes (BOLDUC; SHAPIRO, 2001; ARALDI; GUTERRES, 2005). Outra vantagem, é que as tinturas capilares de origem vegetal são atóxicas, porém sua fixação aos cabelos é por curto período de tempo (GUERRA-TAPIA; GONZALEZ-GUERRA (2014).

Atualmente, a maioria das tinturas naturais são a base de “henna”, uma substância, a Lawsonsone (2-hidroxi-1,4-naftoquinona), que é extraída diretamente das folhas desta planta ou manufaturadas como produto purificado, exemplificada na Figura 1 (NOHYNEK *et al.*, 2004). De acordo com Semwal *et al.*, (2014), a hena possui uma cor marrom avermelhada e alguns princípios ativos oriundos de óleos essenciais como alfa e beta-iononas, flavanóides,

xantonas (laxantona I, II e III) e cumaria. Assim, além de possuir ação colorante, ela também possui propriedades adstringentes, anti-inflamatórias, antifúngicas e antibacterianas.

Figura 1- Estrutura da Lawsone (2-hidroxi-1,4-naftoquinona), o corante natural da Henna.



Fonte: NOHYNEK *et al.*, 2004.

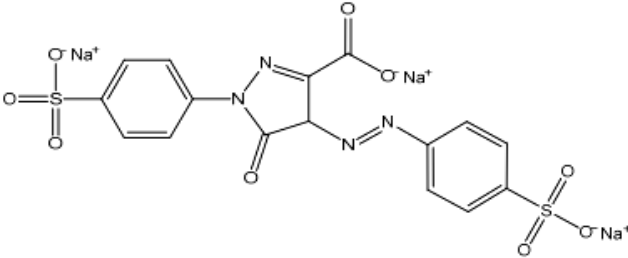
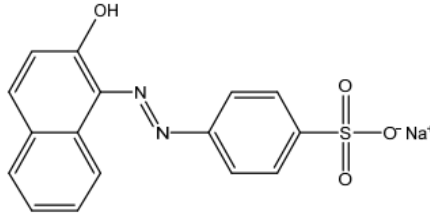
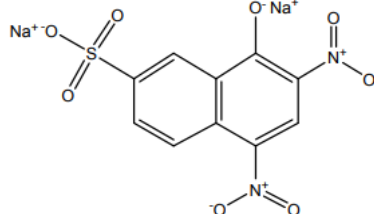
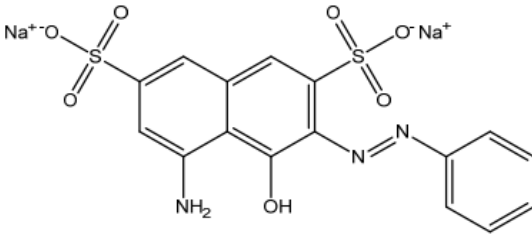
2.1.2. Coloração Sintética

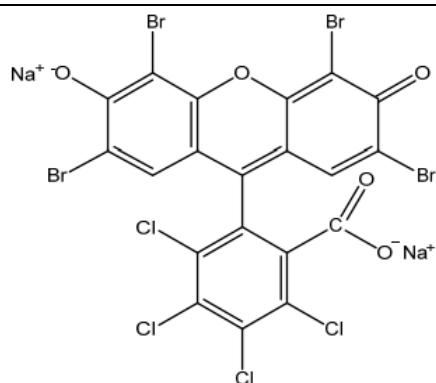
Os corantes sintéticos possuem formulações de baixo peso molecular, cuja composição frequentemente contém aminas, amino-fenóis e fenóis (NOVOTNÝ ET AL., 2006; ZANONI; YAMANAKA, 2016). Estes compostos podem ser danosos à saúde humana, uma vez que as aminas são substâncias bioativas, capazes de induzir efeitos mutagênicos ou carcinogênicos, quando absorvidas percutaneamente (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

De acordo com Gomes (2019), as colorações sintéticas podem ser classificadas em: coloração sintética temporária ou semipermanente e oxidativa ou permanente. As tinturas temporárias são basicamente corantes diluídos em meio aquoso, que apresentam composições de caráter ácidas e fraca afinidade pela queratina do cabelo. A baixa afinidade com a queratina gera ligações extremamente fracas de efeito passageiro, o que leva a sua remoção em poucas lavagens (GUERRA-TAPIA; GONZALEZ-GUERRA, 2014). De modo geral, como os corantes sintéticos temporários não penetram no córtex capilar, eles são reconhecidos como de menor toxicidade, comparados aos permanentes (SCARPI *et al.*, 1998; HARRISON; SINCLAIR, 2003; DRAELOS, 2005; CHISVERT; CHÁFER; SALVADOR, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Alguns dos principais corantes ácidos empregados na formulação temporária estão exemplificados na Tabela 1.

Tabela 1- Fórmulas estruturais e moleculares de corantes ácidos utilizados na formulação de corantes temporário e seus efeitos adversos:

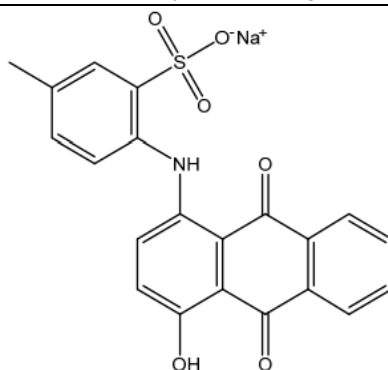
Corantes- INCI	Características	Efeitos
Acid Yellow 23	 Fórmula: $C_{16}H_{12}N_4O_9S_2 \cdot 3Na$ CAS No. 1934-21-0	• Não foram observados efeitos adversos significativos em ratos, em estudos de alimentação de longo prazo; • Pode causar sensibilização cutânea e respiratória, após contato prolongado.
Acid Orange 7	 CAS No. 633-96-5 Fórmula: $C_{16}H_{12}N_2O_4S \cdot Na$	• Não é irritante ocular para coelhos; • Nenhuma evidência de sensibilização cutânea; • Alterações hematológicas observadas em estudo de exposição oral em ratos; • Nenhuma evidência de teratogenicidade.
Acid Yellow 1	 CAS No. 846-70-8 Fórmula: $C_{10}H_6N_2O_8S \cdot 2Na$	• Provoca irritação cutânea; • Pode causar sensibilização cutânea, após exposição prolongada ou repetida.
Acid Red 33	 CAS No. 3567-66-6 Fórmula: $C_{16}H_{13}N_3O_7S_2 \cdot 2Na$	• Provoca irritação ocular grave (Lesões oculares graves).

Acid Red
92

CAS No. 18472-87-2

Fórmula: $C_{20}H_4Br_4Cl_4O_5 \cdot 2Na$

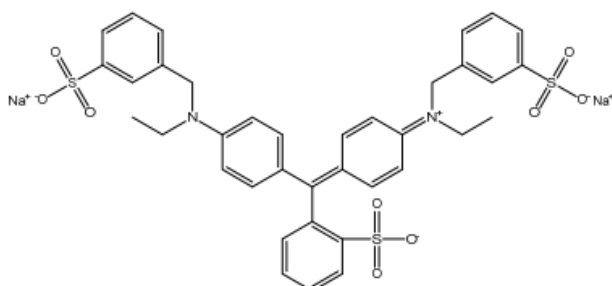
- Provoca irritação ocular grave;
- Pode provocar danos aos órgãos após exposição prolongada ou repetida;
- Nocivo para os organismos aquáticos, com efeitos duradouros.

Acid
Violet 43

CAS No. 4430-18-6

Fórmula: $C_{21}H_{15}NO_6S \cdot Na$

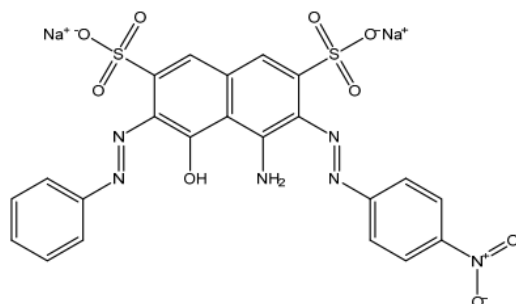
- Apresenta efeitos corrosivos;
- Provoca lesões oculares graves;
- Nocivo para os organismos aquáticos, com efeitos duradouros.

Acid Blue
9

CAS No. 3844-45-9

Fórmula: $C_{37}H_{36}N_2O_9S_3 \cdot 2Na$

- Carcinogênico para ratos após repetidas injeções subcutâneas, fibrossarcomas;
- Sem dados para humanos;
- Carcinogênicos pela IARC: Grupo 3.

Acid Black
1

CAS No. 1064-48-8

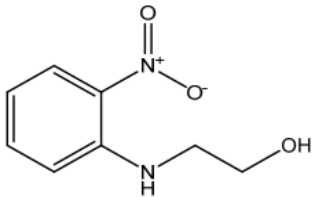
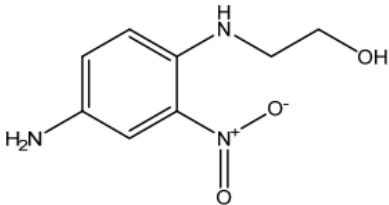
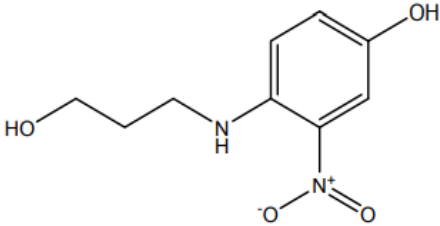
Fórmula: $C_{22}H_{14}N_6O_9S_2 \cdot 2Na$

- Pode afetar os órgãos, após exposição prolongada ou repetida

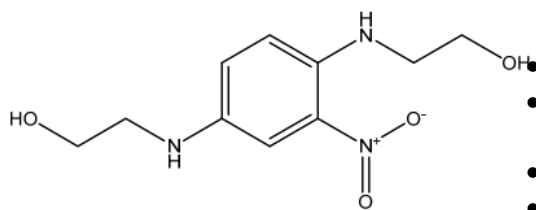
INCI, Nomenclatura Internacional de Ingredientes Cosméticos; CAS, Chemical Abstract Service.
Fonte: Elaborado pelos autores com base em EPA (2023).

Os corantes sintéticos semipermanentes possuem baixo ou médio peso molecular e, comumente, apresentam em sua estrutura molecular grupos nitro e amins aromáticas, tais como aminofenóis e ésteres de aminofenóis, conforme listado nas Tabela 2 e Tabela 3. Este tipo de coloração se assemelha as colorações sintéticas permanentes, entretanto, devido a sua fraca interação com o fio de cabelo, dada principalmente por forças de Van der Waals, sua durabilidade é menor do que a tintura permanente (4 a 7 semanas) (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Tabela 2- Fórmulas estruturais e moleculares de nitroanilinas utilizadas nas formulações de corantes semipermanentes e seus efeitos adversos:

Corantes- INCI	Características	Efeitos
HC Yellow No. 2	 CAS No. 4926-55-0 Fórmula: C₈H₁₀N₂O₃	• Nocivo por ingestão (Toxicidade oral aguda); • Provoca irritação cutânea (Corrosão/irritação cutânea); • Provoca irritação ocular grave (lesões oculares graves/irritação ocular); • Nocivo para os organismos aquáticos, com efeitos duradouros.
HC Red No. 3	 CAS No. 2871-01-4 Fórmula: C₈H₁₁N₃O₃	• Pode provocar uma reação alérgica cutânea; • Provoca irritação ocular grave; • Toxicidade para órgãos-alvo específicos, exposição única; • Irritação do trato respiratório; • Tóxico para os organismos aquáticos, com efeitos duradouros.
4-hidroxipropilamino-3-nitrofenol	 CAS No. 92952-81-3 Fórmula: C₉H₁₂N₂O₄	• Provoca irritação cutânea; • Tóxico para os organismos aquáticos, com efeitos duradouros.

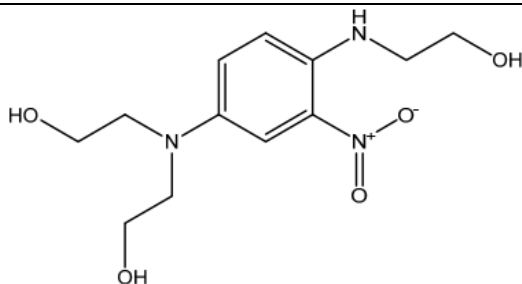
N, N'-bis- (2-
hidroxietil) -2-
nitrofenilenodiamin
a



CAS No. 84041-77-0
Fórmula: $C_{10}H_{15}N_3O_4$

- Nocivo em contacto com a pele;
- Provoca irritação cutânea (Corrosão/irritação cutânea);
- Provoca irritação ocular grave;
- Nocivo por inalação;
- Pode causar irritação do trato respiratório.

HC Blue No. 2

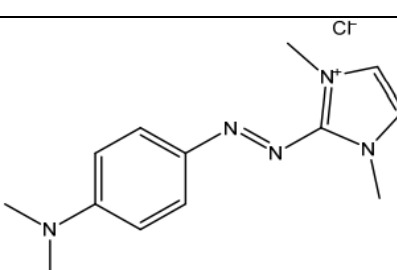
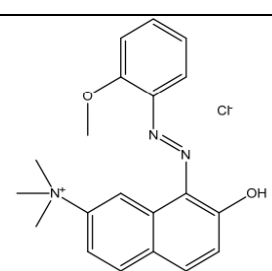


CAS No. 33229-34-4
Fórmula: $C_{12}H_{19}N_3O_5$

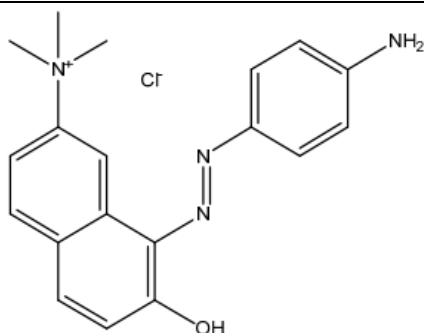
- Pode provocar reação alérgica cutânea;
- Provoca irritação ocular grave;
- Pode causar irritação respiratória;

INCI, Nomenclatura Internacional de Ingredientes Cosméticos; CAS, Chemical Abstract Service.
Fonte: Elaborado pelos autores com base em EPA (2023).

Tabela 3- Fórmulas estruturais e moleculares de compostos catiônicos utilizadas nas formulações de corantes semipermanentes e seus efeitos adversos:

Corantes- INCI	Características	Efeitos
Basic Red 51	 CAS No. 77061-58-6 Fórmula: $C_{13}H_{18}N_5 \cdot Cl$	• Nocivo por ingestão; • Provoca irritação cutânea; • Provoca irritação ocular grave; • Nocivo por inalação; • Pode causar irritação respiratória; • Muito tóxico para os organismos aquáticos, com efeitos duradouros.
Basic Red 76	 CAS No. 68391-30-0 Formula: $C_{20}H_{22}N_3O_2 \cdot Cl$	• Nenhuma evidência de sensibilização cutânea; • Nenhuma evidência de genotoxicidade; • Nenhuma evidência de teratogenicidade.

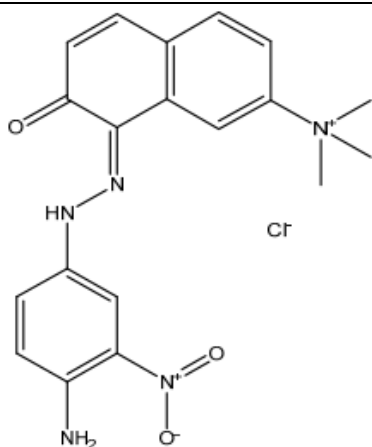
Basic
Brown 16



CAS No. 26381-41-9
Formula: C₁₉H₂₁N₄O·Cl

- Pode provocar uma reação alérgica cutânea;
- Provoca irritação ocular grave.

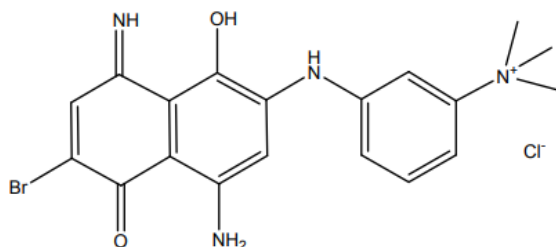
Basic
Brown 17



CAS No. 68391-32-2
Formula: C₁₉H₂₀N₅O₃·Cl

- Nenhuma evidência de sensibilização cutânea;
- Nenhuma evidência de genotoxicidade;
- Nenhuma evidência de teratogenicidade.

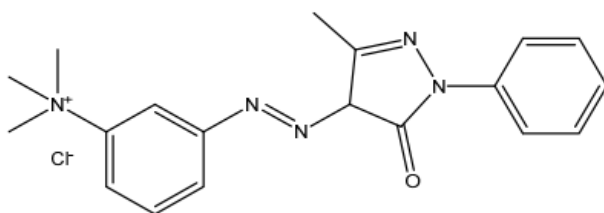
Basic Blue
99



CAS No. 68123-13-7
Formula: C₁₉H₂₀BrN₄O₂·Cl

- Provoca lesões oculares graves;
- Sensibilizador de Pele (Pode ocasionar dermatite e/ou urticária de contato).

Basic
Yellow 57

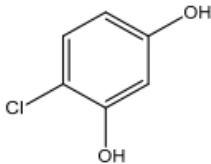
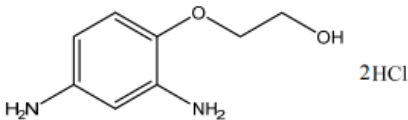


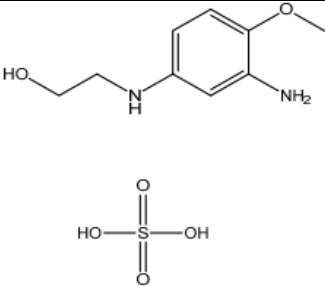
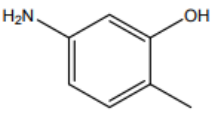
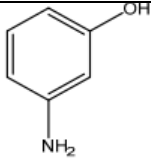
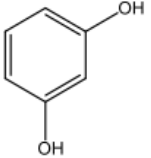
CAS No. 68391-31-1
Formula: C₁₉H₂₂N₅O·Cl

- Nenhuma evidência de genotoxicidade;
- Nenhuma evidência de teratogenicidade.

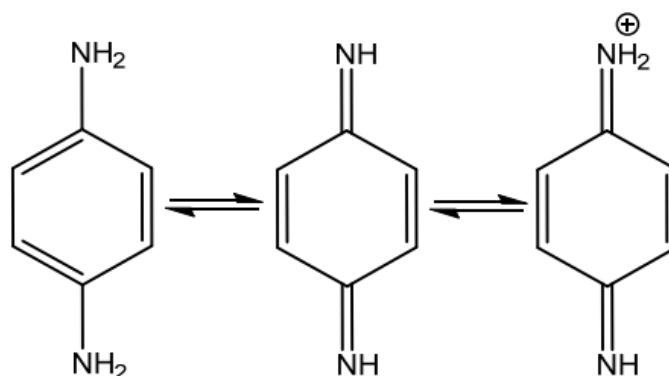
As tinturas permanentes geralmente são preparadas com dois componentes, que quando misturados conferem cor por reações na superfície e no interior da fibra capilar (OLIVEIRA *et al.*, 2014). O primeiro componente é um agente intermediário (*p*-diaminas ou *p*-aminofenóis) ou acopladores (*m*-diaminas ou *m*-aminofenóis), para as formulações fortemente alcalinas, compostos estes que entumecem a cutícula, permitindo a entrada das moléculas para o córtex (Figuras 2 e 3). O segundo componente é uma solução oxidante, como o peróxido de hidrogênio, que oxida o corante do primeiro corante, conferindo cor ao fio. Existem diferentes agentes acopladores disponíveis no mercado, alguns deles podem ser vistos na Tabela 4 (GUERRA-TAPIA; GONZALEZ-GUERRA, 2014). Dessa forma, a oxidação dessas substâncias e o acoplamento com outros modificadores permite a alteração da coloração final do produto cuja durabilidade é maior comparada com os outros tipos de corantes além de possuir ampla faixa de tonalidades.

Tabela 4- Fórmulas moleculares e estruturais de acopladores de reação e **seus efeitos adversos:**

Acopladores	Características	Efeitos
4-clororesorcinol	 CAS No. 95-88-5 Fórmula: C ₆ H ₅ ClO ₂	• Nocivo por ingestão; • Nocivo em contacto com a pele; • Provoca irritação cutânea; • Pode provocar reação alérgica cutânea; • Provoca lesões oculares graves; • Nocivo por inalação; • Pode causar irritação respiratória; • Tóxico para os organismos aquáticos, com efeitos duradouros.
2,4-diaminofenoxietanol HCl	 CAS No. 66422-95-5 Fórmula: C ₈ H ₁₂ N ₂ O ₂ ·2HCl	• Provoca irritação cutânea (dermatite de contato alérgica); • Provoca irritação ocular grave.

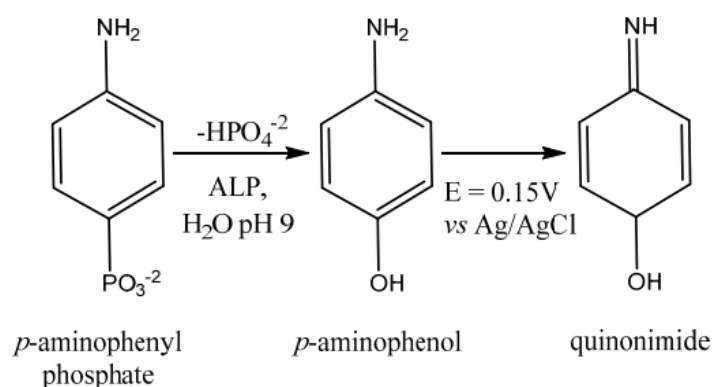
Sulfato de 2-amino-hidroxietilaminoanisol	 CAS No. 83763-48-8 Fórmula: $C_9H_{14}N_2O_2 \cdot H_2O_4S$	• Nocivo por ingestão; • Provoca irritação cutânea; • Pode provocar uma reação alérgica cutânea; • Provoca irritação ocular grave; • Pode provocar danos aos órgãos, após exposição prolongada ou repetida; • Muito tóxico para os organismos aquáticos.
4-amino-2-hidroxitolueno	 CAS No. 2835-95-2 Fórmula: C_7H_9NO	• Provoca irritação cutânea; • Pode provocar uma reação alérgica cutânea; • Provoca irritação ocular grave; • Pode causar irritação respiratória; • Muito tóxico para os organismos aquáticos.
m-aminofenol	 CAS No. 591-27-5 Fórmula: C_6H_7NO	• Nocivo por ingestão ou inalação; • Pode provocar uma reação alérgica cutânea; • Nocivo por inalação; • Muito tóxico para os organismos aquáticos.
Resorcinol	 CAS No. 108-46-3 Fórmula: $C_6H_6O_2$	• Nocivo por ingestão; • Pode provocar uma reação alérgica cutânea; • Provoca irritação ocular grave; • Provoca danos aos órgãos; • Muito tóxico para os organismos aquáticos.

INCI, Nomenclatura Internacional de Ingredientes Cosméticos; CAS, Chemical Abstract Service.
Fonte: Elaborado pelos autores com base em EPA (2023).

Figura 2- Fórmula estrutural de p-fenilenodiamina (PPD):

Nome INCI: fenilenodiamina.
 CAS No. 106-50-3.
 Fórmula: $C_6H_8N_2$.
 Classificação química: Amina aromática

INCI, Nomenclatura Internacional de Ingredientes Cosméticos; CAS, Chemical Abstract Service.
 Fonte: DA FRANÇA et al., 2015.

Figura 3- Fórmula estrutural do p-aminofenol (PAP):

Nome INCI: p-aminofenol.
 CAS No. 123-30-8.
 Fórmula: C_6H_7NO .
 Classificação química: substituir o fenol

INCI, Nomenclatura Internacional de Ingredientes Cosméticos; CAS, Chemical Abstract Service. Fonte: DA FRANÇA et al., 2015.

Devido à alta fixação dada pela afinidade do corante à queratina do cabelo, torna-se necessário a reaplicação do produto apenas quando ocorre o seu crescimento natural, que acontece, aproximadamente, uma vez ao mês (PRUNIÉRAS, 1994). Sendo assim, esse processo de coloração pode ser considerável de caráter irreversível, ou seja, a eliminação somente ocorre com o corte dos fios de cabelo (GUERRA-TAPIA; GONZALEZ-GUERRA,

2014). Entretanto, o uso contínuo de corantes permanentes pode afetar a haste do fio capilar, ocasionando a perda do brilho, da resistência e da maciez (PINHEIRO *et al.*, 2002).

2.2 Corante capilar como agente tóxico

A toxicidade de alguns corantes de cabelo e dos ingredientes que constituem as tinturas capilares comerciais tem sido amplamente investigada. Embora seja muito difundido o uso desse tipo de cosmético, as tinturas capilares apresentam riscos aos seus usuários e aos profissionais que os aplicam, devido às reações adversas que eles podem promover nos sistemas biológicos, que vão desde uma simples irritação/sensibilização até efeitos sistêmicos mais graves (BOUILLON, WILKINSO, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

As reações podem variar, em consequência de fatores individuais do consumidor, do uso inadequado do produto ou ainda da composição da tintura usada (CHIARI *et al.*, 2012). Estudos demonstram que os efeitos tóxicos das tinturas capilares podem estar associados à presença da para-fenilenodiamina (PPD), substância esta presente em mais de 1.000 formulações de colorações capilares comercializadas no mundo (STANLEY *et al.*, 2005; CARDONA, 2015). Esta substância, que já foi banida na Alemanha e França no período de 1906 a 1980, foi classificada pela Sociedade Americana de Alergia de contato, em 2006, como o “alérgeno de contato do ano”.

Outros componentes alvos de estudos científicos são os precursores, como o resorcinol. De acordo com Lynch *et al.* (2002), o resorcinol atua como um disruptor endócrino afetando a tiroide. Há uma preocupação também com a presença de corantes azo ($R-N=N-R'$), pois existem relatos da sua alta toxicidade (NOVOTNÝ *et al.*, 2006; GIORGETTI *et al.*, 2011), que pode ainda se intensificar, após o evento de detoxificação celular por biotransformação. Nestes processos, os azocorantes podem formar aminas aromáticas, mais tóxicas que os compostos originais (UMBUZEIRO *et al.*, 2005; CHUNG, 2016). alguns estudos ainda indicam que tanto os corantes azoicos, quanto as aminas aromáticas produzidas pela metabolização dos corantes, são potencialmente carcinogênicos (YAHAGI *et al.*, 1975).

Desde 1993, a International Agency for Research on Cancer (IARC) adverte os profissionais de cosmetologia sobre os cuidados que eles devem ter com as exposições às tinturas capilares. No entanto, esse alerta é negligenciado, e os salões de beleza continuam sendo vistos como locais de embelezamento e descontração, onde frequentemente os equipamentos de proteção individual são dispensados pelos profissionais (EPI's) (PIRES; LUCENA; DE OLIVEIRA MANTESSO, 2021). Embora haja um grande desenvolvimento

de produtos e técnicas nesta área, as informações sobre a toxicidade e mutagenicidade da maioria dos pigmentos capilares são escassas.

Dentre os poucos estudos toxicogenéticos realizados com produtos cosméticos, a maioria avalia componentes do produto usado no tingimento, como os pigmentos e alguns aditivos (SAMPATHKUMAR; YESUDAS, 2009), faltando informações sobre os compostos secundários formados durante o processo de coloração capilar (OLIVEIRA *et al.*, 2014; MACHADO, 2017). Também como escassos os estudos que abordam os impactos que efluentes líquidos gerados em salões de beleza possam promover ao ambiente e à saúde humana (GONÇALVES *et al.*, 2023). NKANSAH *et al.* (2020) justifica a pouca atenção à avaliação da qualidade das águas residuais de salões de beleza, como fonte de perigo ambiental e para a saúde pública, devido à falta de literatura sobre esse assunto específico.

2.3 Corante capilar como agente tóxico para humanos

Até a década de 1960, era de senso comum que os produtos de uso pessoal, como as tinturas capilares, pudessem causar apenas efeitos tópicos, pois acreditava-se que estes produtos permaneceriam somente na pele ou na área de aplicação. Entretanto, nas últimas décadas, alguns estudos têm demonstrado que os produtos aplicados topicamente podem ser absorvidos e, conseqüentemente, ocasionar efeitos sistêmicos aos organismos (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

De acordo com Oliveira *et al.* (2014), as tinturas capilares podem causar efeitos deletérios à saúde humana, tanto para o consumidor como para os profissionais que as aplicam. Geralmente, as pessoas expostas às tinturas desconhecem os efeitos que estas substâncias podem ocasionar/desencadear ao organismo. Diversos estudos têm sugerido uma preocupação com a incidência de câncer conseqüente do uso das tinturas capilares permanentes (LOWRY *et al.*, 1980; CERNIGLIA *et al.*, 1986; ANDREW *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2016). Por esta razão, alguns estudos epidemiológicos investigam a incidência de vários tipos de câncer em pessoas que fazem uso de tinturas capilares, assim como em profissionais expostos a esses químicos (NOHYNEK *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2016).

Diversos autores observaram alguns tipos de câncer, como efeitos adversos da utilização de tinturas capilares. Dentre eles, alguns distúrbios hematopoiéticos como Linfoma não Hodgkin (NHL), doença de Hodgkin, Mieloma múltiplo, Leucemia e Síndrome Mielodisplásica (SMD). Thun *et al.* (1994), sugeriram que as usuárias femininas de corantes permanentes escuros, principalmente pretos, após um período prolongado de uso, poderiam apresentar risco aumentados de desenvolvimento de linfoma não-Hodgkin fatal e Mieloma

múltiplo. Zhang *et al* (2004) também encontraram risco aumentado de linfoma não-Hodgkin entre mulheres que iniciaram o uso de produtos de coloração mais escuras, antes da década de 1980. Estudos de Miligi *et al.* (2005), realizados na Itália para investigar a possível associação entre o uso de corantes capilares com doenças, como linfoma não-Hodgkin (NHL), leucemia, mieloma múltiplo e doença de Hodgkin, encontraram essa correspondência entre leucemia e uso permanente de corante capilar preto, assim como NHL com o uso de corantes capilares permanentes. Um estudo prospectivo realizado por Qin *et al.* (2019), durante o ano de 2015, sugeriu que o uso de tinturas capilares aumenta o risco de NHL, especialmente em mulheres.

A associação da utilização das tinturas capilares com o desenvolvimento de leucemias também foi descrita por outros (RAUSCHER; SHORE; SANDLER, 2004), os quais realizaram um estudo de controle de casos de canceres, nos EUA e no Canadá durante os anos de 1986-1989. Estes autores sugerem que o uso prolongado de corante parece aumentar o risco de leucemia aguda em adultos. Outro estudo de caso desenvolvido por Couto *et al.* (2013), em hospitais de 13 estados do Brasil, entre 1999 e 2007, sugere que a exposição materna a corantes capilares e cosméticos alisadores de cabelo durante a gravidez pode estar envolvido na etiologia da leucemia, em crianças menores de 2 anos de idade. Um estudo realizado no Japão (NAGATA *et al.*, 1999) investigou se havia alguma relação entre a etiologia da leucemia, denominada de Síndrome Mielodisplásica (SDM) com o uso de tinturas capilares. Os autores observaram um aumento significativo no desenvolvimento desta síndrome, em mulheres que faziam o uso de colorações capilares. E uma relação dose resposta, entre a duração e frequência de uso com o aumento deste risco.

Outro tipo de câncer (adenocarcinoma mamário) foi estudado por Heikkinen *et al.* (2015). Os autores encontraram que o uso intenso de tinturas capilares poderia causar um impacto na saúde pública, devido ao aumento na incidência deste tipo de câncer. Stavaky *et al.* (1981) também já haviam relacionado o aparecimento de câncer de mama em mulheres acima dos 50 anos que faziam uso de tintura capilar, por um período superior a 10 anos. Llanos *et al.* (2017) também encontraram, em seus estudos realizados com mulheres afro-americanas e brancas dos Estados Unidos, uma associação entre uso produtos capilares (corantes capilares, relaxantes químicos e condicionadores) e a incidência de câncer de mama. Os autores alertam ainda que encontraram um aumento preocupante nos casos de câncer de mama relacionados a utilização dos produtos capilares estudados. De acordo com Ahmadi *et al.* (2022), o uso de tintura capilares pode aumentar o risco de câncer em mulheres, como as usuárias de tintura escuras tendo um risco 9% maior, em comparação com as não usuárias.

Generate *et al.* (2018) afirmam que o uso de tintura de cabelo está associado a um risco 18,8% maior de desenvolver câncer de mama, em comparação as não usuárias.

O câncer de bexiga é o tipo de carcinoma mais relatado na literatura mundial, como consequência do uso de tinturas capilares. No Canadá, Gaertner *et al.* (2004) realizaram um estudo de caso, cujos resultados indicaram risco estatisticamente significativo para câncer de bexiga em barbeiros expostos, ocupacionalmente, a metais pesados oriundos de tinturas capilares. Posteriormente, estudos realizados no Canadá e nos países nórdicos, por Hadkhale *et al.* (2017), também observaram riscos ocupacionais para desenvolver câncer de bexiga, indicando que os cabeleireiros destas regiões apresentam um alto risco de manifestar este tipo de câncer.

Na Suécia, Czene *et al.* (2003) desenvolveram um estudo avaliativo com 38.866 mulheres e 6.824 cabeleireiros masculinos suecos, os quais passaram por avaliações de todas as suas malignidades, ao longo de um período de 39 anos. Os autores observaram que o câncer de bexiga, para os cabeleireiros masculinos, avaliados na década de 60, foi o de maior relevância no estudo (razões de incidência padronizadas de 2,56). Contudo, nos estudos realizados por estes mesmos autores, em outros períodos, mostraram que essa incidência alta não se manteve. Estudos realizados por Skov *et al.* (1990), com cabeleireiros suecos, finlandeses e noruegueses, também indicaram riscos aumentados de câncer de bexiga entre os cabeleireiros masculinos destas descendências (SKOV *et al.*, 1990).

Nos Estados Unidos, vários autores estudaram a associação do câncer de bexiga com a utilização de tinturas capilares em diversas regiões do país. Gago-Dominguez *et al.* (2001) realizaram um estudo de caso controle em Los Angeles e Califórnia, o qual demonstrou risco aumentado para o uso prolongado de corantes capilares permanentes, demonstrando um fator de risco no desenvolvimento do câncer de bexiga. Em Nova Orleans, Vecchia, Tavani (1995) também relataram risco aumentado de câncer de bexiga, em relação ao número de vezes que os corantes capilares foram aplicados por ano entre mulheres brancas. No Havaí, Nomura; Kolonel; Yoshizawa, (1989) constataram este aumento do risco de câncer de bexiga em mulheres, após o uso de corantes pelo período aproximado de 1-5 anos. Andrew *et al.* (2004) realizaram um estudo experimental em New Hampshire, cujo resultado identificou a presença dos componentes de corantes capilares e até mesmo os seus derivados na urina de usuários, indicando que os compostos cancerígenos alcançam o órgão alvo (bexiga). Estes resultados corroboram com as pesquisas realizadas por Koutros *et al.*, (2011), em Maine, Vermont e New Hampshire, durante os anos de 2001 e 2004, onde os dados mostraram uma associação entre o uso permanente de corante capilar e o risco de câncer de bexiga em

mulheres. Desde 1993, a IARC indicou aumento de câncer de bexiga em cabeleireiros, associando um risco aumentado de 1,6 em homens e 1,1 em mulheres. Relatou, ainda, que os cabeleireiros podiam estar expostos a mais de 5.000 diferentes substâncias químicas, incluindo a exposição a solventes voláteis, formaldeídos, metacrilatos e nitrosaminas.

Na literatura, há relatos associando câncer de pele, tumores cerebrais e câncer de próstata com a utilização de tinturas capilares. Czene *et al.* (2003) realizaram, na Suécia, um estudo de acompanhamento de 38.866 mulheres e 6.824 cabeleireiros masculinos, onde os autores registraram todas as neoplasias dos envolvidos na pesquisa, durante um período de 39 anos. Os autores indicaram aumento no risco de câncer de pele *in situ* no couro cabeludo e no pescoço das mulheres que utilizavam tinturas capilares. Os tumores cerebrais foram estudados por Holly *et al.*, (2002) em um estudo epidemiológico, desenvolvido em três regiões da Califórnia e do Estado de Washington. Os resultados demonstraram aumento no risco de tumores cerebrais em crianças, associado ao uso materno de corantes capilares. Posteriormente, Hashemi, Rezaei e Naji (2018), confirmaram que o uso materno de tintura de cabelo, durante a gravidez, está associado a um risco aumentado de tumores cerebrais infantis e a neuroblastoma, sugerindo a necessidade de cautela do uso frequente ou prolongado de tintura durante a gravidez.

Já o câncer de próstata foi estudado por Tai *et al.* (2016). Os autores realizaram um estudo de caso-controle, em Taiwan, no período de agosto de 2000 a dezembro de 2008. Nesta pesquisa, foram estudados 296 casos de câncer de próstata, onde os autores associaram o uso de corantes capilares ao aumento do risco de desenvolvimento desse tipo de câncer. Em 2021 estudos realizados por Lim *et al.* (2021) corroboraram os dados de Tai *et al.* (2016), sobre o aumento do risco de câncer de próstata devido ao uso de tinturas de cabelo. Contudo, esses autores sugerem a necessidade de análises prospectivas, para confirmar essas afirmações.

Todos estes estudos citados acima estão descritos resumidamente na Tabela 5.

Entretanto, os dados que relacionam os efeitos carcinogênicos dos componentes das tinturas capilares ainda são discrepantes. Helzlsouer e colaboradores (2007), após revisão da literatura, concluíram que os dados não são consistentes para demonstrar o real risco do desenvolvimento de câncer, após a exposição aos corantes capilares. Platzek *et al.* (2007), sugerem que os resultados obtidos nos estudos que avaliam a genotoxicidade dos precursores das tinturas capilares são inconclusivos, indicando assim, uma necessidade inerente de novos estudos.

Tabela 5 - Resumo das principais patologias cancerígenas relacionadas à exposição humana a corantes capilares.

TIPO DE CÂNCER ESTUDADO	TIPO DE ESTUDO	REFERÊNCIA
HEMATOPOIÉTICO	Estudo prospectivos.	THUN <i>et al.</i> , 1994
	Estudo caso-controle.	NAGATA <i>et al.</i> , 1999
	Estudo de caso-controle	ZHANG <i>et al.</i> , 2004
	Estudo de controle de casos.	RAUSCHER; SHORE; SANDLER, 2004
	Estudo de caso-controle.	MILIGI <i>et al.</i> 2005
	Estudo de caso-controle.	COUTO <i>et al.</i> , 2013
	Estudo prospectivo.	QIN <i>et al.</i> , 2019
MAMA	Estudo caso-controle.	STAVRAKY <i>et al.</i> , 1981
	Estudo de meta-análise.	HEIKKINEN <i>et al.</i> , 2015
	Estudo caso-controle.	LLANOS <i>et al.</i> , 2017
	Estudo de meta-análise.	GENERATE 18,8% <i>et al.</i> , 2018
	Estudo de caso-controle, revisão sistemática e meta-análise	AHMADI <i>et al.</i> , 2022
BEXIGA	Estudo avaliativo.	IARC, 1993
	Estudo de caso-controle.	NOMURA; KOLONEL; YOSHIZAWA, 1989
	Estudo epidemiológicos.	SKOV <i>et al.</i> , 1990
	Estudo de caso-controle.	VECCHIA; TAVANI, 1995
	Estudo de caso-controle.	GAGO-DOMINGUEZ <i>et al.</i> , 2001
	Estudo avaliativo.	CZENE <i>et al.</i> , 2003
	Estudos experimental.	ANDREW <i>et al.</i> , 2004
	Estudo de caso.	GAERTNER <i>et al.</i> , 2004
	Estudo de caso-controle.	KOUTROS <i>et al.</i> , 2011
	Estudo comparativo.	HADKHALE <i>et al.</i> , 2017
PELE	Estudo de acompanhamento.	CZENE <i>et al.</i> , 2003
TUMOR CEREBRAL	Estudo epidemiológico	HOLLY <i>et al.</i> , 2002
	Estudo de revisão de literatura	HASHEMI; REZAEI; NAJI, 2018

Tabela 5 - Resumo das principais patologias cancerígenas relacionadas à exposição humana a corantes capilares (continuação).

TIPO DE CÂNCER ESTUDADO	TIPO DE ESTUDO	REFERÊNCIA
PROSTÁTA	Estudo de caso-controle.	TAI <i>et al.</i> , 2016
	Estudo observacional.	LIM <i>et al.</i> 2021

Fonte: Elaborada pelos autores.

2.4 Corantes capilares como contaminantes ambientais

Geralmente, o processo de coloração capilar inicia-se com a aplicação da tintura sobre os cabelos, por aproximadamente 30 minutos. Em seguida, o cabelo é lavado com água corrente, para a remoção dos resíduos que não penetraram na haste capilar. Ao final deste processo, pequenas quantidades de tinta se fixam na haste capilar, enquanto que a parte majoritária dos componentes oriundos do processo de coloração são descartados no meio ambiente, como água residual de salão (MEULING *et al.*, 2003; MAITI; SINHA; SINGH, 2017).

Dentre os componentes das tinturas capilares, os corantes orgânicos sintéticos são os ingredientes essenciais (IARC, 1993). Os corantes mais produzidos mundialmente são vermelho ácido 33, violeta ácido 43, amarelo ácido 1, laranja básico 31, azul básico 99, marrom básico 16, marrom básico 17, vermelho básico 76, amarelo básico 57, amarelo básico 87 e vermelho disperso 17 (IARC, 2010).

Alguns corantes orgânicos sintéticos, usados em tinturas capilares, apresentam biodegradação lenta ou são até mesmo não biodegradáveis. Isto torna as águas residuais de salões de beleza ainda mais difícil de serem limpas por métodos convencionais utilizados pelas estações de tratamento de esgoto (ETEs) (ALI, 2010; ZAHARIA; SUTEU, 2012). Assim, devido ao aumento contínuo do uso das tinturas capilares, fica cada vez mais difícil e preocupante a remoção desses compostos do ambiente. O acúmulo desses resíduos no ambiente, podem modificar as condições hídricas e alterar a vida dos organismos aquáticos, interferir na fertilidade do solo e, conseqüentemente, a manutenção dos ecossistemas, bem como, prejudicar a saúde humana. Essa preocupação se fundamenta na falta de normas referentes ao descarte de resíduos proveniente dos salões de beleza, e isso faz com que estes resíduos acabam sendo destinados diretamente no sistema de coleta de esgoto sanitário, sem passarem por qualquer tipo de tratamento prévio (STRADA, 2018). Também deve ser levado em consideração os impactos decorrentes de resíduos gerados na produção industrial dos cosméticos (FLOR; MAZIN; FERREIRA, 2019).

A utilização de água pelas indústrias de cosméticos se dá por diversas formas. Inicialmente, pode-se citar a incorporação de água ao próprio produto, mas a água também é usada em outros processos da produção dos cosméticos, como nas lavagens de equipamentos, tubulações e pisos, no sistema de resfriamento e em geradores de vapor. Conseqüentemente, após a sua utilização, a água torna-se contaminada por resíduos decorrentes de cada um desses processos industriais, originando efluentes líquidos complexos, que contém, entre outros químicos, resíduos de ingredientes dos cosméticos que podem apresentar propriedades tóxicas, irritantes e/ou corrosivas (CETESB; ABIHPEC, 2005). Entretanto, a geração de efluentes

líquidos nas indústrias de cosméticos varia de acordo com a maneira e a frequência em que ocorrem as operações de lavagem de equipamentos e em função do tipo de produto elaborado. De modo geral, os efluentes apresentam elevada DQO, altas concentrações de compostos orgânicos, coloração intensa, grande quantidade de sólidos suspensos, pH altamente variável e quantidades consideráveis de metais pesados e compostos orgânicos clorados (CETESB; ABIHPEC, 2005).

Dados encontrados na literatura mostram a ocorrência de corantes orgânicos sintéticos em água superficiais (MAGUIRE, 1992; ZHANG *et al.*, 2012), em sedimentos (DE OLIVEIRA *et al.*, 2006; RICKING *et al.*, 2013) e em peixes nativos (BELPAIRE *et al.*, 2012; SCHUETZE *et al.*, 2008). Estas publicações confirmam que os corantes orgânicos sintéticos representam um problema ambiental para os ecossistemas aquáticos. Porém, o impacto destes corantes nos ambientes aquáticos ainda não foi avaliado completamente, o que alerta para a necessidade da realização mais incisiva de monitoramento ambiental para esse tipo de contaminante (PEREIRA; ALVES, 2012).

O monitoramento ambiental de corantes capilares, presentes em efluentes de salão de cabeleireiro, em águas superficiais (rios e lagos) e em água potável poderá contribuir com informações para um melhor conhecimento do grau de periculosidade desses compostos e, conseqüentemente, para o controle na liberação dos corantes comercializados. Além disso, este monitoramento também pode oferecer subsídios para a legislação vigente e órgãos gestores do meio ambiente, no estabelecimento de exigências de aplicação de técnicas mais eficientes, tanto para o monitoramento da qualidade dos recursos hídricos quanto para o tratamento dos efluentes contaminados com tinturas capilares (ZANONI *et al.*, 2015; BESSEGATO *et al.*, 2018; DE SOUZA *et al.*, 2020).

Nos últimos anos, os trabalhos publicados mostram a presença e contaminação por traços de corantes em diferentes ecossistemas aquáticos (MAGUIRE, 1992; DE OLIVEIRA *et al.*, 2006; VACCHI *et al.*, 2016; DE SOUZA *et al.*, 2019; DE SOUZA *et al.*, 2020). Entretanto, há uma necessidade eminente de maiores estudos nesta área, para que se possa elucidar a persistência, potencial de biotransformação, destino e efeitos biológicos destes compostos no meio ambiente. Em relação ao impacto sobre os organismos, o mesmo pode ser avaliado por meio de estudos ecotoxicológicos (TOLLS *et al.*, 2009).

3. CONCLUSÃO

O presente artigo traz informações que permitem o conhecimento do potencial tóxico das tinturas capilares e o impacto destes compostos para a saúde humana e para o meio ambiente. Entretanto, os estudos sobre a toxicidade dos efluentes de tinturas capilares ainda são escassos e contraditórios, principalmente quanto aos efeitos de seus metabólitos.

Sendo assim, as informações apresentadas também são relevantes para o desenvolvimento de estudos que possam auxiliar nas tomadas de decisões dos órgãos públicos gestores, quanto a necessidade de implementação de tratamento específicos de efluentes de salões de beleza, principalmente os relacionados com as atividades de tingimento capilar. Esse estudo fornece ainda dados sobre as características químicas e, principalmente toxicológicas das tinturas capilares, que possibilitam a melhor compreensão dos perigos inerentes à presença destes compostos no ambiente. Além disso, os dados e discussões deste estudo poderão servir como subsídio para elaboração de normas que assegurem a qualidade ambiental, com vistas a minimizar os impactos negativos dos ecossistemas e otimizar o desenvolvimento socioeconômico de forma sustentável.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIHPEC - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE HIGIENE PESSOAL, PERFUMARIA E COSMÉTICOS. **Panorama do Setor de HPPC** 2015. v.11-08-15. Disponível em: <http://www.abihpec.org.br/publicacoes/>. Acesso em 25 nov. 2021.

ABIHPEC. Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos. **Vendas de HPPC crescem 4,7% em 2020 e totalizam R\$ 122,4 bilhões**. 2021. Disponível em: <https://abihpec.org.br/vendas-de-hppc-crescem-47-em-2020-e-totalizam-r-1224-bilhoes/>. Acesso em 25 nov. 2021.

AHMADI, M.; SAEEDI, M.; HEDAYATIZADEH-ORMAN, A.; ESLAMI, M.; JANBABAI, G.; ALIZADEH-NAVAEI, R. Association between hair dye use and cancer in women: a systematic review and meta-analysis of case-control studies. **African Health Sciences**, n.22, p.323 – 333, 2022. <https://doi.org/10.4314/ahs.v22i2.36>

ALI, H. Biodegradation of synthetic dyes—a review. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 213, n. 1, p. 251-273, 2010.

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

ARALDI, J.; GUTERRES, S. S. Tinturas capilares: existe risco de câncer relacionado à utilização desses produtos? **Infarma, Brasília**, v. 17, n. 7/9, p. 78-83, 2005.

BAUTISTA, P.; MOHEDANO, A. F.; GILARRANZ, M.A.; CASAS, J.A.; RODRIGUEZ, J.J. Application of Fenton oxidation to cosmetic wastewaters treatment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 143, p. 128–134, 2007.

BELPAIRE, C.; REYNS, T.; GEERAERTS, C.; LOCO, J. V. Toxic textile dyes accumulate in wild European eel *Anguilla anguilla*. **Chemosphere**, v. 138, p. 784-791, 2015.

BESSEGATO, G. G.; SOUZA, J. C.; CARDOSO, J. C.; ZANONI, M. V. B. Assessment of several advanced oxidation processes applied in the treatment of environmental concern constituents from a real hair dye wastewater. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 6, n. 2, p. 2794-2802, 2018.

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.

BOUILLON, C.; WILKINSON, J. **The Science of Hair Care**, 2nd ed., Francis & Taylor: London, 2005.

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

CETESB, ABIHPEC. **Guia Técnico Ambiental da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos: Por uma Produção mais limpa**. São Paulo, 2005. Disponível em: <https://www.crq4.org.br/downloads/higiene.pdf>. Acesso em 25 nov. 2021.

CHIARI, B. G.; MAGNAMI, C.; SALGADO, H. R. N.; CORRÊA, M. A.; ISAAC, V. L. B. Estudo da segurança de cosméticos: presente e futuro. **Revista Ciências Farmaceuticas Básicas Aplicadas**, v.33; n.3, 2012. ISSN 1808-4532.

CHISVERT, A.; CHÁFER, A.; SALVADOR, A. Hair dyes in cosmetics. Regulatory aspects and analytical methods. **Analysis of Cosmetic Products**, p. 190-209, 2007.

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

CHUA, S. L.; LEVELL, N. The art of hair coloring- a history. **Journal of Society of Cosmetic Chemists**, v.52, n.3, supl. 1, p.35, 2005.

CONAMA, Brasília et al. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução CONAMA**, n. 06, 1986.

COUTO, A. C., FERREIRA, J. D., ROSA, A. C., POMBO-DE-OLIVEIRA, M. S., KOIFMAN, S., BRAZILIAN COLLABORATIVE STUDY GROUP OF INFANT ACUTE LEUKEMIA. Pregnancy, maternal exposure to hair dyes and hair straightening cosmetics, and early age leukemia. **Chemico-biological interactions**, v. 205, n. 1, p. 46-52, 2013.

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

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

DE OLIVEIRA, D. P.; KUHLMANN, M. L.; DE ARAGÃO UMBUZEIRO, G.. Evaluation of the presence of mutagenic dyes in sediments from Cristais River. **Soil & Sediment Contamination**, v. 15, n. 5, p. 455-462, 2006.

DE SOUZA, J. C.; SILVA, B.F.; MORALES, D. A.; UMBUZEIRO, G. A.; ZANONI, M. V. B. Assessment of p-aminophenol oxidation by simulating the process of hair dyeing and occurrence in hair salon wastewater and drinking water from treatment plant. **Journal of hazardous materials**, v. 387, p. 122000, 2020.

DE SOUZA, J.C.; ZANONI, M. V. B.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Genotoxic permanent hair dye precursors p-aminophenol and p-toluenediamine electrochemical oxidation mechanisms and evaluation in biological fluids. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 857, p. 113509, 2020.

DE SOUZA, J.C.; SILVA, BF; MORALES, DA; UMBUZEIRO, GA; ZANONI, MVB. Assessment of the autoxidation mechanism of p-toluenediamine by air and hydrogen peroxide and determination of mutagenic environmental contaminant in beauty salon effluent. **Science of the total environment**, v. 685, p. 911-922, 2019.

DRAELOS, Z. D. **Hair care: an illustrated dermatologic**. London: Taylor & Francis, 279 p., 2005.

EL-GOHARY F.; TAWFIK, A.; MAHMOUD, U. Comparative study between chemical Coagulation/Precipitation (C/P) versus Coagulation/Dissolved Air Flotation (C/DAF) for pre-treatment of Personal Care Products (PCP) wastewater. **Desalination**, v. 252, p. 106–112, 2010.

EPA- United States Environmental Protection Agency. **Comptox Chemicals**. | **DTXSID1021455- 2023**. Disponível em: <https://comptox.epa.gov>. Acesso em: 16 jan. de 2024.

FLOR, J.; MAZIN, M. R.; FERREIRA, L. A. Cosméticos naturais, orgânicos e veganos. **Cosmetics & Toiletries (São Paulo-Brasil)**. Disponível em: www.cosmeticsonline.com.br, v. 31, 2019.

GAERTNER, R. R. W.; TRPESKI, L.; JOHNSON, K. C. A case-control study of occupational risk factors for bladder cancer in Canada. **Cancer Causes & Control: CCC**, v. 15, n. 10, p. 1007–1019, 2004.

GAGO-DOMINGUEZ M, CHAN KK, ROSS RK, YU MC. Permanent hair dyes and bladder cancer risk. **International Journal of Cancer**, v.94, n.6, p.905-906, 2001.

GENERATE, R.; MOKBEL, R.; IGOR, I.; MOKBEL, K. Does using hair dye increase the risk of developing breast cancer? A meta-analysis and review of the literature. **Anticancer Research**, n. 38, p. 707-716, 2018. <https://doi.org/10.21873/ANTICANRES.12276>.

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

GOMES, A.L. **O uso da tecnologia cosmética no trabalho do profissional cabelereiro**, 6. Ed. Editora Senac São Paulo, 2019.

GONÇALVES, L. C.; ROBERTO, M. M.; PEIXOTO, P. V. L.; VIRIATO, C.; SILVA, A. F. C.; OLIVEIRA, J. A. V.; NARDI, M. C.; PEREIRA, L. C.; ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. Toxicity of Beauty Salon Effluents Contaminated with Hair Dye on Aquatic Organisms. **Toxics**, v. 11, n. 11, p. 911, 2023.<https://doi.org/10.3390/toxics11110911>.

GUERRA-TAPIA A, GONZALEZ-GUERRA E. Hair Cosmetics: Dyes. **Actas DermoSifiliográficas**, v. 105, p. 833-9, 2014.

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

HARRISON, S.; SINCLAIR, R. Hair colouring, permanent styling and hair structure. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 2, p 180-185, 2003.

HASHEMI, M.; REZAEI, A.; NAJI, T. P128: Relationship between childhood brain tumors and hair dye use during pregnancy. **The Journal of Neuroscience by Shefaye Khatam**, n.6, p.159-159, 2018.

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

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

HEMIELEWSKI, C.; DA SILVEIRA, R. L. Compostos nocivos ao organismo presentes em tonalizantes capilares. **Disciplinarum Scientia| Saúde**, v. 8, n. 1, p. 41-49, 2016.

HOLLY, E.A.; BRACCI, P.M.; HONG, M.; MUELLER, B.A.; PRES- TON-MARTIN, S. West coast study of childhood brain tumors and maternal use of hair-colouring products. **Paediatr. Perinat. Epidemiol.** v.16, p.226-235, 2002.

HUEBER-BECKER, F.; NOHYNEK, G. J.; MEULING, W. J. A.; BENECH-KIEFFER, F.; TOUTAIN, H. Occupational exposure of hairdressers to [14C]-para-phenylenediamine-containing oxidative hair dyes: a mass balance study. **Food and chemical toxicology**, v. 45, n. 1, p. 160-169, 2007.

IARC- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **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.

IARC- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Working group on the evaluation of carcinogenic risks to humans occupational exposures of hairdressers and barbers and personal use of hair colourants; some hair dyes, cosmetic colourants, industrial dyestuffs and aromatic amines. Proceedings. **IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum** 57, 7–398, 1993.

IARC- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Occupational Exposures of Hairdressers and Barbers and Personal Use of Hair Colourants; Some Hair Dyes, Cosmetic Colourants, Industrial Dyestuffs and Aromatic Amines**. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Lyon; 1993.

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

KIMURA, K. et al. Occurrence of preservatives and antimicrobials in Japanese rivers. **Chemosphere**, v. 107, p. 393–399, 2014.

KOUTROS, S., SILVERMAN, D. T., BARIS, D., ZAHM, S. H., MORTON, L. M., COLT, J. S., CHERALA, Hair dye use and risk of bladder cancer in the New England bladder cancer study. **International journal of cancer**, v. 129, n. 12, p. 2894-2904, 2011.

LADISLAU, T. do P.; LIMA, R. L. **Otimização do processo de fabricação de tintura para cabelo**. Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento. Ano 05, Ed. 04, Vol. 02, pp. 77-100. Abril de 2020. Disponível em: <https://www.nucleodoconhecimento.com.br/engenharia-quimica/fabricacao-de-tintura-para-cabelo>. Acesso em 24 nov. 2020.

LEINO, T.; TAMMILEHTO, L.; HYTÖNEN, M.; SALA, E.; PAAKKULAINEN, H.; KANERVA, L. Occupational skin and respiratory diseases among hairdressers. **Scandinavian journal of work, environment & health**, p. 398-406, 1998.

LIM, J.; HUANG, J.; MENNIST, S.; WEINSTEIN, S.; ALBANES, D. Hair dye use and prostate cancer risk: a prospective analysis in the Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study cohort. **Cancer**, p.128, 2021. <https://doi.org/10.1002/cncr.34035>.

LLANOS, A. A., RABKIN, A., BANDERA, E. V., ZIRPOLI, G., GONZALEZ, B. D., XING, C. Y., AMBROSONE, C. B. Hair product use and breast cancer risk among African American and White women. **Carcinogenesis**, v. 38, n. 9, p. 883-892, 2017.

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

LYNCH, B. S.; DELZELL, E. S.; BECHTEL, D.H. Toxicology review and risk assessment of resorcinol: thyroid effects. **Regulatory toxicology and pharmacology**, v. 36, n. 2, p. 198-210, 2002.

MACHADO, E. S.; DE CARVALHO MORAES, L. M., MARQUES, M. B., MARQUES, R. B., & SILVA, L. D. Aspectos toxicológicos relacionados ao uso de cosméticos na conservação, alisamento e tingimento capilar: uma revisão de literatura. **Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 10, n. 1, 2017.

MAGUIRE, R. J. Occurrence and persistence of dyes in a Canadian river. **Water Science and Technology**, v. 25, n. 11, p. 270-270, 1992.

MAITI S., SINHA S. S., SINGH M. Microbial decoloration and detoxification of emerging environmental pollutant: Cosmetic hair dyes. **Journal of Hazardous Materials**, v 338, p. 356-363, 2017.

MEULING, W.; HUEBER-BECKER, F.; ROZA, L.; BENECH-KIEFFER, F.; LECLAIRE, J.; NOHYNEK, G. J. Absorção percutânea de parafenilenodiamina (PPD) após a aplicação de uma tintura de cabelo contendo [14C] -PPD em voluntários humanos. **Toxicology Letters**, Suplemento 1, p. 160144, 2003.

MILIGI, L., COSTANTINI, A. S., BENVENUTI, A., VERALDI, A., TUMINO, R., RAMAZZOTTI, V., STAGNARO, E. Personal use of hair dyes and hematolymphopoietic malignancies. **Archives of environmental & occupational health**, v. 60, n. 5, p. 249-256, 2005.

NAGATA, C.; SHIMIZU H.; HIRASHIMA, K.; KAKISHITA E.; FUJIMURA K.; NIHO Y.; KARASAWA M.; OGUMA S.; YOSHIDA Y.; MIZOGUCHI, H. Hair dye use and occupational exposure to organic solvents as risk factors for myelodysplastic syndrome. **Leukemia Research**, v. 23, p. 57–62, 1999.

NKANSAH, M. A. et al. Characterization of Beauty Salon Wastewater from Kwame Nkrumah University of Science and Technology, Kumasi, Ghana, and Its Surrounding Communities. **Environmental Health Insights**, v. 10, n. 1, 2020.

NOHYNEK, G; J. et al. Toxicity and human health risk of hair dyes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, n. 4, p. 517-543, 2004.

NOMURA, A.; KOLONEL, L; N.; YOSHIZAWA, C. N. Smoking, alcohol, occupation, and hair dye use in cancer of the lower urinary tract. **American journal of epidemiology**, v. 130, n. 6, p. 1159-1163, 1989.

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

OLIVEIRA, R. AG et al. A química e toxicidade dos corantes de cabelo. **Química Nova**, v. 37, p. 1037-1046, 2014.

PERDIGÓN-MELÓN, J. A.; CARBAJO, J. B.; PETRE, A. L.; ROSAL, R.; GÁRCIACALVO, E. Coagulation–Fenton coupled treatment for ecotoxicity reduction in highly polluted industrial wastewater. *Journal of Hazardous Materials*, v. 181, p. 127– 132, 2010.

PEREIRA, L.; ALVES, M. Environmental protection strategies for sustainable development. **Strategies for Sustainability, Dordrecht Heidelberg London New York**, 2012.

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: im novo modelo de proteção. **Cosmetics & Toiletries (Edição em Português)**, v.14, n. 3, p. 68-77, 2002.

PIRES, R. C. C.; LUCENA, A. D.; DE OLIVEIRA MANTESSO, J. B. Prática da biossegurança na estética: uma revisão integrativa da literatura. **Revista Recien-Revista Científica de Enfermagem**, v. 11, n. 36, p. 619-628, 2021.

PLATZECK, T. Current safety concerns about oxidative hair dyes. **Toxicology Letters**, v. 172, supplement. P.32, 2007.

PRUNIÉRAS, M..**Manual de Cosmetologia Dermatológica**. 2. ed. São Paulo:Andrei, 1994.

QIN, L., DENG, H. Y., CHEN, S. J., & WEI, W. A Meta-Analysis on the Relationship Between Hair Dye and the Incidence of Non-Hodgkin's Lymphoma. **Medical Principles and Practice**, v. 28, n. 3, p. 222-230, 2019.

QUIROGA, M. I.; GUILLOT, C. F. Cosmetica dermatologica practica In: **Cosméticos capilares: decolorantes y colorantes** 5. ed.; Buenos Aires: El Ateneo, 1986, p. 267-274.

RAUSCHER, G. H.; SHORE, D.; SANDLER, D. P. Hair dye use and risk of adult acute leukemia. **American journal of epidemiology**, v. 160, n. 1, p. 19-25, 2004.

RICKING, M.; SCHWARZBAUER, J.; PETRA, A. Malachite green in suspended particulate matter and surface sediments in Germany. **Report. Federal Environment Agency**, Berlin, Germany. 2014.

SAMPATHKUMAR, K.; YESUDAS, S. Hair dye poisoning and the developing world. **Journal of emergencies, trauma and shock**, v. 2, n. 2, p. 129, 2009.

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

SCHUETZE, A.; HEBERER, T.; JUERGENSEN, S. Occurrence of residues of the veterinary drug crystal (gentian) violet in wild eels caught downstream from municipal sewage treatment plants. **Environmental Chemistry**, v. 5, n. 3, p. 194-199, 2008.

SEMWAL, R. B. *et al.* *Lawsonia inermis L.(henna)*: Ethnobotanical, phytochemical and pharmacological aspects. **Journal of ethnopharmacology**, v. 155, n. 1, p. 80-103, 2014.

SKOV, T.; ANDERSEN, U; MALKER, H.; PUKKALA, E; WEINER, J.; LYNGE E . Risk for cancer of the urinary bladder among hairdressers in the Nordic countries. **American Journal of Industrial Medicine**, v. 17, n. 2, p. 217–223, 1990.

STANLEY, L. A.; SKARE, J.A.; DOYLE, E.; POWRIE, R.; D'ANGELO, D.; ALCOMBE, C.R. Lack of evidence for metabolism of p-phenylenediamine by human hepatic cytochrome P450 enzymes. **Toxicology**, v. 210, n. 2-3, p. 147–157, 2005.

STAVRAKY, K. M.; CLARKE, E. A.; DONNER, A. A case-control study of hair-dye use and cancers of various sites. **British Journal of Cancer**, v. 43, n. 2, p. 236–239, 1981.

STRADA, D. C. **Proposta de licenciamento ambiental para salões de beleza no** TAI, S. Y., HSIEH, H. M., HUANG, S. P., WU, M. T. Hair dye use, regular exercise, and the risk and prognosis of prostate cancer: multicenter case–control and case-only studies. **BMC cancer**, v. 16, n. 1, p. 242, 2016.

TEHNAVIO. **Global Hair Care Market 2015-2019**. 2015. Disponível em: <http://www.technavio.com/report/global-cosmetics-and-toiletry-hair-care-market>. Acesso em 24 nov. 2021.

THUN, M. J. et al. Hair dye use and risk of fatal cancers in US women. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 86, n. 3, p. 210-215, 1994.

TOOLS, J.; BERGER, H.; KLENK, A.; MEYBERG, M.; MULLER, R.; RETTINGER, K.; STEBER, J. Environmental safety aspects of personal care products- A European Perspective. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.28, n.12, p. 2485-2489, 2009.

TOETORA G.J., FUNKE B.R. **Environmental Microbiology': An Introduction**. 6th ed. California, CA: Benjamin Cummings Company; 1997.

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

USGS - United State Geological Survey. **Contaminants Found in Groundwater. Department of the Interior**, 2016. Disponível em: <http://water.usgs.gov/edu/groundwater-contaminants.html>. Acesso em 19 de jul. 2016.

VACCHI, F.I.; VENDEMIATTI, J.A.S.; SILVA, B.F.; ZANONI, M.V.B.; UMBUZEIRO, G.A. Combining different assays and chemical analysis to characterize the genotoxicity of waters impacted by textile discharges. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 57, n. 7, p. 559-571, 2016.

VECCHIA, L.A. C.; TAVANI, A. Epidemiological evidence on hair dyes and the risk of cancer in humans. **European journal of cancer prevention: the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)**, v. 4, n. 1, p. 31-43, 1995.

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

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

ZAHARIA, C.; SUTEU, D. **Textile organic dyes characteristics polluting effects and separation/elimination procedures from industrial effluents. A Critical overview.** In: Puzyn T, Mostrag-Szlichtyng A (Editors) Organic pollutants—ten years after the Stockholm convention. Environmental and analytical update. 2012.

ZANONI, T.B.; HUDARI, F.F.; MUNNIA, A.; PELUSO, M.; GODSCHALK, R.W.; ZANONI, M.V.B.; DEN, G.J.M.; HARRTOG, A.; BAST, S. B. M.; BARROS, S. S.; HAGEMAN, G. J.; OLIVEIRA, D. P. The oxidation of p-phenylenediamine, an ingredient used for permanent hair dyeing purposes, leads to the formation of hydroxyl radicals: Oxidative stress and DNA damage in human immortalized keratinocytes. **Toxicology letters**, v. 239, n. 3, p. 194-204, 2015.

ZANONI, M. V. B.; YAMANAKA, H. **Corantes: Caracterização química, toxicológica, métodos de detecção e tratamento.** 1. ed. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2016

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

ZHANG, Z.; ZHOU, K.; BU, Y.; SHAN, Z.; LIU, J. F.; WU, X.; YANG, L.; CHEN, Z. Determination of malachite green and crystal violet in environmental water using temperature-controlled ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction coupled with high performance liquid chromatography. **Analytical Methods**, v. 4, n. 2, p. 429-433, 2012.

ARTIGO 2. INFLUÊNCIA DA FILTRAÇÃO EM MEMBRANAS DE PVDF NA REDUÇÃO DA TOXICIDADE DE EFLUENTES DE SALÕES DE BELEZA

Letícia Cristina Gonçalves^{1,2}, Matheus Mantuanelli Roberto², Maria Aparecida Marin-Morales¹

¹Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Av. 24-A, 1515, 13.506-900, Rio Claro, SP, Brasil.

²Centro Universitário da Fundação Hermínio Ometto (FHO), Av. Dr. Maximiliano Baruto, 500, 13.607-339, Araras, SP, Brasil.

Resumo

Os efluentes gerados pela prática de tingimento capilar caracterizam um problema ecotoxicológico sério, tanto pela sua alta produção como pela sua toxicidade. Os grandes emissores deste tipo de efluentes são os salões de beleza. A proposta do presente estudo foi avaliar, por meio dos bioindicadores *Lactuca sativa* e *Allium cepa*, a fitotoxicidade e citogenotoxicidade de dois tipos de efluentes gerados em salões de beleza: os derivados de lavagens capilares, pós tintura, realizadas somente com água, para avaliar a toxicidade da tintura; e os derivados de lavagem com água, xampus e condicionadores, para avaliar e comparar a toxicidade dessa mistura complexa com a da tintura. A avaliação foi feita com efluentes brutos “*in natura*” e passados por sistema de filtração, o que totalizou 4 tratamentos distintos [1- EC-F: efluente completo (tintura, xampu e condicionador), filtrado em filtro de fluoreto de polivinilideno (PVDF poro 0,45); 2- EC-NF: efluente completo, sem filtração; 3- ET-F: efluente da tintura capilar, filtrado em filtro PVDF, igual ao usado em EC-F; 4- ET-NF: efluente da tintura capilar, sem filtração]. Para o teste com *L. sativa*, todos os tratamentos foram realizados com amostras pura (100% efluente) e diluídas (50,0%; 25,0%; 12,5%; 6,25%; 3,125%). Para *A. cepa*, foram avaliadas apenas as diluições 50,0%; 12,5% e 3,125%. Para *L. sativa*, foram observadas diminuições significativas das taxas de crescimento e de germinação em todos os tratamentos realizados. Os valores de IC₅₀ demonstraram maior fitotoxicidade para os tratamentos EC-NF e EC-F, (63,14% e 65,05%, respectivamente), quando comparados com os valores de IC₅₀ para ET-NF e ET-F (73,59% e 90,28%, respectivamente). Para *A. cepa* foram constatados efeitos genotóxicos, por aneugenicidade, para todas as amostras avaliadas, mesmo após o processo de filtração em filtro de PVDF. Por esses resultados, é possível inferir que efluentes de salões de beleza contaminados com tinturas capilares, xampus e condicionadores (EC) foram mais tóxicos que os efluentes portadores de resíduos somente de tinturas (ET), sendo, portanto, prejudiciais para o ambiente. Também foi possível observar que a toxicidade do efluente pode ser minimizada, após a filtragem com filtro de PVDF (poro de 0,45 µm).

Palavras-chaves: *Lactuca sativa*; *Allium cepa*; contaminantes emergentes; fitotoxicidade, aberrações cromossômicas; produtos tensoativos.

1. INTRODUÇÃO

As tinturas capilares, desde os primórdios da civilização, são utilizadas mundialmente para alterar ou recompor a cor dos cabelos (OLIVEIRA *et al.*, 2014; REHMAN *et al.*, 2019). Atualmente, existem inúmeras técnicas e diversos produtos, naturais e sintéticos, utilizados para este fim (PAVITHRA *et al.*, 2019; SARGSYAN; VILL; HIPPE, 2020).

Dentre os diversos tipos, as tinturas permanentes são as mais utilizadas devido, principalmente, à sua grande variedade e durabilidade da cor e à sua facilidade de aplicação (ZHANG *et al.*, 2020). Estes produtos são constituídos basicamente por 3 componentes: um agente precursor (aminas aromáticas orto e para-substituídas com grupos amino e/ou hidróxidos, como p-fenilenodiamina e p-aminofenol); um agente acoplador (compostos aromáticos m-substituídos com grupos doadores de elétrons, como as fenilenodiaminas, resorcinol, naftol) e um componente oxidante em meio alcalino, (principalmente o peróxido de hidrogênio), na presença de amônia (OLIVEIRA *et al.*, 2014; TOWNS, 2021; HE *et al.*, 2022).

Embora o uso das tinturas capilares seja muito difundido, esses cosméticos apresentam riscos aos seus usuários e aos profissionais que os aplicam, devido às reações adversas que promovem nos sistemas biológicos, que vão desde uma simples irritação/sensibilização até efeitos sistêmicos mais graves (COIMBRA *et al.*, 2022). Essas reações das tinturas capilares podem variar ainda de acordo com as sensibilidades individuais do consumidor, do uso inadequado do produto ou ainda da composição usada no tingimento dos fios (CHIARI, 2012; SANTOS; CRUZ; COSTA, 2018). Contudo, embora haja essa predisposição individual, estudos confirmam que os componentes químicos das tinturas capilares estão entre os elementos mais reativos da indústria cosmética (NOHYNEK *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2014; NANDINI *et al.*, 2023).

A retirada da tintura capilar, pós coloração, é feita por sucessivas lavagens. Primeiramente, a lavagem é feita somente com água, para retirar o excesso do creme de tingimento aplicado. Posteriormente, é realizada uma segunda lavagem, para a retirada do xampu e, finalmente, a última lavagem para a retirada do condicionador usado para a finalização da higiene capilar. Essas lavagens geram uma grande quantidade de efluentes portadores de corantes, subprodutos das reações entre os componentes da tintura, além de resíduos de xampus e condicionantes, portanto de alta complexidade química, com características potencialmente tóxica e recalcitrante, que podem interferir na qualidade dos tratamentos dos efluentes urbanos de origem domésticos (MAIFADI *et al.*, 2020; 2021). Se essas substâncias não forem devidamente removidas pelas estações de tratamentos de esgoto, elas podem causar sérios

problemas ambientais, como desestabilização do equilíbrio natural dos ecossistemas (CARVALHO; FUNGARO; IZIDORO, 2010; NKANSAH *et al.*, 2016; PAVITHRA *et al.*, 2019).

Atualmente, produtos de cuidado pessoal e cosméticos têm sido enquadrados na categoria de contaminantes emergentes. Considerando que os efluentes de salão de beleza são ricos em resíduos destes poluentes, e que esses contaminantes podem chegar aos corpos d'água, é prudente e necessário que esses efluentes sejam bem avaliados, quantos aos seus potenciais impactos ecotoxicológicos. Uma forma adequada para avaliar a ecotoxicidade desses efluentes, e pela realização de ensaios com bioindicadores expostos a diferentes diluições dessas águas residuais, sob condições experimentais controladas (GRANT, 1994; ARANTES *et al.*, 2017), bem como com amostras coletadas no corpo hídrico receptor do efluente.

Dentre os diversos testes toxicológicos indicados para avaliações preliminares do potencial efeito tóxico de amostras diversas, estão os ensaios com *Lactuca sativa* L. (alface) e *Allium cepa* (cebola). A *L. sativa* é uma espécie amplamente utilizada para avaliar compostos solúveis em água e misturas complexas, como os efluentes, lixiviado de solos e sedimentos. Os ensaios realizados com sementes de *L. sativa* fornecem diversas vantagens sobre os outros organismos-teste, devido ao seu baixo custo, fácil manuseio e cultivo difundido em quase o ano todo (GRYCZAK; KILIPPER; COSTA, 2018; KOMILIS; TZIOUVARAS, 2009; SOBRERO; RONCO, 2004; CHARLES *et al.*, 2011; PRIAC; BADOT; CRINI, 2017). Por essas características, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) também indica a utilização desse bioindicador em ensaios ecotoxicológicos. O bioindicador *Allium cepa* também é considerado um excelente bioindicador de ecotoxicidade (PAMPLONA-SILVA; GONÇALVES; MARIN-MORALES, 2018; SOMMAGGIO *et al.*, 2018; CARITÁ; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2019), indicado como material-teste padrão pela “Royal Swedish Academy of Science” (FISKESJÖ, 1985) e pelo “Gene-Tox Program” (GRANT, 1982).

Considerando o uso das tinturas capilares em larga escala e os poucos estudos sobre os possíveis efeitos ecotoxicológicos dessas tinturas, o presente estudo objetivou avaliar a toxicidade de efluentes gerados em salões de beleza, após tingimento capilar com tintura castanha, por meio de ensaios com sementes de alface (*L. sativa* L.) e de cebola (*Allium cepa*). Além disso, também foi avaliada a possível diminuição da toxicidade destes efluentes, pelo uso de processos de filtração.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Obtenção, preparação e armazenamento das amostras de efluentes

Os efluentes estudados foram coletados, com prévia autorização do proprietário, em um salão de beleza profissional da cidade de Rio Claro/SP, Brasil. Foram coletadas amostras de dois tipos de efluentes, derivados de lavagens de cabelos submetidos à aplicação da tintura capilar castanha: 1) EC - denominado de efluente completo, que foi obtido após sucessivas lavagens capilares, como segue: primeiramente com água, para retirada do excesso da tintura, seguida de uma segunda lavagem com xampu, para garantir a retirada total do excesso de tintura e outra lavagem com condicionador, para finalizar a higienização dos cabelos; 2) ET – denominado de efluente da tintura capilar, obtido da lavagem realizada somente com água, para retirada do excesso da tintura aplicada, portanto isenta de xampu e de condicionador. Essa amostra foi coletada para obter informações sobre a toxicidade relacionada aos componentes exclusivos da tintura capilar. Ao todo, foram coletados, aproximadamente, 20 L de cada tipo de efluente estudado.

Os efluentes coletados passaram por filtração em papel filtro qualitativo (gramatura 80 g/m² e diâmetro 9 cm), para retirar impurezas e partículas sólidas indesejadas. Cerca de 50 mL do efluente foram submetidos à filtração adicional, em filtro de fluoreto de polivinilideno (PVDF) de poros de 0,45 µm de diâmetro. Desta forma, foram estabelecidos quatro tipos de amostras: 1. EC-F: efluente completo, filtrado em filtro de fluoreto de polivinilideno (PVDF); 2. EC-NF: efluente completo, sem filtração em PVDF; 3. ET-F: efluente da tintura capilar, filtrado em filtro PVDF; e 4. ET-NF: efluente da tintura capilar, sem filtração em PVDF. Essas amostras de efluentes foram, adequadamente, armazenadas, separadamente, em galões devidamente identificados e estocados em freezer (aprox. – 4 °C), para evitar a degradação, até a montagem dos bioensaios.

2.2. Organismos-teste

2.2.1. *Lactuca sativa*

A espécie *Lactuca sativa* L. (2n = 18) foi utilizada como organismo-teste para avaliar o potencial fitotóxico dos efluentes gerados em salões de beleza. Foram realizados com esse bioindicador os testes de germinação e crescimento de raiz. Para os ensaios, foram utilizadas sementes de alface da variedade Grand Rapids, (Isla[®] Sementes, Porto Alegre, Brasil - livre de defensivos agrícolas, lote 122681).

2.2.2. *Allium cepa*

A espécie *A. cepa* (2n = 16) foi utilizada como organismo-teste, para as avaliações de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade dos efluentes coletados. Os ensaios foram realizados com sementes de cebola da variedade Baia Periforme (Isla® Sementes, Porto Alegre, Brasil - livre de defensivos agrícolas, lote 132868).

2.3. Bioensaios

2.3.1. Fitotoxicidade em *Lactuca sativa*

Os ensaios de fitotoxicidade com *L. sativa*, foram desenvolvidos de acordo com o protocolo estabelecido por de Sobrero e Ronco (2004), com algumas modificações. Foram distribuídas em placas de Petri forradas com papel de filtro, 30 sementes de alface. As sementes foram expostas à germinação em 4,0 mL dos diferentes tratamentos, sendo cada placa correspondente a um tratamento (D0 = amostra bruta - 100,00%; D1 = amostra diluída a 50,00%; D2 = amostra diluída a 25,00%; D3 = amostra diluída a 12,50%; D4 = amostra diluída a 6,25%; D5 = amostra diluída a 3,125%). O Controle positivo (CP) foi realizado com sulfato de zinco heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,05 M), controle este usado para confirmar a sensibilidade do organismo-teste. O controle negativo (CN) foi realizado com água ultrapura. O ensaio foi realizado com cinco réplicas para cada grupo amostral, distribuídas aleatoriamente em estufa BOD com temperatura controlada a $22,0 \pm 2,0$ °C, sem fotoperíodo, por 120 horas de exposição.

Transcorridas as primeiras 48 h de exposição, foram contabilizadas as sementes germinadas, a fim de se determinar a taxa de germinação. Decorridas as 72 h remanescentes, totalizando as 120 h propostas, foram mensurados, com auxílio de um paquímetro digital de escala milimétrica, os comprimentos das radículas emergidas.

Os resultados desta análise foram usados para calcular a taxa de germinação (TG%), utilizando-se a expressão matemática descrita na Equação 1.

$$TG(\%) = \frac{n^{\circ} \text{ de sementes germinadas}}{n^{\circ} \text{ total de sementes distribuídas}} \times 100 \quad (1)$$

O número de sementes germinadas também foi utilizado para construção de uma curva de regressão (germinação x diluição) e, com base nela, foi calculado o IC₅₀ (concentração necessária para inibir 50% da germinação das sementes, em relação ao CN). A partir das médias

dos valores de crescimento de raízes, foi determinada a taxa de fitotoxicidade (TF), conforme descrito na Equação 2.

$$TF(\%) = \frac{(\text{média de resultados do CN} - \text{média de resultados do tratamento})}{(\text{média de resultados do CN})} \times 100 \quad (2)$$

2.3.2. Citotoxicidade e genotoxicidade em *Allium cepa*

Os ensaios com *A. cepa* foram desenvolvidos de acordo com o protocolo de Grant (1982), com algumas modificações. Foram distribuídas, em placas de Petri forradas com papel filtro, 100 sementes de cebola, que foram submetidas à germinação em 5,0 mL dos diferentes tratamentos (D1 = amostra diluída a 50,00%; D3 = amostra diluída a 12,50%; D5 = amostra diluída a 3,125%). A seleção destas diluições foi estabelecida pelo experimento de germinação de sementes, realizado com *L. sativa*. O CN foi realizado em água ultrapura e o CP com Trifluralina (Nortox[®], CAS 1582-09-8) na concentração de 0,84 g/L. O ensaio foi realizado com três réplicas para cada grupo amostral, em estufa BOD com fotoperíodo e temperatura controlada a 22,0±2,0, durante 120 horas de exposição.

Após a germinação, as radículas foram coletadas, fixadas em Carnoy 3:1 (3 partes de etanol para 1 de ácido acético – v:v) e armazenadas a 4 °C. Este material foi utilizado para os testes de aberrações cromossômicas/nucleares (AC) e de micronúcleo (MN), com células meristemáticas, e de micronúcleo (MN) com células F1.

Para o preparo das lâminas, as raízes fixadas passaram, previamente, por três banhos em água destilada, para retirada do fixador. Após esse procedimento, as radículas foram hidrolisadas em HCl 1,0 M a 60 °C, por 10 minutos, e transferidas para frascos escuros contendo reativo de Schiff, onde permaneceram por, aproximadamente, duas horas. Na sequência, as regiões meristemáticas e F1 foram seccionadas em lâmina, com o auxílio de uma navalha metálica. O material recebeu uma gota do corante carmim acético (2%), foi recoberto com lamínula e esmagado, suavemente. Para a obtenção de lâminas permanentes, as lamínulas foram extraídas em nitrogênio líquido e as lâminas montadas em resina sintética (Entellan[®]).

As análises das lâminas foram feitas em microscopia de luz, objetiva de 40 X e os resultados foram utilizados para a obtenção dos índices de citotoxicidade, genotoxicidade e do potencial mutagênico dos efluentes estudados. Foram contabilizadas 500 células/lâmina: 4 lâminas/réplica, sendo 3 réplicas/tratamento, totalizando 6.000 células/tratamento.

O índice mitótico (IM) foi obtido pela relação entre o número de células em divisão e o número total de células observadas, sendo usado como indicativo de citotoxicidade. A análise

da frequência de células em processo de morte celular foi realizada como complemento da informação de citotoxicidade (Equação 3). O índice de genotoxicidade (IGen) foi avaliado pela determinação da frequência de micronúcleos (MN); alterações nucleares; e aberrações cromossômicas, como brotos nucleares, células binucleadas, células poliplóides, aderências cromossômicas, C-metáfases, perda, ponte e quebra cromossômica, anáfases multipolares e outras (Equação 4.) O potencial mutagênico (PMut) das amostras foi estimado pela determinação da frequência de células F1 portadoras de MN (Equação 5).

$$\text{Índice mitótico (IM)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células em mitose}}{\text{n}^\circ \text{ total de células observadas}} \times 100 \quad (3)$$

$$\text{Índice de Genotoxicidade (IGen)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células alteradas}}{\text{n}^\circ \text{ total de células observadas}} \times 100 \quad (4)$$

$$\text{Potencial mutagênico – F1 (PMut)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células F1 alteradas}}{\text{n}^\circ \text{ total de células F1 observadas}} \times 100 \quad (5)$$

2.4. Análise estatística

As análises estatísticas de todos os testes foram realizadas com auxílio do software estatístico GraphPad Prism 9.0 (La Jolla, E.U.A.). Todos os dados obtidos foram analisados, quanto à normalidade, pelo teste de D'Agostino e Pearson e, em seguida, comparados estatisticamente com o respectivo CN, de acordo com o teste mais apropriado. Para distribuições normais (distribuição de Gauss), os dados foram comparados pelo teste paramétrico ANOVA, seguido pelo teste de comparação múltipla de Holm-Sidak ($p < 0,05$). Para distribuições não normais, os dados foram comparados pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn.

3. RESULTADOS

Os resultados dos ensaios de germinação de *L. sativa*, expostas aos tratamentos EC-NF, EC-F, ET-NF e ET-F, apresentaram distribuição normal, portanto a comparação entre os resultados do tratamento com os controles foi realizada pelo teste paramétrico ANOVA/Holm-Sidak. Já para os resultados de crescimento radicular, como nenhum dos tratamentos apresentou distribuição normal, a comparação foi feita pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis/Dunn.

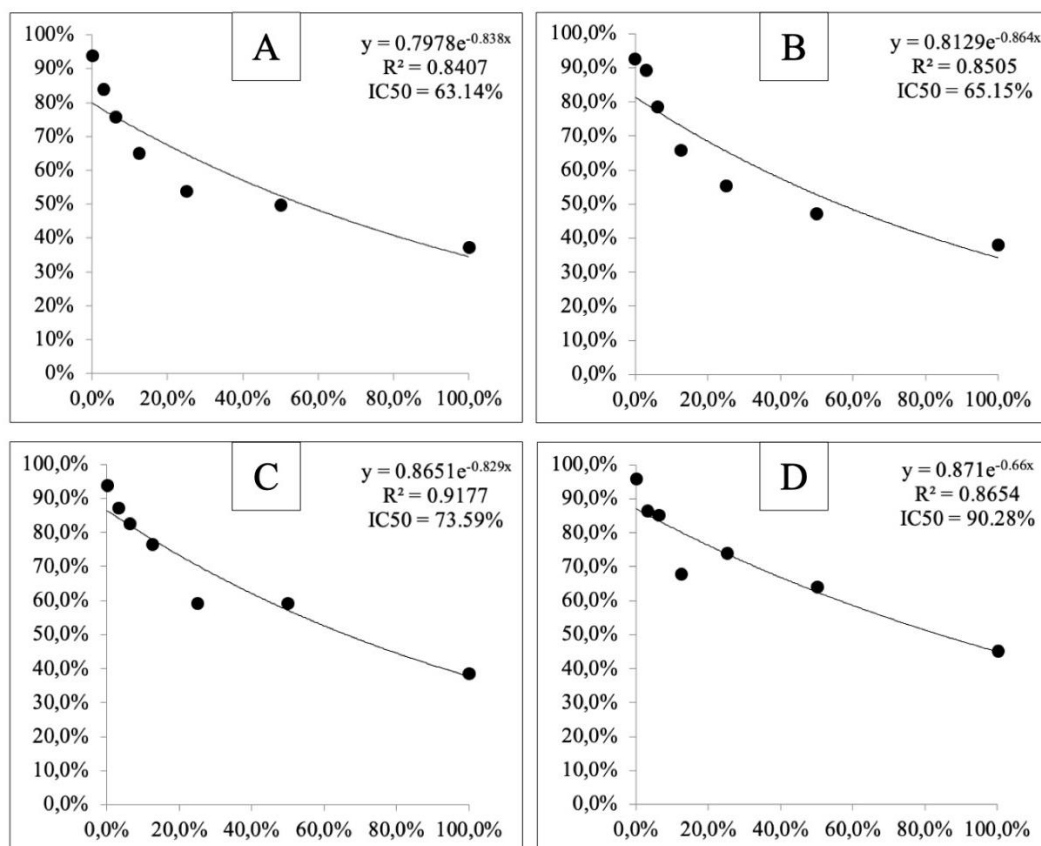
Todos os resultados de taxa de germinação de sementes, comprimento de raiz e taxa de fitotoxicidade, obtidos nos ensaios com *L. sativa*, estão apresentados nas Tabelas 1 e 2. Como

o CP foi eficaz na inibição da germinação de todas as sementes expostas, este tratamento não foi incluído nas tabelas.

Todas as diluições, de todos os tratamentos avaliados, exibiram taxas de germinação, estatisticamente diferentes, em relação ao CN (Tabelas 1 e 2). Já para os resultados de crescimento de raiz e taxas de fitotoxicidade, todos as concentrações testadas dos efluentes EC e ET, filtrados e não filtrados, apresentaram diferenças significativas, em relação ao CN (Tabela 1 e 2), exceto a concentração D5 (3,125%) dos tratamentos ET-F (Tabela 2).

Os resultados de taxa de germinação de *L. sativa* também foram utilizados para a construção da curva de regressão, necessária para determinar a concentração de inibição de 50% da germinação das sementes (IC_{50}). A equação de cada curva permitiu determinar o perfil dos tratamentos, o que possibilitou a comparação da toxicidade entre os mesmos (Figura 1).

Figura 1 – Curvas de regressão obtida com os dados germinação de sementes de *Lactuca sativa* submetidas aos diferentes tratamentos avaliados.



A: EC-NF; B: EC-F; C: ET-NF; D: ET-F; Eixo X: amostras testadas (0,00%; 3,125%; 6,25%; 12,50%; 25,00%; 50,00%; e 100,00% /amostra bruta); Eixo Y: porcentagem de sementes germinadas.

Tabela 1 - Resultados e os desvios padrão das taxas de germinação de sementes de alface, crescimento de raiz e de fitotoxicidade, após a exposição às amostras do efluente completo (EC).

Tratamentos	EC-NF			EC-F		
	TG (%)	Crescimento de raiz (mm)	TF (%)	TG (%)	Crescimento de raiz (mm)	TF (%)
CN	94.00 ± 4.35	40.48 ± 1.73	0.00 ± 0.00	92.67 ± 2.79	40.60 ± 1.30	0.00 ± 0.00
D0	37.33 ± 4.94*	6.41 ± 0.83* [‡]	84.24 ± 1.23* ^Φ	38.00 ± 1.83*	11.36 ± 0.80* [‡]	72.03 ± 1.27* ^Φ
D1	50.00 ± 5.27*	12.18 ± 0.93* [‡]	69.96 ± 1.18* ^Φ	47.33 ± 2.79*	16.22 ± 0.63* [‡]	60.04 ± 1.06* ^Φ
D2	54.00 ± 4.35*	18.52 ± 0.86* [‡]	54.30 ± 0.15* ^Φ	55.33 ± 1.83*	21.57 ± 0.72* [‡]	46.88 ± 0.82* ^Φ
D3	65.33 ± 3.80*	23.02 ± 1.13* [‡]	43.16 ± 1.02* ^Φ	66.00 ± 2.79*	23.84 ± 0.61* [‡]	41.32 ± 1.05* ^Φ
D4	76.00 ± 4.35*	28.52 ± 0.89* [‡]	29.55 ± 1.79*	78.67 ± 1.83*	27.73 ± 0.80* [‡]	31.71 ± 1.35*
D5	84.00 ± 2.79* [¥]	32.20 ± 1.77* [‡]	20.46 ± 2.48*	89.33 ± 2.79* [¥]	31.61 ± 1.20* [‡]	22.13 ± 1.23*

CN: controle negativo; EC-NF: efluente completo não filtrado em PVDF; EC-F: efluente completo filtrado em PVDF; TG (%): taxa de germinação, TF (%): Taxa de fitotoxicidade; D0: amostra bruta; D1: diluição a 50,00%; D2: diluição a 25,00%; D3: diluição a 12,50%; D4: diluição a 6,25%; D5: diluição a 3,125%. *significativo ($p < 0.05$) em relação ao CN; ¥. significativo entre os tratamentos do parâmetro TG; ‡. significativo entre os tratamentos do parâmetro crescimento de raiz; Φ. significativo entre os tratamentos do parâmetro TF.

Tabela 2 - Resultados e os desvios padrão das taxas de germinação de sementes de alface, crescimento de raiz e de fitotoxicidade, após a exposição às amostras do efluente da tintura capilar (ET).

Tratamentos	ET- NF			ET-F		
	TG (%)	Crescimento de raiz (mm)	TF (%)	TG (%)	Crescimento de raiz (mm)	TF (%)
CN	94.00 ± 4.35	40.77 ± 2.79 [‡]	0.00 ± 0.00	96.00 ± 4.35	39.94 ± 1.69 [‡]	0.00 ± 0.00
D0	38.67 ± 3.80* [¥]	6.83 ± 0.95* [‡]	83.23 ± 1.03* ^Φ	45.33 ± 3.80* [¥]	9.31 ± 0.94* [‡]	76.69 ± 0.56* ^Φ
D1	59.33 ± 4.94*	12.09 ± 0.92* [‡]	70.28 ± 1.34* ^Φ	64.00 ± 6.41*	14.69 ± 1.54* [‡]	63.20 ± 0.57* ^Φ
D2	59.93 ± 2.79* [¥]	16.04 ± 1.40* [‡]	60.68 ± 2.08* ^Φ	74.00 ± 2.79* [¥]	19.03 ± 1.03* [‡]	52.36 ± 0.64* ^Φ
D3	76.67 ± 3.33* [¥]	24.07 ± 1.23* [‡]	40.95 ± 1.82*	68.00 ± 1.83* [¥]	22.96 ± 1.02* [‡]	44.51 ± 4.69*
D4	82.67 ± 2.79*	28.53 ± 0.90* [‡]	29.99 ± 1.92* ^Φ	85.33 ± 2.98*	32.60 ± 1.41* [‡]	18.39 ± 1.59* ^Φ
D5	87.33 ± 2.79*	32.12 ± 1.17* [‡]	21.21 ± 3.41* ^Φ	86.67 ± 2.36*	38.38 ± 1.42 [‡]	3.88 ± 2.18 ^Φ

CN: controle negativo; ET-NF: efluente da tintura capilar não filtrado em PVDF; ET-F: efluente da tintura capilar filtrado em PVDF; TG (%): taxa de germinação, TF (%): Taxa de fitotoxicidade; D0: amostra bruta; D1: diluição a 50,00%; D2: diluição a 25,00%; D3: diluição a 12,50%; D4: diluição a 6,25%; D5: diluição a 3,125%. *significativo ($p < 0.05$) em relação ao CN; ¥. significativo entre os tratamentos do parâmetro TG; ‡. significativo entre os tratamentos do parâmetro crescimento de raiz; Φ. significativo entre os tratamentos do parâmetro TF.

A partir das diluições testadas de EC-NF, foi possível determinar um IC_{50} de 63,14% (Figura 1A), para esse tipo de efluente, enquanto que o de EC-F este índice foi equivalente a 65,05% (Figura 1B). Já em relação ao tratamento ET-NF, foi verificado IC_{50} de 73,59% (Figura 1C), enquanto que para o ET-F, este valor foi equivalente a 90,28% (Figura 1D). Os valores de R^2 , de todas as regressões, permaneceram acima de 86%, garantindo assim o ajuste da curva aos dados.

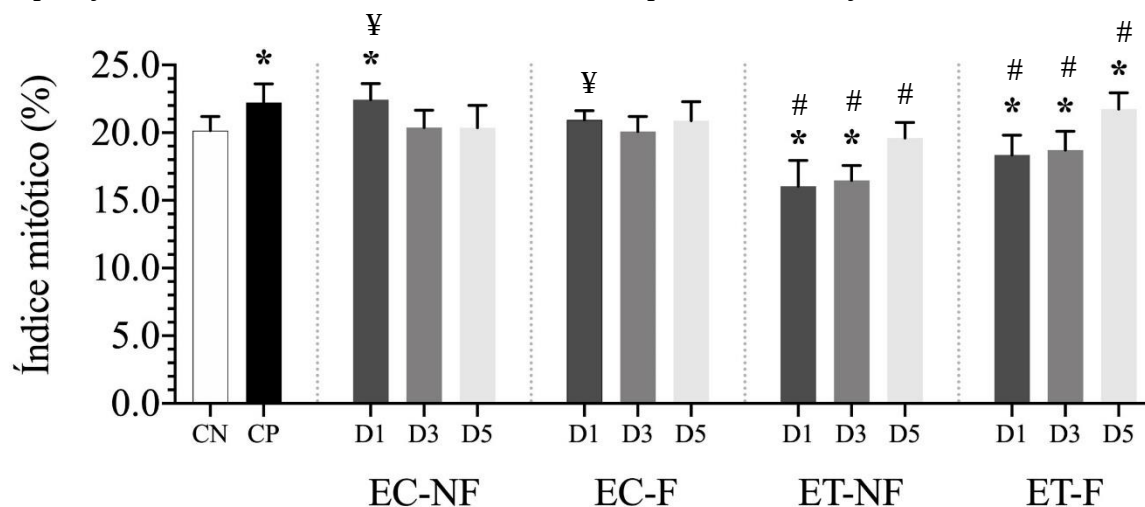
Os resultados do índice mitótico (IM), obtidos com células meristemáticas de *A. cepa*, mostraram distribuição normal para os tratamentos EC-F e ET-F. Desta maneira, as análises estatísticas desses resultados foram realizadas pelo teste paramétrico ANOVA/Holm-Sidak. Como os resultados obtidos para o índice de genotoxicidade (IGen), dos mesmos tratamentos, não apresentaram distribuição normal, foi aplicado na avaliação estatística o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis/Dunn. Os tratamentos EC-NF e ET-NF apresentaram distribuição normal, para IM e IGen, sendo também utilizado, nestes casos, o teste paramétrico ANOVA/Holm-Sidak. Todos os resultados de IM, IGen estão apresentados nas Figuras 2 e 3.

Os resultados do IM mostraram que, apenas a D1 (diluição do efluente em 50,0%) do tratamento EC-NF, apresentou diferença significativa, em relação ao CN. Quanto ao tratamento EC-F, não foram observadas diferenças significativas de IM. Para os tratamentos ET-NF e ET-F, todas as diluições apresentaram diferenças significativas, exceto D5 (3,125%) do ET-NF.

Para os resultados de IGen, foi observado que as diluições D1 (50,0%) e D3 (12,5%) do tratamento EC-NF e a diluição D1 (50,0%) do EC-F apresentaram resultados genotóxicos significativos, em relação ao CN. Quanto aos tratamentos ET-NF e ET-F, todas as diluições induziram diferenças significativas, exceto D5 (3,125%) do ET-F.

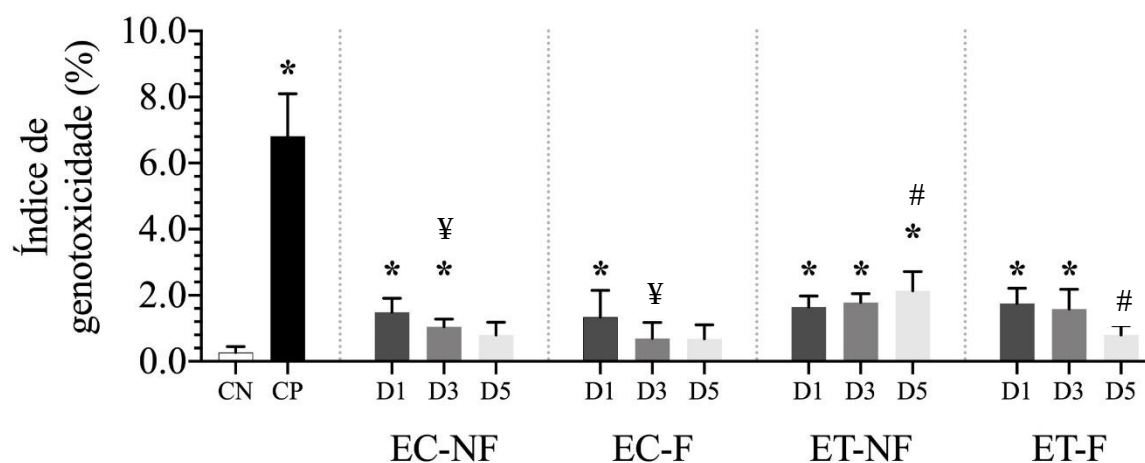
Os resultados referentes ao PMut não foram apresentados em figuras, pois nenhuma das diluições (D1, D3 e D5) dos tratamentos (EC-NF; EC-F; ET-NF e ET-F), apresentou diferenças significativas, em relação ao CN.

Figura 2 - Resultados do teste de citotoxicidade (índice mitótico), realizado com *A. cepa*, após exposição aos diferentes efluentes, nas suas correspondentes diluições.



CN: controle negativo; CP: controle positivo. EC-NF efluente completo não filtrado em PVDF; EC-F: efluente completo filtrado em PVDF; ET_NF: efluente da tintura capilar não PVDF; ET-F: efluente da tintura capilar filtrado em PVDF. D1: diluição a 50,00%; D3: diluição a 12,50%; D5: diluição a 3,125%. *significativo ($p < 0.05$) em relação ao CN; ¥:significativo entre os tratamentos EC-NF e EC-F; #: significativo entre os tratamentos ET-NF e ET-F.

Figura 3 - Resultados do teste de genotoxicidade (indução de alterações cromossômicas e nucleares), realizado com *A. cepa*, após exposição aos diferentes efluentes, nas suas correspondentes diluições.



CN: controle positivo. EC-NF efluente completo não filtrado em PVDF; EC-F: efluente completo filtrado em PVDF; ET_NF: efluente da tintura capilar não PVDF; ET-F: efluente da tintura capilar filtrado em PVDF. D1: diluição a 50,00%; D3: diluição a 12,50%; D5: diluição a 3,125%. *significativo ($p < 0.05$) em relação ao CN; ¥:significativo entre os tratamentos EC-NF e EC-F; #: significativo entre os tratamentos ET-NF e ET-F.

4. DISCUSSÃO

A lavagens capilar faz parte da rotina diária dos salões de beleza. Este processo elimina alguns compostos reativos, como precursores, acopladores e corantes, que podem reagir entre si, formando subproduto intermediários, que reagem com aminas originais da tintura, formando a base de Bandrowski, que é um composto de reconhecido potencial genotóxico (BOLT; GOLKA, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2014; UTER; LEPOITTEVIN; LIDÉN, 2021). Consequentemente, esses compostos fazem parte dos efluentes de salões de beleza que, pela sua alta reatividade biológica, tornam esses efluentes preocupantes, tanto pelo seu potencial poluidor como pela falta de tecnologias destinadas a tratamentos de efluentes de salões de beleza (BESSEGATO *et al.*, 2018; MAIFAID *et al.*, 2020). Além disso, a toxicidade remanescente dos efluentes pode ser incompatível com a qualidade desejada da água do corpo hídrico receptor, mesmo depois de passar por estações de tratamento de efluentes (ETEs). Isso acontece pelo fato destas ETE serem projetadas para a redução de poluentes convencionais, como matéria orgânica e sólidos suspensos, e não para a redução da toxicidade específicas, como a de corantes capilares (GORITO *et al.*, 2017; RODRIGUEZ-NARVAEZ *et al.*, 2017; TARPANI; AZAPÁGICO, 2018).

De acordo com Leusch *et al.* (2014), os testes ecotoxicológicos possuem, como principal vantagem, a detecção de efeitos tóxicos baseados em atividades biológicas, mesmo quando não há um conhecimento prévio do agente tóxico. Diferentes espécies vegetais têm sido, frequentemente, utilizadas como bioindicadores de ecotoxicidade como, por exemplo, a espécie *Allium cepa* L. (LEME; MARIN-MORALES, 2009; PAMPLONA-SILVA; GONÇALVES; MARIN-MORALES, 2018; SOMMAGGIO *et al.*, 2018; CARITÁ; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2019), *Lactuca sativa* L. (SOBRERO; RONCO, 2004; CHARLES *et al.*, 2011; CRINI, 2017; COSTA, 2018), *Tradescantia* sp. (MIŠÍK *et al.*, 2011; CAMPOS *et al.*, 2019; KHOSROVYAN *et al.*, 2023), entre outros (GERAS'KIN; EVSEEVA; OUDALOVA, 2011; SOUZA; GUEDES; FONTANETTI, 2016).

Os bioensaios de inibição do processo germinativo e do alongamento das radículas de *Lactuca sativa* se caracterizam como uma ferramenta eficaz para avaliar o potencial tóxico de substâncias. Esses ensaios são amplamente utilizados para identificar e quantificar danos toxicológicos de resíduos, pela sua simplicidade de execução, rapidez de respostas, fidelidade dos resultados e reprodutividade do teste. A utilização desses bioensaios destacam-se pela sua eficácia em fornecer dados precisos e confiáveis, contribuindo, significativamente, para a avaliação de riscos ambientais e preservação da saúde ecossistêmica (WANG; KETURI, 1990; PALMIERI *et al.*, 2014; GONÇALVES; COELHO; CAMILI, 2016).

Para Sobrero e Ronco (2004), a inibição de germinação pode ser considerada um biomarcador de efeito letal, enquanto a inibição do alongamento de raiz e do hipocótilo pode ser classificada como biomarcador de efeitos subletais. Desta forma, os resultados obtidos por esses biomarcadores se complementam, pois concentrações baixas de compostos tóxicos podem não ser suficientes para inibir a germinação, mas podem atrasar ou inibir o processo de alongamento da plântula, dependendo do modo e local da ação dos compostos em questão (JADERLUND; ZACKRISSON; NILSSON, 1996; TAMADA *et al.*, 2012; TENA *et al.*, 2021).

Pelos resultados obtidos nos ensaios realizados com *L. sativa*, todas as diluições de todos os tratamentos, com exceção da diluição D5 do ET-F, foram fitotóxico (Tabela 1). Quando os mesmos tratamentos (EC-NF e EC-F) foram usados em bioensaios de citogenotoxicidade com *A. cepa*, foi observado respostas diferentes às de germinação com *L. sativa*. Pelo ensaio do IM, foi observado que, apenas a concentração D1 (50,0%) do tratamento EC-NF, apresentou alteração estatisticamente diferente para este parâmetro, quando comparado ao CN (Figura 2A). Esse resultado indicou que essa concentração estimulou a divisão celular, efeito este que pode resultar em uma possibilidade de proliferação celular desordenada (MAGDALENO *et al.*, 2016; PANIGRAHI *et al.*, 2021). Já o tratamento EC-F não apresentou alterações significativas, uma vez que os valores de IM se aproximaram aos do CN, em todas as concentrações estudadas (Figura 2B). Quanto ao potencial genotóxico das tinturas, foram observadas diferenças estatísticas, em relação ao CN, para os tratamentos D1 (50,0%) e D3 (12,5%) do EC-NF (Figura 3A), e D1 do EC-F (Figura 3B). Entretanto, quando as mesmas concentrações dos tratamentos filtrados e não filtrados em PVDF foram comparadas entre si, não foi observada comprovação de redução da toxicidade pós filtração em PVDF.

O material do filtro PVDF é um polímero hidrofóbico atóxico, que possui alta resistência térmica e química. É um filtro de baixa ligação com proteína, portanto, recomendado para filtrações de amostras ambientais, principalmente para purificação de águas (THÜRMER, 2009; SUJA *et al.*, 2017). A filtração de amostras pode separar compostos tóxicos associados com sólidos suspensos ou partículas removíveis (BURKHARD; ANKLEY, 1989; LEUSCH; CHAPMAN, 2011). Além disso, em meio aquoso, a interação de substâncias orgânicas e inorgânicas com a membrana é dependente das propriedades de superfície da membrana utilizada (AL-AMOUDI; LOVITT, 2007; FERELLA *et al.*, 2013). Assim, a eficiência das técnicas de filtração depende do tamanho da partícula, da distribuição dos compostos na água e da porosidade dos filtros. Em geral, quanto menor o diâmetro médio dos poros dos filtros, melhor será sua eficiência, pois conseguirá reter uma maior gama de componentes (GHUNMI,

ABU; ZEEMAN; VAN LIER, 2011; CHEN *et al.*, 2018; ABDEL, 2018; MEDEIROS *et al.*, 2020).

Melo *et al.* (2013) constataram uma diminuição acentuada da toxicidade de efluentes gerados por indústrias de cosméticos, após estes passarem por processos físico-químicos de equalização, separação óleo-água, coagulação/floculação, sedimentação e filtração com carvão ativado/areia. Os autores inferiram que as toxicidades observadas nas amostras estavam associadas à presença de materiais particulados, compostos voláteis ou subletais (MELO *et al.*, 2013).

Srebernich *et al.* (2009) também verificaram a influência de diferentes tipos de filtros (filtro de flanela, filtro de papel ecológico, filtro de papel comum e filtro de nylon) na retenção da contaminante emergente cafeína. Os autores observaram que o tipo de filtro utilizado na filtração da bebida teve influência significativa no teor de cafeína. A capacidade de retenção de cafeína pelos filtros obedeceu a ordem: filtro de flanela; filtro de papel ecológico; filtro de papel comum e filtro de nylon. A diferença entre o teor máximo e mínimo de cafeína foi associada à porosidade dos materiais dos filtros testados.

Outro estudo, desenvolvido por Rendón *et al.* (2018), demonstrou que as concentrações de diterpenos presentes em cafés dependiam do tamanho das partículas do pó de café e da porosidade do filtro de papel. Os dados aqui apresentados para efluentes contaminados com tintura capilar corroboram com os dados da literatura e reforçam que a escolha do filtro é um fator importante a ser considerado, pois os filtros apresentam composições/características distintas, portanto podem conferir respostas diferentes e influenciar, diretamente, na concentração dos componentes tóxicos das amostras.

Zortea, Freiburger e Fuzinato (2018) observaram uma relação dependente entre concentração da amostra de efluente de lavanderia hospitalar com inibições da germinação e do crescimento das plântulas. Semelhantemente, os dados de Novack *et al.* (2013) obtidos por meio de bioensaios com *L. sativa*, mostraram essa mesma relação entre concentração de efluente da indústria de tintas e diminuição da taxa de germinação. Os resultados obtidos no presente estudo, com efluentes de salões de beleza contaminados com tintura capilar, corroboram os dados da literatura acima citados, pois também foi evidenciada que, quanto maior a concentração do efluente, maior é a inibição da taxa de germinação e do desenvolvimento das plântulas.

No presente estudo, também foi avaliado se a filtragem do efluentes de salões de beleza, por filtros especiais, além do filtro de papel para retirada de material grosseiro, poderia diminuir a toxicidade desses efluentes. Os ensaios realizados com os efluentes ET-NF e ET-F indicaram

menor quantidade de resíduos da tintura do que os portadores de resíduos de xampus e condicionadores.

Pelo ensaio do IM com *A. cepa*, as diluições D1 e D3 do tratamento ET-NF e as três diluições do tratamento ET-F apresentaram diferenças significativas, em relação aos resultados de CN, portanto foram citotóxicas para esse bioindicador. Esse estímulo observado em ET-F (menor concentração) pode estar relacionado com a concentração de NP de TiO₂ presentes na tintura. Estudos realizados por Laware e Raskar (2014) mostraram que as baixas concentrações de NP de TiO₂ estimulam o crescimento desta planta. Portanto, os ensaios realizados com esse bioindicador podem estar associados com uma resposta espécie específica para as NP de TiO₂.

Para os ensaios de IGen com *A. cepa*, foi observado que todas as diluições testadas do tratamento ET-NF (D1-50,0%; D3-12,5%; D5-3,125%) e as duas diluições maiores do ET-F (D1-50,0% e D3-12,5%) foram genotóxicas para este bioindicador.

Estes resultados podem ser decorrentes de um possível impedimento de interações/reações química, entre os componentes do efluente, formação de compostos tóxicos associados com os sólidos em suspensão ou por remoção de partículas no processo de filtração. A interação entre a tintura capilar e os compostos dos xampus e condicionadores pode gerar uma mistura complexa, com ampla variedade de componentes. Dentre esses componentes pode se destacar os surfactantes, que são substâncias capazes de transportar moléculas do corante por uma variedade de mecanismos, incluindo a co-micelização (NAGARAJAN, 1986), solubilização em micelas (CHOUCAIR; EISENBERG, 2003) e adsorção (NAFICY *et al.*, 1981).

Dois estudos demonstraram que certos surfactantes, como o lauril éter sulfato de sódio e o lauril éter polioxietileno, podem danificar as membranas celulares, diminuir a atividade mitocondrial e inibir a síntese protéica celular (JELINEK, 1998; SONG, 2011). Ao atuarem como carreadores, os surfactantes facilitam a interação das tinturas capilares com as células, auxiliando os corantes capilares a se ligarem a macromoléculas, como o DNA (YOU, 2009). Alguns corantes e surfactantes utilizados em tinturas capilares apresentam potencial mutagênico (AMES, 1975), representando um perigo à saúde humana e ao ambiental. Vale destacar que o lauril éter sulfato de sódio é um dos componentes presentes nos xampus e condicionadores aplicados nas lavagens dos fios, pós tingimento. Assim, tanto os dados da literatura como os obtidos nesse estudo corroboram a hipótese de que os efeitos nocivos dos efluentes de salão de beleza, contaminados com tintura capilar, podem ser resultado da ação de compostos tensoativos dos produtos utilizados.

De forma geral, os tratamentos EC induziram menores taxas de germinação de sementes de alface, que os tratamentos ET. Esse dado é corroborado pelos valores de IC_{50} , que apontam maior toxicidade para EC-NF e EC-F do que para ET-NF e ET-F. Foi observado que EC-NF e EC-F, nas menores concentrações (63,14% e 65,05%, respectivamente) inibiram a germinação das sementes expostas em 50,0%. Em relação ao ET-NF e ETF, apenas as concentrações maiores (73.59% e 90.28%, respectivamente) apresentaram esse mesmo efeito inibidor.

Os resultados descritos estão baseados nos resultados do coeficiente de determinação (R^2). Coeficiente este considerado uma medida de concordância de um modelo estatístico linear generalizado, como a curva de regressão utilizada neste estudo. Schober, Boer e Schwarte (2018) estabeleceram faixas de interpretação dos valores obtidos, onde: $R^2 > 0,9$ indica correlação muito forte; entre 0,9 e 0,7 correlação forte; entre 0,7 e 0,5 correlação moderada; entre 0,5 e 0,3 correlação fraca; e entre 0,3 e 0,0 correlação insignificante. De acordo com essa classificação, os dados deste estudo, mostram uma correlação forte (EC-NF; EC-F e ET-F) e muito forte (ET-NF), uma vez que o menor valor de R^2 foi de 0,8617.

Outro resultado interessante do estudo foi a resposta de toxicidade observada após o processo de filtração com PVDF (poro de 0,45 μm). Quando as amostras dos efluentes foram submetidas a este filtro (EC-F e ET-F), houve uma diminuição da toxicidade, em relação às amostras não filtradas, demonstrada pelos registros dos mais altos valores de IC_{50} antes da filtração e, conseqüentemente, sua diminuição após a mesma. Esta resposta sugere a retenção de moléculas formadas, por modificação ou transformação das reações entre a tintura e os componentes do xampu e do condicionador. Assim, pode-se inferir que o filtro de PVDF pode ser capaz de reter os componentes da tintura presente nos efluentes. Dessa forma, sugere-se que a filtração de efluentes provenientes do salão de beleza pode minimizar a toxicidade dos mesmos e, conseqüentemente, causar menos impacto à rede de coleta, ao sistema de tratamento de esgoto e aos recursos hídricos receptores desses efluentes.

Estudos realizados por Perdigón-Melón *et al.* (2010), com efluentes de uma indústria de cosméticos, também registraram diminuição da toxicidade desses efluentes, após estes passarem por processo de filtração. A toxicidade foi associada às substâncias usadas no processo produtivo, como surfactantes, corantes, conservantes, derivados de fenol, entre outros componentes. Além disso, foram consideradas as possíveis interações químicas entre eles, como efeitos aditivos ou sinérgicos, corroborando com os resultados aqui encontrados. Pliego *et al.* (2012) e Melo *et al.* (2013) também destacaram que a toxicidade dos efluentes provenientes da indústria cosmética está relacionada à alta presença de compostos tóxicos, como surfactantes, derivados fenólicos, corantes e conservantes. Os autores ainda afirmam que

esses efluentes, por apresentar uma composição química complexa, são de relevante potencial detrimental.

Dentre os compostos da tintura capilar castanha, que compõem os efluentes alvo deste estudo, pode-se observar uma ampla variedade de compostos, dentre eles corantes ou precursores, tais como resorcinol, hidroquinona, m-aminofenol e tolueno-2,5-diamina. As aminas aromáticas, como o tolueno-2,5-diamina e 1,4-diamino-2-metilbenzeno, são componentes importantes das tinturas permanentes, devido ao seu baixo peso molecular e alta capacidade de ligação a proteínas. Estas características fazem com que esses compostos sejam classificados como elementos altamente sensibilizantes (KRASTEVA *et al.*, 2009; VOGEL *et al.*, 2017). Além destes compostos, a tintura capilar utilizada nesse estudo possui dióxido de titânio, um composto inorgânico de pigmentação branca classificado pela IARC (Agência Internacional de Pesquisa em Câncer) como capaz de causar carcinogenicidade em humanos (grupo 2B) (MERLETTI *et al.*, 1984). No Brasil, houve um projeto de Lei 1370/11 que visava proibir a utilização de dióxido de titânio em alimentos e cosméticos. No entanto, essa proposta foi arquivada em 2019, sendo usado em vários cosméticos, como em sabonetes convencionais (THAME, 2011).

Hu *et al.* (2020) demonstraram a depreciação da qualidade nutricional de *L. sativa* após exposição a NPs de TiO₂. Os autores associaram esse efeito à absorção das NPs de TiO₂ na superfície radicular, o que poderia inibir a absorção de água e nutrientes, culminando em prejuízo ao processo fotossintético e induzindo danos celulares, por estresse oxidativo.

Mushtaq (2011) estudou os efeitos de NPs de TiO₂ em plantas de pepino e constataram efeitos tóxicos, evidenciados pela diminuição da taxa de germinação das sementes e inibição do crescimento radicular, corroborando com os achados da presente pesquisa.

Estudos relatam danos ao DNA de células vegetais, após exposição a NPs de TiO₂ (KLANCNIK *et al.*, 2010; KUMARI *et al.*, 2011; PAKRASHI *et al.*, 2014; CASTIGLIONE *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2019). Santos *et al.* (2019) constataram danos em células de *A. cepa* expostas às NPs de TiO₂, indicando que são absorvidas pelas células meristemáticas e permanecem armazenadas no interior de vacúolos citoplasmáticos. Os autores associaram a internalização das NPs de TiO₂ ao excesso de partículas carregadas positivamente, as quais são facilmente atraídas e internalizadas pela membrana plasmática (carregadas negativamente). Consequentemente, ocorreram efeitos celulares negativos, dentre eles a ruptura da membrana plasmática. Esse mesmo estudo identificou efeitos genotóxicos em células meristemáticas de *A. cepa* expostas às NPs de TiO₂, constatados pela presença de aderência cromossômica e brotos nucleares. No presente estudo, realizado com efluentes de salões de beleza, contaminados com

resíduos de tintura capilar, as alterações citogenéticas mais frequentes foram C-metáfase, metáfases poliploides, micronúcleos (MN) e aderência cromossômica. Esses resultados indicam, uma possível ação aneugênica de ambos os efluentes. Apesar da expressiva presença destas alterações, não foram encontrados MN em células F1 expostas aos tratamentos avaliados

Em geral, o comprometimento do aparelho mitótico também pode levar a aderências cromossômicas (VENTURA-CAMARGO *et al.*, 2011), alterações consideradas como anormalidades irreversíveis, por envolverem a matriz proteica da cromatina, que leva a célula à morte (FISKESJÖ, 1988).

Sendo assim, a interrupção da polimerização do fuso mitótico pode promover uma ligação unilateral dos cromossomos, inviabilizando sua movimentação em direção aos pólos, ocasionando perdas cromossômicas (SHAMINA *et al.*, 2003). Tanto as perdas quanto as quebras cromossômicas podem originar MN, ou seja, essas estruturas podem ser provenientes de ação aneugênica ou clastogênica, respectivamente. Os MN decorrentes de aberrações cromossômicas geralmente apresentam assincronia de ciclo celular, em relação ao núcleo principal (FERNANDES *et al.*, 2007) e, assim, podem representar uma estratégia de eliminação de danos genéticos (OBE; BEEK, 1982; STOPPER; MÜLLER, 1997).

Já os brotos nucleares são alterações genotóxicas derivadas de atraso na migração dos cromossomos, durante a anáfase. Esses cromossomos atrasados são envolvidos pelo envoltório nuclear que está sendo reorganizado na célula, antes de estarem totalmente reintegrados ao núcleo. Os brotos podem também ser derivados de ação de agentes clastogênicos, que promovem quebras, pontes e rearranjos cromossômicos, que interferem na reorganização da cromatina nuclear (SERRANO-GARCÍA; MONTEIRO-MONTOYA, 2001). Além disso, os brotos também podem estar associados a processos de eliminação de material genético nucleares amplificado (FERNANDES *et al.*, 2007).

De modo geral, diferentes substâncias químicas podem agir como inibidores de germinação e de crescimento. Este efeito seria resultado de uma interferência dos agentes químicos sobre a divisão celular, a permeabilidade das membranas e a ativação de enzimas, que influenciam, diretamente, a velocidade da divisão celular e, conseqüentemente, a emergência das radículas das plântulas (KUMAR *et al.*, 2022). Sendo assim, os resultados relacionados à germinação e ao desenvolvimento radicular, apresentados nesse estudo, demonstraram claros efeitos de fitotoxicidade, que podem ser comprovados tanto pelos ensaios da germinação e atraso no desenvolvimento das radículas, realizados com o bioindicador *L. sativa*, como pelo tipo de alteração cromossômica observada nos ensaios de citogenotoxicidade com *A. cepa*. Todos os tratamentos e diluições induziram uma diminuição significativa no comprimento das

raízes, exceto a diluição D5 do tratamento ET-F. Tal exceção pode estar associada à alta diluição da amostra (continha apenas 3,125% de efluente), somado com o efeito da filtração com o filtro PVDF, conforme já discutido anteriormente.

Pelos resultados obtidos no estudo, pode-se inferir que os efluentes induziram efeitos letais e subletais sobre as sementes e plântulas de alface, já que houve inibição significativa na taxa de germinação de sementes e no crescimento das raízes. Considerando a germinação das sementes e o crescimento subsequente como fases importantes no ciclo de desenvolvimento vegetal, os efeitos aqui demonstrados alertam para uma importante preocupação ambiental, quando ao lançamento desses efluentes no ambiente (RAHOUI; CHAOUI; FERJANI, 2008; PRIMO-MILLO; AGUSTI, 2020). Além disso, estes resultados corroboram outro estudo do grupo de pesquisa, que evidenciou efeitos de ecotoxicidade destes efluentes de tintura capilar sobre três diferentes bioindicadores animais (*Artemia salina*, *Daphnia similis* e *Danio rerio*) (GONÇALVES *et al.*, 2023). Isso demonstra que estes efluentes, gerados em grandes volumes e isentos de tratamento específico, colocam em risco a biota de ambientes aquáticos receptores desses efluentes.

5. CONCLUSÃO

Por meio do presente estudo pode-se concluir que os efluentes gerados em salão de beleza, após a utilização de tintura capilar (especificamente neste estudo da tintura castanha), associada ou não a xampu e condicionador, apresentam fitotoxicidade. Considerando os bioensaios com *L. sativa*, este efeito foi menos expressivo, quando as amostras foram filtradas com filtro de PVDF. Já para a *A. cepa*, foi comprovada ação genotóxica para ambos efluentes estudados, mesmo após filtração em PVDF. Pelos resultados obtidos com este último bioindicador, é possível atribuir um efeito aneugênico para os efluentes estudados, com destaque para o efluente completo (EC), devido à presença de compostos tensoativos.

Os resultados de toxicidade, obtidos neste e nos demais estudos citados na literatura científica, sobre efluentes contaminados com tinturas ou compostos envolvidos no tingimento capilar, indicam a necessidade de cautela, quanto ao uso desses cosméticos. Perante a alta utilização deste tipo de cosmético e a grande quantidade de salões de beleza distribuídos no mundo, este estudo, além de ser de interesse global, serve de alerta, sobre os impactos que os efluentes de salão de beleza podem promover à saúde humana e ao meio ambiente. As análises realizadas sugerem que o efeito isolado da tintura capilar pode ser intensificado por tensoativos provenientes dos xampus e condicionadores. Portanto, é crucial aprimorar a vigilância dos efluentes provenientes de salões de beleza, uma vez que os seus componentes têm o potencial

de comprometer a integridade das membranas celulares, interferir na divisão celular e causar modificações prejudiciais ao material genético de organismos eventualmente expostos a esses resíduos. Além disso, para reduzir os impactos gerados por esses resíduos, destaca-se a importância de promover o tratamento terciário, o qual pode ser realizado utilizando filtros específicos, diretamente nas instalações comerciais. Entretanto, sugere-se a realização de mais estudos que possam melhor avaliar a eficácia de processo de filtração dos efluentes de salões de beleza.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-FATAH, M. A. Sistemas de nanofiltração e aplicações em tratamento de águas residuais. **Revista de Engenharia Ain Shams**, v. 4, pág. 3077-3092, 2018.

AL-AMOUDI, A.; LOVITT, R. W. Fouling strategies and the cleaning system of NF membranes and factors affecting cleaning efficiency. **Journal of Membrane Science**, v. 303, n. 1–2, p. 4–28, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2007.06.002>.

AL-BALDAWI, I. A. *et al.* Aplicação de fitotecnologia no alívio de produtos farmacêuticos e de cuidados pessoais (PPCPs) em águas residuais: Fonte, impactos, tratamento, mecanismos, destino e análise SWOT. **Revista Produção Mais Limpa**, v. 319, p. 128584, 2021.

AMES, B. N.; KAMMEN, H. O.; YAMASAKI, E. Hair dyes are mutagenic: identification of a variety of mutagenic ingredients. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 72, n. 6, p. 2423-2427, 1975.

ARANTES, E. J.; AGENOR, P.; BUENO, A.; RÉCIO, L V. Ensaios indiretos de toxicidade de água residuária tratada de suinocultura com sementes de *Lactuca sativa* L. In: **Congresso ABES - Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental**, FENASAN 2018. São Paulo – SP. p. 1–8., 2017.

BESSEGATO, G.G. *et al.* Assessment of several advanced oxidation processes applied in the treatment of environmental concern constituents from a real hair dye wastewater. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 6, n. 2, p. 2794-2802, 2018.

BURKHARD, L. P.; ANKLEY, G. T. Identifying toxicants: NETAC's toxicity-based approach. **Environmental Science and Technology**, v. 23, n. 12, p. 1438–1443, 1989. <https://doi.org/10.1021/es00070a001>.

BOLT, H. M.; GOLKA, K. The debate on carcinogenicity of permanent hair dyes: new insights. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 37, n. 6, p. 521-536, 2007.

CAMPOS, C. F. *et al.* Assessment of the genotoxic potential of water courses impacted by wastewater treatment effluents using micronucleus assay in plants from the specie *Tradescantia*. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 82, n. 13, p. 752-759, 2019.

CARITÁ, R.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Comparison of the toxicogenetic potential of sewage sludges from different treatment processes ocusing agricultural use. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, p. 21475-21483, 2019.

CARVALHO, T. E. M.; FUNGARO, D. A.; IZIDORO, J. C. Adsorption of reactive orange 16 from aqueous solutions by synthesized zeolite. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 358-363, 2010.

CASTIGLIONE, Monica Ruffini et al. Root responses to different types of TiO₂ nanoparticles and bulk counterpart in plant model system *Vicia faba* L. **Environmental and experimental botany**, v. 130, p. 11-21, 2016.

CHARLES, J. *et al.* Evaluation of the phytotoxicity of polycontaminated industrial effluents using the lettuce plant (*Lactuca sativa*) as a bioindicator. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 2057-2064, 2011.

CHARLES, J.; SANCEY, B.; MORIN-CRINI, N.; BADOT, P. M.; DEGIORGI, F.; TRUNFIO, G.; CRINI, G. Evaluation of the phytotoxicity of polycontaminated industrial effluents using the lettuce plant (*Lactuca sativa*) as a bioindicator. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 7, p. 2057–2064, 2011.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.07.025>.

CHEN, Z. *et al.* Performance and kinetic model of degradation on treating pharmaceutical solvent wastewater at psychrophilic condition by a pilot-scale anaerobic membrane bioreactor. **Bioresource technology**, v. 269, p. 319-328, 2018.

CHIARI, B. G. M.; SALGADO, H. R; CORRÊA, M. A.; ISAAC, V. L. Estudo da segurança de cosméticos: presente e futuro. **Revista De Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, p. 323–330, 2012. Disponível em: <http://rcfba.fcfar.unesp.br/index.php/ojs/article/view/267/265>. Acesso em: 28 out. 2020.

CHOUCAIR, A.; EISENBERG, A. Interfacial solubilization of model amphiphilic molecules in block copolymer micelles. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 39, p. 11993-12000, 2003.

COIMBRA, S. C. *et al.* Safety assessment of nanomaterials in cosmetics: focus on dermal and hair dyes products. **Cosmetics**, v. 9, n. 4, p. 83, 2022.

CUCHIARA, C. C.; BORGES, C. S.; BOBROWSKI, V. L. C. Sensibilidade de sementes de hortaliças na avaliação da qualidade da água em bioensaios. **Revista Biotemas**, v. 25, n. 3, p. 19-27, 2012.

FERELLA, F. *et al.* Advanced treatment of industrial wastewater by membrane filtration and ozonization. **Desalination**, v. 313, p. 1-11, 2013.

FERNANDES, T.C.C; MAZZEO, D.E.C.; MARIN-MORALES, M.A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, p. 252–259, 2007.
<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2006.12.003>.

FISKESJÖ, Geirid. The Allium test—an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 197, n. 2, p. 243-260, 1988.

GERAS’KIN, S.; EVSEEVA, T.; OUDALOVA, A. Plants as a Tool for the Environmental Health Assessment. **Encyclopedia of Environmental Health**, p. 571–579, 2011. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52272-6.00612-7>.

GHUNMI, L. A. *et al.* Grey water treatment systems: A review. **Critical reviews in environmental science and technology**, v. 41, n. 7, p. 657-698, 2011.

GONÇALVES, L. C. *et al.* Toxicity of beauty salon effluents contaminated with hair dye on aquatic organisms. **Toxics**, v. 11, artigo 911, 2023. <https://doi.org/10.3390/toxics11110911>.

GONÇALVES, V. D.; COELHO, M. D. F. B.; CAMILI, E. C. Bioensaios em sementes de *Lactuca sativa* L. com extrato de folhas de *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc. **Revista Internacional de Ciências**, v. 6, n. 2, p. 160-170, 2016.

GORITO, A. M. *et al.* A review on the application of constructed wetlands for the removal of priority substances and contaminants of emerging concern listed in recently launched EU legislation. **Environmental Pollution**, v. 227, p. 428-443, 2017.

GRAMS, Y. Y. *et al.* Permeant lipophilicity and vehicle composition influence accumulation of dyes in hair follicles of human skin. **European journal of pharmaceutical sciences**, v. 18, n. 5, p. 329-336, 2003.

GRANT, W. F. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. **Mutation Research Regular Papers**, v. 310, n. 2, p. 175–185, 1994. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(94\)90112-0](https://doi.org/10.1016/0027-5107(94)90112-0).

GRYCZAK, M.; KILIPPER, J. T.; COSTA, P. D.; MACCARI, A. Sementes de *Lactuca sativa* como bioindicador de toxicidade em resíduos de construção civil. **Tecnologia e Ambiente**, v. 41, p. 233–242, 2018.

GUEDEZ, A. A.; PÜTTMANN, W. Occurrence and fate of TMDD in wastewater treatment plants in Germany. **Water Research**, v. 45, n. 16, p. 5313–5322, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.07.038>.

HE, L. *et al.* Hair dye ingredients and potential health risks from exposure to hair dyeing. **Chemical Research in Toxicology**, v. 35, n. 6, p. 901-915, 2022.

HU, J. *et al.* TiO₂ nanoparticle exposure on lettuce (*Lactuca sativa* L.): Dose-dependent deterioration of nutritional quality. **Environmental Science: Nano**, v. 7, n. 2, p. 501-513, 2020.

JÄDERLUND, A.; ZACKRISSON, O.; NILSSON, M.C. Effects of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) litter on seed germination and early seedling growth of four boreal tree species. **Journal of Chemical Ecology**, v. 22, p. 973-986, 1996.

JELINEK, A.; KLÖCKING, H.-P. In vitro toxicity of surfactants in U937 cells: cell membrane integrity and mitochondrial function. **Experimental and Toxicologic pathology**, v. 50, n. 4-6, p. 472-476, 1998.

KHOSROVYAN, A. *et al.* Tradescantia-Based Test Systems Can Be Used for the Evaluation of the Toxic Potential of Harmful Algal Blooms. **Water**, v. 15, n. 13, p. 2500, 2023.

KLANČNIK, K. *et al.* Use of a modified *Allium* test with nanoTiO₂. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 74, n. 1, p. 85-92, 2011.

KOMILIS, D. P.; TZIOUVARAS, I. S. A statistical analysis to assess the maturity and stability of six composts. **Waste Management**, v. 29, n. 5, p. 1504–1513, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2008.10.016>.

KRASTEVA, M. *et al.* Consumer allergy to oxidative hair coloring products: epidemiologic data in the literature. **DERM**, v. 20, n. 3, p. 123-141, 2009.

KUMAR, P. *et al.* Heavy metals: transport in plants and their physiological and toxicological effects. In: Plant metal and metalloid transporters. **Singapore: Springer Nature Singapore**, 2022. p. 23-54.

KUMARI, M. *et al.* Cytogenetic and genotoxic effects of zinc oxide nanoparticles on root cells of *Allium cepa*. **Journal of hazardous materials**, v. 190, n. 1-3, p. 613-621, 2011.

LAWARE, S.L.; RASKAR, S. Effect of titanium dioxide nanoparticles on hydrolytic and antioxidant enzymes during seed germination in onion. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences (IJCMAS)**, p. 749–760, 2014.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research**, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2009.06.002>.

LEUSCH, F. D. L.; KHAN, S. J.; LAINGAM, S.; PROCHAZKA, E.; FROSCIO, S.; TRINH, T.; CHAPMAN, H. F.; HUMPAGE, A. Assessment of the application of bioanalytical tools as surrogate measure of chemical contaminants in recycled water. **Water Research**, v. 49, p. 300–315, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.11.030>.

LEUSCH, F.; CHAPMAN, H. The role of toxicity testing in identifying toxic substances: A framework for identification of suspected toxic compounds in water. **Griffith University**, 2011.

LIU, S.; YANG, C.; XIE, W.; XIA, C.; FAN, P. The Effects of Cadmium on Germination and Seedling Growth of *Suaeda salsa*. **Procedia Environmental Sciences**, v. 16, p. 293–298, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2012.10.041>.

MAGDALENO, F. *et al.* Cartilage oligomeric matrix protein participates in the pathogenesis of liver fibrosis. **Journal of hepatology**, v. 65, n. 5, p. 963-971, 2016.

MAIFADI, S. *et al.* Analysis and pretreatment of beauty hair salon wastewater using a rapid granular multimedia filtration system. **Journal of Water Process Engineering**, v. 33, p. 101050, 2020.

MAZZEO, D. E. C.; FERNANDES, T. C. C.; MARIN-MORALES, M. A. Cellular damages in the *Allium cepa* test system, caused by BTEX mixture prior and after biodegradation process. **Chemosphere**, v. 85, n. 1, p. 13-18, 2011.

MEDEIROS, R. C. et al. Drinking water treatment by multistage filtration on a household scale: Efficiency and challenges. **Water Research**, v. 178, p. 115816, 2020.

MELO, E. D.; MOUNTEER, A. H.; LEÃO, L. H. S.; BAHIA, R. C. B.; CAMPOS, I. M. F. Toxicity identification evaluation of cosmetics industry wastewater. **Journal of Hazardous Materials**, v. 244–245, p. 329–334, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.11.051>.

MERLETTI, F.; HESELTINE, E.; SARACCI, R.; SIMONATO, L.; VAINIO, H.; WILBOURN, J. Target Organs for Carcinogenicity of Chemicals and Industrial Exposures in Humans: A Review of Results in the IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. **Cancer Research**, v. 44, n. 5, p. 2244–2250, 1984.

MISÍK, M.; MA, T. H.; NERSESYAN, A.; MONARCA, S.; KIM, J. K.; KNASMUELLER, S. Micronucleus assays with *Tradescantia* pollen tetrads: An update **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 215-221, 2011. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq080>.

MUSHTAQ, Y. K. Effect of nanoscale Fe₃O₄, TiO₂ and carbon particles on cucumber seed germination. **Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering**, v. 46, n. 14, p. 1732–1735, 2011. <https://doi.org/10.1080/10934529.2011.633403>.

NAFICY, G. *et al.* Adsorption on electrodes and micellization of some alkyl sulfates. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 85, n. 8, p. 1037-1042, 1981.

NAGARAJAN, R. Micellization, mixed micellization and solubilization: the role of interfacial interactions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 26, p. 205-264, 1986.

NANDINI, M. S. *et al.* Components in Hair Dye and Possible Health Concerns from Using Straighteners, Including Cancer Risks: Oncology-Influence of Hair Dyes for Cancer. **International Journal of Trends in OncoScience**, p. 44-52, 2023.

NKANSAH, M. A. *et al.* Characterization of beauty salon wastewater from Kwame Nkrumah University of Science and Technology, Kumasi, Ghana, and its surrounding communities. **Environmental Health Insights**, v. 10, p. EHI. S40360, 2016.

NOHYNEK, G. J. *et al.* Safety assessment of personal care products/cosmetics and their ingredients. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 243, n. 2, p. 239-259, 2010.

NOVACK, A.; RICIERI MANENTI, D.; ESPINOZA-QUIÑONES, F. Estudo da Toxicidade em Efluentes de Indústrias de Tintas Tratado por Eletrofloculação. In: *Anais do III Encontro Paranaense de Engenharia e Ciência – 28 a 30 de Outubro de 2013 – Toledo–PR* Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Aline-Novack/publication/335129092_Estudo_da_Toxicidade_em_Efluentes_de_Industrias_de_Tintas_Tratado_por_Eletrofloculacao/links/5d66a7a9a6fdccf343fb6b1b/Estudo-da-Toxicidade-

[em-Efluentes-de-Industrias-de-Tintas-Tratado-por-Eletrofloculacao.pdf](#). Acesso em 04 set. 2023.

OBE G.; BEEK B. *Premature Chromosome Condensation in Micronuclei*. New York: **Academic Press**, 1982.

OLIVEIRA, R. A. G.; ZANONIB, T. B.; BESSEGATO A.; GUILHERME, G.; OLIVEIRA, D. P.; UMBUZEIRO, G.A.; ZANONI, M.V. B. The chemistry and toxicity of hair dyes. **Química Nova**, v. 37, n. 6, p. 1037-1046, 2014. <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20140143>

PAKRASHI, S. *et al.* *In vivo* genotoxicity assessment of titanium dioxide nanoparticles by *Allium cepa* root tip assay at high exposure concentrations. **PloS one**, v. 9, n. 2, p. e87789, 2014.

PALMIERI, M. J. *et al.* Cytogenotoxic effects of Spent Pot Liner (SPL) and its main components on human leukocytes and meristematic cells of *Allium cepa*. **Water, Air & Soil Pollution**, v. 227, p.1-10, 2016.

PAMPLONA-SILVA, M. T.; GONÇALVES, L. C.; MARIN-MORALES, M. A. Genetic toxicity of water contaminated by microcystins collected during a cyanobacteria bloom. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 166, p. 223–230, 2018.

PANIGRAHI, K. K. *et al.* Genotoxicity and DNA Damage Induced by Herbicides and Toxins in Plants. **Induced Genotoxicity and Oxidative Stress in Plants**, p. 29-63, 2021.

PAVITHRA, K. G. *et al.* Removal of colorants from wastewater: A review on sources and treatment strategies. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 75, p. 1-19, 2019.

PERDIGÓN-MELÓN, J. A.; CARBAJO, J. B.; PETRE, A. L.; ROSAL, R.; GARCÍA-CALVO, E. Coagulation-Fenton coupled treatment for ecotoxicity reduction in highly polluted industrial wastewater. **Journal of Hazardous Materials**, v. 181, n. 1–3, p. 127–132, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.04.104>.

PLIEGO, G. *et al.* Treatment of highly polluted hazardous industrial wastewaters by combined coagulation–adsorption and high-temperature Fenton oxidation. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 51, n. 7, p. 2888-2896, 2012.

PRIAC, A.; BADOT, P. M.; CRINI, G. Treated wastewater phytotoxicity assessment using *Lactuca sativa*: Focus on germination and root elongation test parameters. **Comptes Rendus Biologies**, v. 340, p. 188–194, 2017.

PRIMO-MILLO, E.; AGUSTÍ, M. Vegetative growth. In: *The Genus Citrus*. **Woodhead Publishing**, 2020. p. 193-217.

PUYOL, D.; MONSALVO, V. M.; MOHEDANO, A. F.; SANZ, J. L.; RODRIGUEZ, J. J. Cosmetic wastewater treatment by upflow anaerobic sludge blanket reactor. **Journal of Hazardous Materials**, v. 185, n. 2–3, p. 1059–1065, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.10.014>.

RAHOUI, S.; CHAOUI, A.; FERJANI, E. E. Differential sensitivity to cadmium in germinating seeds of three cultivars of faba bean (*Vicia faba* L.). **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 30, n. 4, p. 451–456, 2008. <https://doi.org/10.1007/s11738-008-0142-x>.

REHMAN, A. *et al.* Application of cationic-nonionic surfactant based nanostructured dye carriers: Mixed micellar solubilization. **Journal of Molecular Liquids**, v. 326, p. 115345, 2021.

REHMAN, S. *et al.* Health risks of synthetic hair dyes: advantages of natural hair dying agents in unani medicine. **Traditional and Integrative Medicine**, p. 37-46, 2019.

RENDÓN, M. Y.; DOS SANTOS SCHOLZ, M. B.; BRAGAGNOLO, N. Physical characteristics of the paper filter and low cafestol content filter coffee brews. **Food research international**, v. 108, p. 280-285, 2018.

RODRIGUES, J. C.; OLIVEIRA, J. T.; PIRES, M. J. R.; BERNARDES, A. M.; HEBERLE, A. Estudo da oxidação fotoquímica em efluentes líquidos gerados em salões de beleza. In: *Simpósio Internacional de Qualidade Ambiental*, 2016. p. 1–11.

RODRIGUEZ-NARVAEZ, O. M. *et al.* Treatment technologies for emerging contaminants in water: A review. **Chemical Engineering Journal**, v. 323, p. 361-380, 2017.

SANTOS, R. N.; CRUZ, F.; COSTA, M. C. D. Reações adversas ao uso dos cosméticos em alunos do campus Canadá do centro universitário Filadélfia (UNIFIL) em Londrina. **Revista Terra & Cultura - Cadernos de Ensino e Pesquisa**, v. 33, p. 21–33, 2018.

SANTOS, R. *et al.* Genotoxicity of titanium dioxide nanoparticles and triggering of defense mechanisms in *Allium cepa*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 42, p. 425-435, 2019.

SARGSYAN, L.; VILL, V.; HIPPE, T. Investigations of vegetable tannins as hair dyes and their interactions with pre-bleached hair fibres. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 42, n. 4, p. 320-327, 2020.

SARKAR, M.; PODDAR, S. Studies on the interaction of surfactants with cationic dye by absorption spectroscopy. **Journal of colloid and interface science**, v. 221, n. 2, p. 181-185, 2000.

SERRANO-GARCÍA, L., MONTEIRO-MONTOYA, R. Micronuclei and heterochromatid buds are the results of related genotoxic events. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. v. 38, p. 38– 45, 2001. <https://doi.org/10.1002/em.1048>.

SCHOBER, P.; BOER, C.; SCHWARTE, L A. Correlation coefficients: appropriate use and interpretation. **Anesthesia & Analgesia**, v. 126, n. 5, p. 1763-1768, 2018.

SHAMINA, N. V.; SILKOVA, O. G.; SERIUKOVA, E. G. Monopolar spindles in meiosis of intergeneric cereal hybrids. **Cell biology international**, v. 27, n. 8, p. 657-664, 2003.

SOBRERO, M. C.; RONCO, A. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga *Lactuca sativa* L. **Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas**:

estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. México: Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, p. 63-70, 2004.

SOMMAGGIO, L. R. D. *et al.* Ecotoxicological and microbiological assessment of sewage sludge associated with sugarcane bagasse. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 147, p. 550–557, 2018.

SONG, H-Y. *et al.* Toxicidade celular de surfactantes utilizados como aditivos herbicidas. **Journal of Korean Medical Science**, v. 1, p. 3-9, 2011.

SOUZA, C. P.; GUEDES, T. A.; FONTANETTI, C. S. Evaluation of herbicides action on plant bioindicators by genetic biomarkers: a review. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 188, n. 12, p. 1–12, 2016. <https://doi.org/10.1007/s10661-016-5702-8>.

SREBERNICH, S. M. *et al.* Influência do tipo de filtro no teor de cafeína de bebidas de café. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 68, n. 1, p. 29-33, 2009.

STOPPER, H.; MÜLLER, S. O. Micronuclei as a biological endpoint for genotoxicity: a minireview. **Toxicology in vitro**, v. 11, n. 5, p. 661-667, 1997.

SUJA, P. S. *et al.* Electrospun Nanofibrous Membranes for Water Purification. **Polymer Reviews**, v. 57, n. 3, p. 467–504, 2017.

TAJALLI, H. *et al.* Effects of surfactants on the molecular aggregation of rhodamine dyes in aqueous solutions. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 72, n. 4, p. 697-702, 2009.

TAMADA, I. S.; MONTAGNOLLI, R. N.; LOPES, P. R. M.; BIDOIA, E. D. Toxicological evaluation of vegetable oils and biodiesel in soil during the biodegradation process. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1576–1581, 2012. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000400042>.

TARPANI, R. R. Z.; AZAPAGIC, A. Life cycle environmental impacts of advanced wastewater treatment techniques for removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs). **Journal of Environmental Management**, v. 215, p. 258-272, 2018.

TENA, C. *et al.* Phytotoxic Activity of p-Cresol, 2-Phenylethanol and 3-Phenyl-1-Propanol, Phenolic Compounds Present in *Cistus ladanifer* L. **Plants**, v. 10, n. 6, p. 1136, 2021.

THAME, A. C. M. **Projeto de lei no 1.370 de 2011. Proíbe a utilização de dióxido de titânio em alimentos e cosméticos; tendo parecer da Comissão de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável, pela aprovação deste e da emenda apresentada.** 2011. Disponível em: https://www.camara.leg.br/proposicoesWeb/prop_mostrarintegra;jsessionid=5B474641772E6038E90DF6A60593198C.node1?codteor=1040014&filename=Avulso+-PL+1370/2011>. Acesso em: 1 nov. 2020.

TOWNS, A. A review of developments in industrial hair colorant actives for oxidative dyes. **Coloration Technology**, v. 137, n. 4, p. 301-335, 2021.

UTER, W.; LEPOITTEVIN, J-P.; LIDÉN, C. Contact allergy to hair dyes. In: MAHLER, V.; LEPOITTEVIN, J-P.; FROSCH, P. **Contact Dermatitis**. Sixth. Cham: Springer, p. 877–89. 2021.

USEPA. **Generalized methodology for conducting industrial toxicity reduction evaluations**. United States Federal Register, EPA/600/2-88/070. Washington: United States Environmental Protection Agency, 1989.

VENTURA-CAMARGO, B. de C.; MALTEMPI, P. P ; MARIN-MORALES, M. A. The use of the cytogenetic to identify mechanisms of action of an azo dye in *Allium cepa* meristematic cells. **J Environ Anal Toxicol**, v. 1, n. 3, p. 1-12, 2011.

VOGEL, T. A. *et al.* Two decades of p-phenylenediamine and toluene-2, 5-diamine patch testing—focus on co-sensitizations in the European baseline series and cross-reactions with chemically related substances. **Contact Dermatitis**, v. 76, n. 2, p. 81-88, 2017.

WANG, W.; KETURI, P. H. Comparative seed germination tests using ten plant species for toxicity assessment of a metal engraving effluent sample. **Water, Air, and Soil Pollution**, [S. l.], v. 52, n. 3–4, p. 369–376, 1990. <https://doi.org/10.1007/BF00229444>.

YOU, H. *et al.* Role of surfactants in the interaction of dye molecules in natural DNA polymers. **Langmuir**, v. 25, n. 19, p. 11698-11702, 2009.

ZHANG, Y. *et al.* Personal use of permanent hair dyes and cancer risk and mortality in US women: prospective cohort study. **BMJ**, v. 370, 2020.

ZORTEA, A. M.; FREIBERGER, V. L.; FUZINATTO, C. F. Avaliação toxicológica de efluente de lavanderia hospitalar: toxicidade aguda e crônica com *Daphnia magna*. **Revinter**, p. 73–85, 2018. Disponível em: <http://autores.revistarevinter.com.br/index.php?journal=toxicologia&page=article&op=view&path%5B%5D=345&path%5B%5D=559> . Acesso em: 28 out. 2020.

ARTIGO 3. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE RESIDUAL DE EFLUENTES DE SALÃO DE BELEZA, SOB CÉLULAS HUMANAS

Letícia Cristina Gonçalves¹, Matheus Mantuanelli Roberto^{2*}, Adriana Fabiana Côrrea da Silva¹, Maria Aparecida Marin-Morales^{1*}

¹ Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Av. 24-A, 1515, 13.506-900, Rio Claro, SP, Brasil.

² Centro Universitário da Fundação Hermínio Ometo (FHO), Av. Dr. Maximiliano Baruto, 500, 13.607-339, Araras, SP, Brasil.

*Autor correspondente

Resumo

Os efluentes gerados no processo de tingimento capilar apresentam constituição complexa, com compostos químicos de diferentes toxicidades. Embora seja reconhecida a toxicidade dos corantes capilares para a saúde humana, ainda são escassos estudos que abordem a toxicidade dos efluentes dessas atividades humanas. O objetivo deste estudo foi avaliar dois efluentes de salões de beleza, pós tingimento capilar com a coloração castanha (derivados de lavagem da tintura com água + xampus + condicionadores - EC; e de lavagem da tintura só com água, sem os tensoativos - ET). Os ensaios foram desenvolvidos com células da linhagem de hepatoma humano (HepG2/C3A). A citotoxicidade foi testada pelos testes do MTT e do Azul de Tripán, considerando como padrão a viabilidade celular >80,0%. A genotoxicidade e mutagenicidade foram avaliadas pelo ensaio do cometa e pelo teste do micronúcleo (MN) com bloqueio de citocinese, respectivamente. As células foram expostas por 4 h a diferentes diluições dos dois efluentes testados [100,0% (1); 50,0% (2); 25,0% (3); 12,5% (4); 6,25% (5); 3,125% (6)], na proporção de 20% de amostra e 80% de meio de cultura celular. As diluições EC1, ET1, ET2 e ET3 apresentaram citotoxicidade pelo ensaio do MTT e do Azul de Tripán, enquanto que a diluição EC2 foi tóxica apenas no ensaio do MTT. Esses resultados indicam que os efluentes citados comprometeram a integridade e permeabilidade da membrana citoplasmática, bem como a atividade mitocondrial. As diluições não tóxicas (4, 5 e 6) foram utilizadas no desenvolvimento dos ensaios do cometa e do MN. No estudo, foi observado que todas as amostras testadas foram genotóxicas (ensaio do cometa), mas nenhuma amostra demonstrou potencial mutagênico (ensaio do MN). Por esses resultados, pode-se inferir que concentrações residuais dos efluentes causam danos primários ao DNA, porém não letais e passíveis de reparos. Concomitante à análise do teste do MN, foi verificada a diminuição no índice de proliferação pós-bloqueio da citocinese (IPBC) e no índice de replicação celular (IR) das células submetidas aos efluentes, sugerindo interferência e atraso no ciclo celular. Esses resultados evidenciam que as tinturas capilares, mesmo em concentrações residuais, podem comprometer a qualidade ambiental e até mesmo prejudicar a saúde humana, evidenciando a necessidade de realização de tratamentos prévios ao descarte dos salões.

Palavras-chaves: Linhagem HepG2; viabilidade celular; atividade mitocondrial; ensaio do cometa; teste do micronúcleo.

1. INTRODUÇÃO

O tingimento capilar é uma técnica milenar, que ainda é amplamente utilizada para modificar ou restaurar a cor dos cabelos (HEMIELEWSKI; SILVEIRA, 2007; ZANOTI, 2014). O processo de coloração utilizado no tingimento capilar envolve diversos aditivos químicos e reações oxidativas complexas, que acontecem no interior da fibra capilar (OLIVEIRA *et al.*, 2014; HANUMANTHAYYA, 2018).

Os efluentes gerados em salões de beleza apresentam composição química dependente do processo de tingimento capilar utilizado. De maneira geral, estes efluentes são compostos de resíduos de corantes, precursores, acopladores e aditivos cosméticos, bem como de metais como chumbo, cádmio, cromo e arsênio (NKANSAH *et al.*, 2016; MELO *et al.*, 2019; PAVITHRA *et al.*, 2019; MAIFADI *et al.*, 2020), água oxigenada e surfactantes/tensoativos usados na lavagem dos fios, para retirada do excesso de tintura (OLIVEIRA *et al.*, 2014, MAIFADI *et al.*, 2020). A demanda de água em salões de beleza é alta, principalmente devido às necessidades de lavagens capilares repetidas, para a total retirada dos produtos usados nos procedimentos (BRILLAS; MARTÍNEZHUITLE, 2015). Essa mistura complexa pode elevar diversos parâmetros físico-químicos, como o de matéria orgânica, turbidez e teor de sólidos suspensos e dissolvidos (SEBRAE, 2007; NKANSAH *et al.*, 2016; MELO *et al.*, 2019; LIU, 2020), que levam à alteração das características da água dos corpos hídricos receptores (CLAXTON; HOUK; HUGHES, 1998; GIRLING *et al.*, 2000; XU *et al.*, 2020). Contudo, de acordo com Nkansah *et al.* (2016), embora haja uma alta produção desses efluentes, ainda são escassos os estudos que avaliam os seus riscos para o meio ambiente e à saúde humana.

Os possíveis efeitos tóxicos da exposição humana a tinturas capilares vêm sendo reavaliados por diversos autores (LOWRY *et al.*, 1980; CERNIGLIA *et al.*, 1986; ANDREW *et al.*, 2004; NOHYNEK *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2014; KIM *et al.*, 2016; LLANOS *et al.*, 2017; HADKHALE *et al.*, 2017; QIN *et al.*, 2019). Os efeitos adversos mais frequentemente associados a estes compostos são reações sistêmicas por inalação, contato oral ou absorção percutânea, como irritações cutâneas temporárias e dermatites, alergias, sensibilizações, além de ação carcinogênica (CHORILLI *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2014; SOUSA *et al.*, 2020).

Cunico *et al.* (2011) destacam que produtos utilizados em salões de beleza podem desencadear efeitos prejudiciais à saúde, especialmente para os profissionais, por se exporem de forma contínua e por longos períodos de tempo a esses cosméticos. Estes riscos são

desconhecidos pela maioria deles, o que é ainda agravado pela diversidade de produtos e composições novas que entram, frequentemente, no mercado da cosmética capilar (OLIVEIRA *et al.*, 2014; NKANSAH *et al.*, 2016; MAIFADI *et al.*, 2020; SOUSA *et al.*, 2020).

Brausch e Rand (2011), em uma revisão sobre a presença e ecotoxicidade de produtos de cuidados pessoais (PCPs) no meio aquático, destacam que, apesar da maior frequência e concentrações mais elevadas de PCPs no ambiente aquático, em comparação com produtos farmacêuticos, há uma lacuna significativa no conhecimento referente à ecotoxicidade desses produtos. Os autores ainda citam que os efluentes contendo PCPs são liberados de forma contínua e, apesar de possuírem características persistentes e biologicamente ativas, recebem pouca atenção em termos de sua ecotoxicidade, quando comparados aos produtos farmacêuticos. De acordo com os mesmos autores, a maioria dos estudos investiga apenas compostos individuais, deixando de abordar os efeitos sinérgicos dos contaminantes nos efluentes. Alguns pesquisadores afirmam que os estudos realizados até agora com os PCPs não refletem, de maneira precisa e relevante, o cenário real de sua ecotoxicidade (MELO; MOUNTEER, 2019; MONTES-GRAJALES *et al.*, 2017).

A falta de estudos ecotoxicológicos com esses produtos leva também a ausência de dados sobre a persistência e biotransformação dos componentes das tinturas capilares e, conseqüentemente, do monitoramento dos subprodutos destes cosméticos nas águas residuais de salões de beleza (OLIVEIRA *et al.*, 2014; MACHADO, 2017). Diante deste cenário, fica evidente a necessidade de se caracterizar esses compostos, urgentemente, quanto à sua toxicidade e periculosidade ambiental. Nesta caracterização deve-se considerar as propriedades químicas e reativas desses resíduos (ESCHER; FENNER, 2011; PORTIS *et al.*, 2016). Portanto, é crucial preencher essas lacunas no conhecimento, para garantir uma compreensão abrangente e eficaz dos possíveis impactos ambientais associados às tinturas capilares.

A Associação Nacional dos Distribuidores de Artigos de Beleza (ANABEL/Brasil) e a Associação Brasileira dos Salões de Beleza (ABSB) informam um crescimento substancial de salões de beleza no Brasil. Estimulado pela era do culto ao corpo e a ideologia do bem-estar e da felicidade, no mundo há um real crescimento no número de salões de beleza, independentemente do nível econômico do país (OURAHMOUNE; JURDI, 2020). Em geral, as estações de tratamento de efluentes (ETE) são projetadas para reduzir a carga de poluentes convencionais, como matéria orgânica e sólidos suspensos, não visando a eliminação do potencial tóxico dos efluentes (EGGEN *et al.*, 2014; MELO; MOUNTEER, 2019). Portanto, a persistência de substâncias tóxicas nesses efluentes pode acarretar uma série de problemas ambientais, como a acumulação de corantes, desestabilização do equilíbrio dos ecossistemas e

indução de danos à saúde humana (CARVALHO; FUNGARO; IZIDORO, 2010; NKANSAH *et al.*, 2016; MAIFADI *et al.*; 2020).

Muitas pesquisas vêm sendo realizadas com o objetivo de identificar e descrever as reações adversas de compostos químicos sobre os organismos vivos; dentre elas os ensaios realizados com linhagens celulares. Esses ensaios, por serem sensíveis, de rápida execução e conferirem resultados fidedignos, permitem elucidar os mecanismos de ação dos contaminantes sobre as células (ROGERO *et al.*, 2003).

Neste estudo, foram desenvolvidos ensaios de toxicidade com a linhagem celular de hepatocarcinoma humano (HepG2/C3A), com o objetivo de avaliar a citotoxicidade, genotoxicidade e o potencial mutagênico, de dois tipos de efluentes gerados em salões de beleza, após tingimento capilar. Um efluente foi constituído só da água de lavagem e resíduos da tinta e o outro, além desse resíduo descrito, continha também xampu e condicionador.

Esta pesquisa fornece subsídios para o melhor conhecimento do potencial ecotoxicogenético de efluentes de salões de beleza, obtidos pós tingimento capilar, para estimar os impactos das tinturas para o ambiente aquático; alertar a população sobre os riscos desses compostos para a saúde humana e fornecer informações que possam auxiliar os órgãos gestores na formulação de diretrizes para o tratamento adequado desse tipo de resíduo (LIU, 2020; VIEIRA *et al.*, 2023). Diante do contingente humano envolvido com exposições às tinturas capilares, direta ou indiretamente, e do potencial poluidor dos efluentes de salões de beleza, torna-se necessário definir, urgentemente, protocolos adequados para gerenciamento dos resíduos desses estabelecimentos, visando mitigar impactos nos corpos hídricos receptores desses efluentes e alertar a população sobre os perigos desses compostos para a saúde humana (LIU, 2020; VIEIRA *et al.*, 2023).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Obtenção, armazenamento e preparação das amostras de efluentes

Foram coletados, em salões de beleza da cidade de Rio Claro (Estado de São Paulo-Brasil), dois tipos de efluentes obtidos após processo de tingimento capilar: efluente da lavagem dos cabelos, feita somente com água (efluente com tinta - ET) e efluente da lavagem dos cabelos, feita com água, xampus e condicionadores (efluente completo - EC). Foi utilizada na coloração capilar a tinta de tonalidade castanha. Após a coleta, os efluentes foram acondicionados, separadamente, em recipientes plásticos, identificados e armazenados em freezer (-20°C), para evitar uma possível degradação ou a alteração de suas propriedades.

Para uso nos experimentos, amostras dos efluentes foram mantidas em temperatura de 37 °C, com pH corrigido para 7,2. Com essas amostras, foram preparadas diferentes diluições (1=100,0%; 2=50,0%; 3=25,0%; 4=12,5%; 5=6,25%; 6=3,125%), com água de osmose reversa, que foram esterilizadas em filtro de membrana de poliestersulfona (33 mm de diâmetro e 0,22 µm de porosidade, Prolab®, São Paulo, Brasil).

As células usadas nos experimentos foram expostas a uma solução de 20% das amostras (diluições do ET ou EC) e 80% de meio de cultura. Essa diluição foi escolhida com base nos dados de Reifferscheid *et al.* (2008), que afirmam que a alteração da osmolaridade causada pela adição de 20% de amostra não induz efeitos citotóxicos e genotóxicos nas células expostas. Com isto, as amostras avaliadas representam as concentrações de 1=20%; 2= 10%; 3=5%; 4=2,5%; 5=1,25% e 6=0,625% do efluente.

2.2 Cultivo das células HepG2/C3A

Os bioensaios *in vitro* foram realizados com células de hepatocarcinoma humano HepG2/C3A (ATCC®, CRL-10741), linhagem celular obtida no Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, Brasil). Essas células correspondem a um subclone patentado da linhagem de hepatócitos humanos HepG2/C3A (ATCC®, HB-8065). As células foram cultivadas em meio DMEM (Meio de Eagle modificado por Dulbecco – Cultilab, Campinas, Brasil), suplementado com 10% de soro bovino fetal, 1,0 mL de solução antibiótico-antimicótico (penicilina 10.000 UI/ mL/ estreptomicina 10 mg/mL, Cultilab, Campinas, Brasil) e 3g de glicose (Merck®, CAS 50-99-7). O cultivo celular se deu em frascos ventilados de 25 cm², mantidos em temperatura controlada de 37 °C, em estufa de CO₂ a 5,0% e umidade de 80%. Quando a cultura celular atingiu uma confluência equivalente a 80%, as células foram utilizadas nos ensaios de citotoxicidade, genotoxicidade e potencial de mutagenicidade.

2.3 Tratamentos

Os ensaios foram realizados com os dois tipos de efluente. As células HepG2/C3A foram expostas as diferentes diluições, conforme citado no item 2.1. Para cada tipo de teste realizado (citotoxicidade, genotoxicidade ou mutagenicidade) foram utilizados o controle negativo (CN) e positivo (CP) adequados, conforme descrição detalhada apresentada a seguir.

2.4 Ensaios de citotoxicidade

2.4.1 Viabilidade celular (Azul de Tripán)

O teste de viabilidade celular com o corante Azul de Tripán (0,4%, Gibco®, CAS 72-57-1) foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Barile (1994), com algumas modificações. Foram utilizadas placas plásticas estéreis de seis poços, fundo chato, estéril livre de RNase e DNase, específicas para cultivo celular, sendo que em cada poço foram semeadas 5×10^5 células em 2,0 mL de meio com soro. Em seguida, as placas foram incubadas nas mesmas condições de cultivo citadas anteriormente, por um período de 24 h, para estabilização. Decorridas as 24 h, o meio de cultura dos poços foi removido, para se dar início à exposição. Em seguida, de acordo com o grupo avaliado, foram adicionados 400 µL de amostra, individualmente, em cada poço. A amostra bruta e as cinco diluições de cada efluente (ET1 a ET6 / EC1 a EC6) foram avaliadas seguindo a proporção descrita no item 2.1 (20% de amostra 80% de meio de cultura). Para o CN foi utilizado apenas meio de cultura estéril sem soro e para o CP, solução de Triton X-100 (1%) (Vetec®, CAS 9036-19-5) em meio de cultura sem soro. A exposição foi realizada em triplicata, por 4 h.

Decorrido este tempo, as células foram removidas do fundo dos poços pela adição de 200 µL de tripsina 0,5% (Sigma Aldrich®, T4049), mantendo-se a placa em estufa de CO₂, a 37 °C, por 5 min. Em seguida, a tripsina foi inativada com 600 µL de meio com soro e a suspensão celular foi transferida dos poços para microtubos correspondentes de cada tratamento. Em seguida, em outro microtubo, foram misturados 20 µL de Azul de Tripán com 20 µL da suspensão celular homogeneizada. Foram transferidos 40 µL desta mistura para a câmara de Neubauer, para a contagem, em microscopia de luz (objetiva de 40X), das células vivas (não coradas) e mortas (azuis). Os resultados da avaliação da viabilidade celular foram transformados em porcentagem e comparados com os resultados CN, sendo consideradas concentrações viáveis aquelas com valores de viabilidade maiores ou iguais a 80%.

2.4.2 Teste do MTT

O teste do MTT (*Thiazolyl blue tetrazolium bromide* - CAS 298-93-1, Sigma Aldrich®) foi desenvolvido de acordo com o protocolo estabelecido por Mosmann (1983) com algumas modificações. Foram semeadas $2,34 \times 10^4$ células em cada poço de uma placa de 96 poços, em um volume total de 100 µL de meio de cultura com soro. Nos poços referentes ao branco foi adicionado apenas o meio de cultura. As placas foram incubadas por um período de 24 h, em estufa a 37 °C, para ocorrer a estabilização e adesão das células.

Após esse período, cada poço teve seu conteúdo retirado e substituído por 200 µL de amostra. A amostra bruta e as cinco diluições de cada efluente (ET1 a ET6 / EC1 a EC6) foram avaliadas, seguindo a proporção descrita no item 2.1 (20% de amostra: 80% de meio de cultura), sendo que cada tratamento ocupou uma fileira de poços da placa. Nos poços destinados ao CN, foram adicionados 200 µL de meio de cultura sem soro, enquanto nos poços destinados ao CP foi adicionado o mesmo volume de solução de Triton X-100 (1%) (Vetec®, CAS 9036-19-5). Cada placa representou dez réplicas de cada tratamento. A exposição foi realizada em estufa, por 24 h, nas mesmas condições de cultivo das células.

Decorrido este tempo, os tratamentos foram retirados dos poços e foram adicionados 150 µL de solução de MTT (0,001 mg/mL). A placa foi incubada por 4 horas em estufa a 37 °C. Após este tempo, a solução de MTT foi descartada e 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO - Êxodo®, CAS 6768-5) foram adicionados em cada poço. A absorbância de cada poço foi lida em um leitor de microplacas Infinite 200 PRO (TECAN®, Suíça), a 540 nm.

2.5 Ensaios de genotoxicidade e mutagenicidade

2.5.1 Diluições

Para os ensaios de genotoxicidade e mutagenicidade, as células HepG2/C3A foram expostas apenas às concentrações que não apresentaram citotoxicidade pelos testes do Azul de Tripán e do MTT ($\geq 80\%$ de viabilidade), ou seja, ET4, ET5, ET6, EC4, EC5, EC6. As exposições foram realizadas em frascos de cultura de 25 cm², nos quais foram adicionados 2,0 mL da amostra e 8,0 mL de meio de cultura, totalizando 10,0 mL de volume final, e mantendo a mesma proporção dos testes de citotoxicidade.

2.5.2 Ensaio do Cometa

O ensaio do cometa foi realizado para avaliar o potencial genotóxico dos efluentes, conforme o protocolo estabelecido por Singh *et al.* (1988), Tice *et al.* (2000), com algumas modificações. Inicialmente, foram semeadas $5,0 \times 10^5$ células por frasco de cultura, sendo mantidos por 24 h, a 37 °C, nas mesmas condições do cultivo, para permitir a estabilização.

Na sequência, o meio de cultura foi substituído pelas diferentes amostras, para um período de exposição de 4 h. O CN foi realizado com a solução de 5 µL/mL de PBS em meio de cultura e o CP com a solução de 10 mM de metilmetanosulfonato (MMS, Sigma Aldrich®, CAS 66-27-3). Após a exposição das células, as suspensões celulares obtidas foram submetidas

ao ensaio de citotoxicidade com o Azul de Tripan. Os testes que exibiram viabilidade celular superior a 80%, foram usados no ensaio do cometa.

Foram misturados, em diferentes criotubos, 20 μ L da suspensão celular com 20 μ L de Azul de Tripan, de acordo com a metodologia descrita por Salvadori (2003). Para a obtenção da viabilidade celular, foram quantificadas 100 células por tratamento. As células não coradas foram consideradas vivas e as azuis consideradas mortas. Confirmada a viabilidade celular igual ou superior a 80%, 20 μ L da suspensão celular foram misturados com 120 μ L de agarose de baixo ponto de fusão (37 °C). Estas misturas foram dispostas em lâminas previamente revestidas com agarose normal, sendo imediatamente recobertas com lamínula. Para a solidificação da agarose e remoção das lamínulas, as lâminas foram refrigeradas a 4 °C, por 20 min. Depois da remoção das lamínulas, as lâminas foram submetidas à solução de lise (1 mL de Triton X-100, 10 mL de DMSO e 89 mL de solução de lise estoque - NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM e ~8 g de NaOH sólido para 1 L; pH 10,0), a 4 °C por, no mínimo, 1 h. Decorrido esse tempo, as lâminas foram transferidas para uma cuba de eletroforese e recobertas com tampão alcalino (NaOH 300 mM + EDTA 1 mM; pH > 13,0) a 4 °C, por 20 min, para a deselcoideização do DNA. Em seguida, as lâminas foram submetidas à eletroforese a 39 V (~0,8 V/cm) e 300 mA, por 20 min. Logo após a eletroforese, as lâminas foram retiradas da cuba, neutralizadas em tampão Tris (0,4M cloridrato de Trizma; pH 7,5), fixadas em etanol absoluto, por 10 min, e armazenadas a 4 °C, até o momento da análise.

Para a análise, cada lâmina recebeu 50 μ L de GelRed® (15 μ L de GelRed® 10.000X em água, 5 mL de NaCl a 1 M, e 45 mL de água destilada) e nova lamínula. As análises foram realizadas em microscópio de epifluorescência (DM400B, Leica), utilizando-se o filtro B 34 (excitação: λ = 420 nm – 490 nm, barreira: λ = 520 nm) e a objetiva de 40X. Foram analisados, aleatoriamente, 300 nucleóides, sem sobreposição, por tratamento (i.e. 50 nucleóides/lâmina, 2 lâminas/frasco, 3 frascos/tratamento). Os danos no DNA foram determinados pela intensidade da cauda do cometa (% de DNA), observados no software Comet Assay IV (Instem, UK).

2.5.3 Teste do micronúcleo (MN)

A avaliação dos possíveis efeitos mutagênicos dos efluentes foi realizada por meio do teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese, seguindo o protocolo descrito por Natarajan e Darroudi (1991), com algumas modificações. Para o ensaio, foram semeadas 1×10^6 células em frascos de cultura de 25 cm², mantidos por 24 h nas condições de cultivo, para a estabilização celular. Em seguida, o meio de cultura foi removido e as células submetidas aos tratamentos, por mais 4 h. O CN foi realizado com a solução de 5 μ L/mL de PBS em meio de

cultura e o CP com a solução de 10 mM de metilmetanosulfonato (MMS, Sigma Aldrich®, CAS 66-27-3). Encerrado este período, os tratamentos foram removidos, as culturas lavadas com PBS e submetidas a uma nova solução de 50 µL de citocalasina B (300 µg/mL – Cayman Chemical Company, 14930-96-2) e 4.950 µL de meio de cultura. Os frascos permaneceram incubados por mais 30 h, para a obtenção de células binucleadas.

Após esse período, as células foram coletadas, tratadas com solução hipertônica de citrato de sódio (1 %) e fixadas usando Carnoy (etanol:ácido acético, 3:1 v/v). Para o preparo das lâminas, as células foram centrifugadas e, em seguida, homogeneizadas em 0,5 mL de Carnoy. Algumas gotas da suspensão celular foram dispostas sobre lâminas úmidas, a 4 °C. Após a secagem em temperatura ambiente, as lâminas foram coradas com solução de Giemsa 5%, por 8 minutos.

As análises foram realizadas em microscópio de luz (Leica® DM500, objetiva de 100X). Foram contabilizadas 6.000 células binucleadas por tratamento (1.000 células/lâmina, 2 lâminas/frasco, 3 frascos/tratamento). Dentre o total de células binucleadas analisadas, foram contabilizadas, separadamente, as células binucleadas normais e aquelas portadoras de MN, pontes nucleoplasmáticas e/ou brotos nucleares. Os critérios utilizados para as análises foram os indicados por Fenech (2000). Foram contabilizadas células binucleadas com membrana citoplasmática e envoltório nuclear íntegros, núcleos de tamanhos similares e não sobrepostos, com o mesmo padrão e intensidade de coloração.

Outra avaliação realizada com a cultura celular HepG2/C3A foi a determinação do Índice de Proliferação com Bloqueio de Citocinese (IPBC). Este índice indica o número médio de ciclos celulares pelos quais as células passaram, durante o período de exposição à citocalasina B. Para cada tratamento, foram contabilizadas 1.500 células (500 células/frasco), conforme descrito na diretriz OECD 487 (2016). O índice IPBC foi calculado, conforme equação 1.

$$IPBC = \frac{(M1) + (2 \times M2) + (3 \times M3)}{N} \quad (1)$$

Onde:

M1 = células com 1 núcleo;

M2 = células com 2 núcleos;

M3 = células com 3 núcleos ou mais;

N = total de células analisadas.

Simultaneamente ao teste do MN, foi avaliada a citotoxicidade dos efluentes estudados, pela determinação da atividade citostática (%), de acordo com Trompowsky (2016). Esse índice indica o percentual de inibição da proliferação celular induzido pelo tratamento, após o período de exposição. A determinação da atividade citostática (%) foi baseada no IPBC, anteriormente descrito, conforme a equação 2 (TROMPOWSKY, 2016).

$$\text{Atividade citostática (\%)} = 100 - 100 \times \frac{(IPBC\ t-1)}{(IPBC\ c-1)} \quad (2)$$

Onde:

IPBC t = IPBC do tratamento;

IPBC c = IPBC do controle negativo.

Outra análise realizada neste estudo foi o índice de replicação (IR), também descrito por Trompowsky (2016). O IR indica o número relativo de ciclos celulares, por célula, durante o período de exposição à citocalasina B, comparando os resultados dos tratamentos com os do CN. Para a determinação do IR, foram analisadas 500 células por frasco, quanto à incidência de células binucleadas e células multinucleadas. O IR foi calculado de acordo com a equação 3 (TROMPOWSKY, 2016).

$$IR (\%) = \frac{[(n^\circ \text{ de células binucleadas}) + 2 \times (n^\circ \text{ de células multinucleadas}) \div 500]_t}{[(n^\circ \text{ de células binucleadas}) + 2 \times (n^\circ \text{ de células multinucleadas}) \div 500]_c} \times 100 \quad (3)$$

Onde:

t = tratamento;

c = controle negativo.

2.6 Análise estatística

As análises estatísticas de todos os testes foram realizadas com auxílio do software estatístico GraphPad Prism 8.0 (La Jolla, E.U.A.). Todos os dados obtidos foram avaliados pelo teste de normalidade de D'Agostino e Pearson. Posteriormente, de acordo com o resultado obtido no teste acima, foi direcionado ou para o teste paramétrico (ANOVA/Dunnett) ou para o não paramétrico (Kruskal-Wallis/Dunn). As análises estatísticas realizadas consideraram o nível de confiança de 95%.

3. RESULTADOS

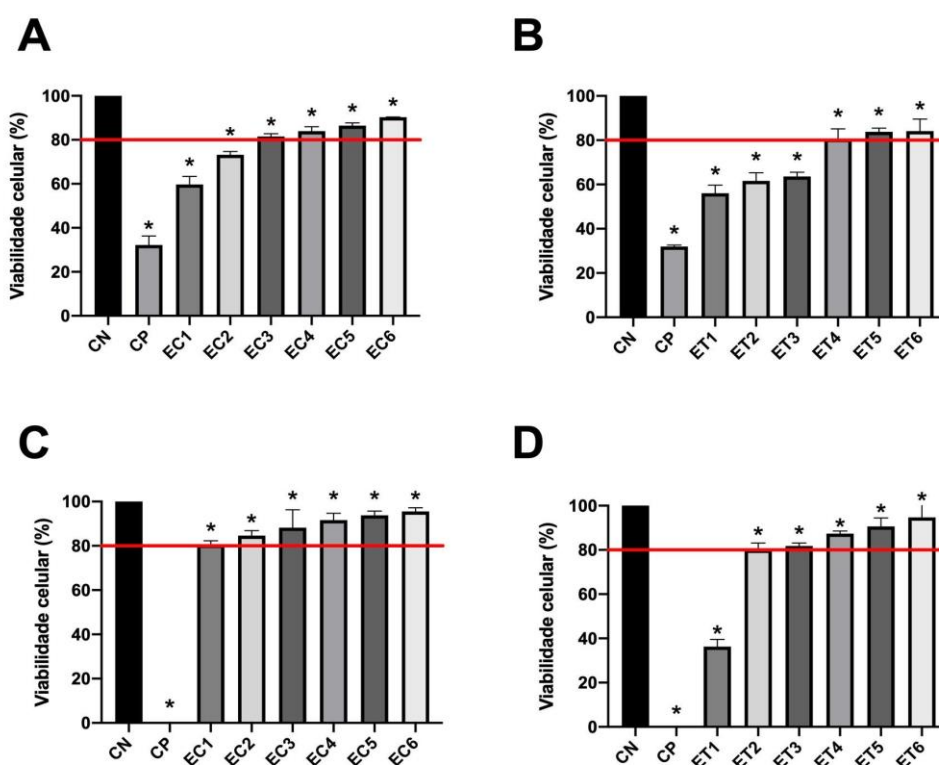
3.1. Ensaio de citotoxicidade

Os resultados do teste do MTT, obtidos com as diferentes diluições da amostra do EC (Figura 1A) e da amostra do ET (Figura 1B), demonstraram citotoxicidade apenas para os tratamentos EC1, EC2, ET1, ET2 e ET3.

Em relação ao teste com o Azul de Tripán, os resultados das diferentes diluições da amostra do EC (Figura 1C) e da amostra do ET (Figura 1D) demonstraram citotoxicidade apenas para o tratamento ET1. Entretanto, apesar dos demais tratamentos apresentarem viabilidade celular satisfatória ($> 80\%$), houve diferença estatística, para todos os tratamentos, quando comparados ao CN.

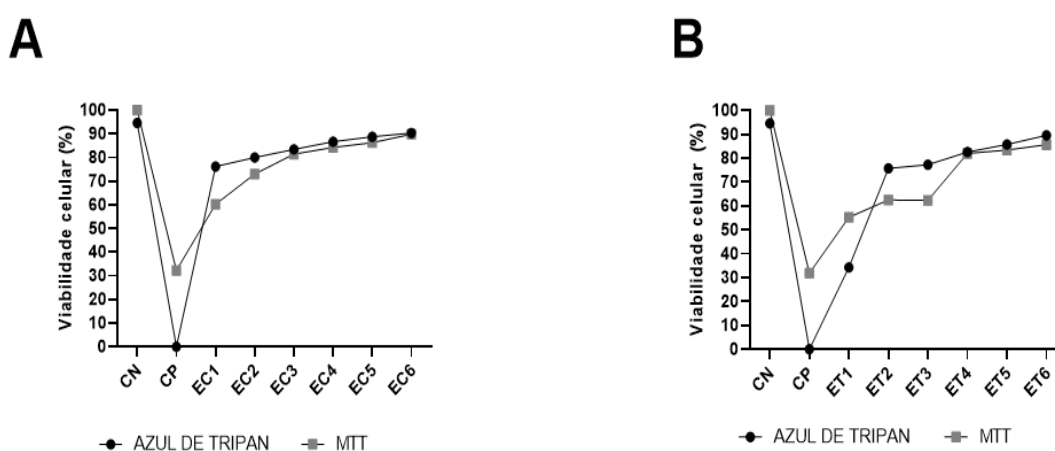
Os resultados dos dois testes de citotoxicidade (MTT e do Azul de tripan) foram comparados entre si, conforme apresentado na Figura 2. Ambas as curvas apresentam taxas de viabilidade celular relativamente menores para o teste do MTT, quando comparado com os resultados do teste do Azul de Tripán. O padrão de curva para EC foi proporcionalmente semelhante para ambos os testes (Figura 2A), enquanto houve uma pequena diferença para o tratamento ET (Figura 2B).

Figura 1 - Viabilidade celular avaliada pelos testes do MTT e do Azul de Tripán em células HepG2/C3A, após a exposição a efluentes de tintura capilar castanha.



A e B: teste do MTT; C e D: teste do Azul de Tripán; CN: Controle negativo; CP: Controle positivo; ET: Efluente da tintura capilar; ET1: amostra bruta (100%); ET2: diluída em 50,00%; ET3: amostra diluída em 25,00%; ET4: amostra diluída em 12,50%; ET5: amostra diluída em 6,25%; ET6: amostra diluída em 3,125%; EC: Efluente completo; EC1: amostra bruta (100%); EC2: amostra diluída em 50,00%; EC3: amostra diluída em 25,00%; EC4: amostra diluída em 12,50%; EC5: amostra diluída em 6,25%; EC6: amostra diluída em 3,125%. A linha vermelha indica o limiar de citotoxicidade de 80%. *significativo em relação ao CN ($p < 0,05$ - ANOVA/Dunnett).

Figura 2 – Comparação dos resultados obtidos nos testes do MTT e do Azul de Tripán realizados com células HepG2/C3A, após a exposição a efluentes de tintura capilar.



A: exposição ao EC; B: exposição ao ET; CN: Controle Negativo; CP: Controle Positivo; ET: Efluente da tintura capilar; ET1: amostra bruta (100%); ET2: diluída em 50,00%; ET3: amostra diluída em 25,00%; ET4: amostra diluída em 12,50%; ET5: amostra diluída em 6,25%; ET6: amostra diluída em 3,125%; EC: Efluente completo; EC1: amostra bruta (100%); EC2: amostra diluída em 50,00%; EC3: amostra diluída em 25,00%; EC4: amostra diluída em 12,50%; EC5: amostra diluída em 6,25%; EC6: amostra diluída em 3,125%.

3.2 Ensaio do Cometa

Os níveis de danos primários no DNA de células HepG2/C3A, expostas às diferentes diluições do EC e ET (item 2.1), avaliados pelo Ensaio do Cometa por meio do parâmetro intensidade da cauda dos cometas (% de DNA), evidenciam diferenças significativas em relação ao CN, para todas as diluições, de ambos tratamentos (Tabela 1).

Tabela 1 - Resultados do Ensaio do Cometa realizado com células HepG2/C3A, após a exposição aos efluentes de tintura capilar castanha.

	Tratamento	Intensidade da cauda
EC	CN	5,37 ± 1,11
	CP	66,44 ± 2,02*
	EC4	35,00 ± 2,09* ^{A B}
	EC5	24,26 ± 2,44* ^{A C}
	EC6	14,33 ± 2,60* ^{B C}
ET	CN	4,98 ± 1,32
	CP	69,52 ± 4,53*
	ET4	15,07 ± 1,73* ^{D E}
	ET5	8,48 ± 1,61* ^{D F}
	ET6	5,10 ± 1,07* ^{E F}

CN: controle negativo; CP: controle positivo; EC: efluente completo; ET: efluente da tintura capilar; ET4: amostra diluída em 12,50%; ET5: amostra diluída em 6,25%; ET6: amostra diluída em 3,125%; EC4: amostra diluída em 12,50%; EC5: amostra diluída em 6,25%; EC6: amostra diluída em 3,125%. *significativo em relação ao CN. Letras iguais demonstram diferenças significativas ($p < 0,05$ - Kruskal-Wallis/Dunn).

3.3 Teste do micronúcleo

Os efeitos genotóxicos e mutagênicos das diferentes diluições do EC e do ET foram avaliados pelo Teste do MN e pelos *endpoints* vinculados a ele (Tabela 2). As frequências de MN e de brotos nucleares não apresentaram resultados significativos, em relação ao CN. (Tabela 2). Não foram observadas pontes nucleoplasmáticas.

O efeito citostático, mensurado pelo Índice de Proliferação com Bloqueio de Citocinese (IPBC), mostrou que todas as diluições testadas dos tratamentos com EC e ET foram significativamente diferentes, em relação aos resultados do CN.

Tabela 2 - Resultados do teste do micronúcleo realizado com células C3A/HepG2, após a exposição às amostras de efluentes contendo tintura capilar castanha.

Tratamento	BN	MN	IPBC	ACit	IR
CN	0.20 ± 0.12	1.00 ± 0.22	1.59 ± 0.05	0.0%	100.0%
CP	1.70 ± 0.21*	4.20 ± 0.35*	1.24 ± 0.07*	61.0%	39.0%
EC4	0.40 ± 0.24	1.20 ± 0.20	1.31 ± 0.07*	47.0%	53.2%
EC5	0.40 ± 0.26	1.10 ± 0.17	1.35 ± 0.03*	41.2%	59.8%
EC6	0.20 ± 0.10	1.10 ± 0.28	1.40 ± 0.05*	32.1%	70.0%
ET4	0.50 ± 0.27	1.20 ± 0.10	1.36 ± 0.02*	38.2%	66.6%
ET5	0.30 ± 0.09	1.03 ± 0.16	1.43 ± 0.03*	26.2%	80.4%
ET6	0.00 ± 0.00	1.00 ± 0.12	1.44 ± 0.03*	26.1%	80.3%

CN: controle negativo; CP: controle positivo; EC: efluente completo; ET: efluente da tintura capilar; BN: broto nuclear; MN: micronúcleo; IPBC: índice de proliferação com bloqueio de citocinese; ACit: atividade citostática; IR: índice de replicação. *significativo em relação ao CN. Kruskal-Wallis/Dunn ($p < 0,05$).

4. DISCUSSÃO

A contaminação hídrica por PCPs cresce exponencialmente e, consequentemente, vem causando impactos consideráveis ao meio ambiente e à saúde humana (LIMA *et al.*, 2022). Dentre os efluentes contaminados com PCPs, estão os derivados de salões de beleza. Esses efluentes são de composição complexa, pois contêm diversos compostos químicos, dentre eles tinturas capilares de alta toxicidade (SAMPATHKUMAR; YESUDAS, 2009) e produtos usados para a fixação da cor e lavagem dos cabelos.

Os efluentes gerados nestes procedimentos são lançados continuamente nas redes de esgotos que, muitas vezes, passam por estações de tratamento que não estão preparadas para tratar esse tipo de resíduo. Deste modo, esses resíduos podem atingir os cursos d'água e se bioacumular nos organismos (QIN *et al.*, 2019). Para avaliar a citotoxicidade desses efluentes, que ainda são pouco explorados quanto à sua toxicidade, foram realizados os testes do Azul de Tripan e do MTT.

Pelos resultados do teste do MTT, foi possível observar que as duas concentrações mais altas do EC (EC1 e EC2) e as três mais altas do ET (ET1, ET2 e ET3) induziram morte celular por decréscimo do metabolismo mitocondrial (viabilidade celular inferior a 80%) (Figuras 1A e 1B, respectivamente). O ensaio de exclusão do Azul de Tripan, que avalia indução de morte celular por perda da integridade da membrana citoplasmática, já mostrou que apenas a concentração ET1 foi citotóxica para as células HepG2/CA (Figura 1D). O efeito citotóxico dos

efluentes mostrou uma relação dose dependente, onde o aumento da viabilidade celular foi proporcional à diminuição da concentração testada. Pelos resultados, foi possível inferir que as baixas viabilidades de EC1 e EC2 se deram por comprometimento da atividade mitocondrial e do ET1 tanto pelo comprometimento da mitocondrial como da integridade da membrana plasmática.

Há três hipóteses que podem ser sugeridas para a indução de citotoxicidade. A primeira baseia-se em relatos da literatura, que indicam que o processo apoptótico pode ser mediado pela ação mitocondrial, por meio de suas substâncias letais contidas no espaço intermembranoso desta organela. Estas substâncias, denominadas de componentes pró-apoptóticos, ficam aprisionadas na mitocôndria e são liberadas para o citosol, por meio de uma estrutura proteica denominada de poro de transição de permeabilidade mitocondrial (*mitochondrial permeability transition pore*, MPTP) (PAROLIN; REASON, 2001; HU *et al.*, 2018; HIRSCH *et al.*, 1997; MARTIN; KAISER; PRICE, 1999; HALESTRAP; MCSTAY; CLARKE, 2002; HALESTRAP, 2009; MORCIANO *et al.*, 2021).

A abertura deste poro pode ocorrer por diferentes estímulos: expansão da matriz mitocondrial e/ou entrada de prótons nesta matriz; formação de espécies reativas de oxigênio; aumento do cálcio intra-mitocondrial; ácidos biliares hidrofóbicos; e algumas drogas (PESSAYRE *et al.*, 1999; PAROLIN; REASON, 2001; NESCI, 2020; MORCIANO *et al.*, 2021). Em geral, as mitocôndrias dos mamíferos funcionam como pontos de controle centrais para algumas formas de apoptose, tornando-as o principal alvo do sistema de sinalização e sobrevivência da célula (DLAMINI; MBITA; ZUNGU, 2004; REGO; OLIVEIRA, 2003; MORCIANO *et al.*, 2021).

A segunda hipótese fundamenta-se no mecanismo de ação tóxica de alguns compostos, como as aminas aromáticas. Dentre elas, destaca-se o 1,4-diamino-2-metil benzeno, presente na tintura capilar castanha estudada. Nelms *et al.* (2015) afirmam que esta amina aromática possui a capacidade de perturbar as funções da mitocôndria e, assim, ocasionar citotoxicidade, como o que foi verificado no teste do MTT aplicado neste estudo.

A terceira hipótese refere-se às sugestões publicadas por Lui *et al.* (2007), que descrevem a ruptura das membranas como consequência da necrose, somada à apoptose final, efeito este observado no tratamento ET1 do teste Azul de Tripan. De acordo com alguns autores, tal ruptura seria resultado do processo de formação dos corpos apoptóticos, que ocorre pelo rearranjo das membranas durante a apoptose final (GIAMPAZOLIAS; TAIT, 2018; MOHAMMADINEJAD *et al.*, 2019; SAIK *et al.*, 2019; QUARLERI; CEVALLOS;

DELPINO, 2021). Isso resulta na alteração da permeabilidade da membrana e, consequentemente, na entrada de corantes vitais, como o Azul de Tripán.

Os testes de citotoxicidade também são usados para definir a faixa de concentração dos ensaios de genotoxicidade, mutagenicidade ou de morte celular programada. A viabilidade celular indica a concentração apropriada para testar uma substância, garantindo que mais de 80% das células permaneçam vivas. Estes testes permitem também avaliar como as células respondem às condições ambientais às quais estão expostas. Essa avaliação é crucial para assegurar que a concentração utilizada não é letal para as células, o que possibilita verificar se a substância tem potencial genotóxico, bem como se interfere na velocidade do ciclo celular, alterando a curva de crescimento por atrasos e/ou indução de apoptose (EISENBRAND *et al.*, 2002; DITTMAR *et al.*, 2012; TURKEZ; ARSLAN; OZDEMIR, 2017).

A avaliação da genotoxicidade, feita pelo Ensaio do Cometa, revelou que todas as concentrações do EC e duas do ET (ET4 e ET5) induziram fragmentação do DNA nas células HepG2/C3A, efeito este evidenciado pelo aumento da intensidade da cauda do cometa (Tabela 1). Conforme documentado na literatura, a fragmentação do DNA pode ser interpretada como um indicativo de processo apoptótico, uma vez que as células apoptóticas exibem rupturas no material genético, ocasionadas pela ativação de endonucleases (WYLLIE, 1980; CRAWFORD; WELLS, 2011; ZHAI *et al.*, 2014; KUWABARA *et al.*, 2017).

Os resultados de genotoxicidade obtidos no ensaio cometa com as células HepG2/C3A expostas aos efluentes EC e ET, assim como os resultados de citotoxicidade já descritos anteriormente, mostraram uma relação de efeito concentração-dependente, ou seja, quanto maior a concentração, maiores os efeitos observados. Contudo, o EC apresentou maior potencial genotóxico do que citotóxico, quando comparado ao ET. Estes resultados mostraram que os efeitos do EC estão mais relacionados a indução de danos na estrutura do DNA do que nas membranas plasmáticas e atividades mitocondriais.

Múltiplos compostos podem ser encontrados simultaneamente em ambientes aquáticos, formando misturas complexas (KOLPIN *et al.*, 2002; SCHWARZENBACH *et al.*, 2006; PAVLAKI; PEREIRA; SOARES, 2011; SISINNO; OLIVEIRA-FILHO, 2021). Essas misturas podem alterar o modo de ação observado para os compostos isolados (GEIGER *et al.*, 2016), desencadeando diferentes efeitos tóxicos sobre o mesmo organismo-teste (LEBLANC; WANG, 2006; SCHWARZENBACH *et al.*, 2006; VARONA-URIBE *et al.*, 2016; SISINNO; OLIVEIRA-FILHO, 2021).

Com base no exposto anterior, pode-se concluir que os efluentes mais complexos, como aqueles que incluíam a combinação de xampu, condicionador e tintura capilar, exibiram um

maior potencial genotóxico para a cultura HepG2/C3A, em comparação aos efluentes que continham apenas resíduos dessas tinturas. Esses resultados fornecem informações importantes e inéditas sobre os efluentes provenientes de salões de beleza, pois indicam que pode haver um aumento da toxicidade das tinturas capilares quando estas estão associadas a compostos tensoativos.

Embora diversas pesquisas destaquem a necessidade de estudos que abordem a toxicidade de misturas químicas, para a realização de avaliação de risco (CALABRESE, 1995), até o momento há uma escassez de informações, tanto sobre o mecanismo de ação, quanto os efeitos das misturas dos compostos usados no processo de coloração capilar (HE *et al.*, 2022). Os mecanismos por trás dessas interações ainda são pouco compreendidos, portanto requerem uma investigação mais aprofundada.

Em geral, os ensaios de genotoxicidade e mutagenicidade são usados para analisar possíveis efeitos de misturas complexas, sem a necessidade de uma caracterização química precisa dos seus componentes (LAH *et al.*, 2008; FLOHR, 2011). Considerando que as análises físico-químicas são insuficientes para se determinar os efeitos de uma mistura (FERNÁNDEZ-ALBA *et al.*, 2001; FARRÉ; BARCELÓ, 2003; HERNANDO, 2005), os testes toxicogenéticos são fundamentais, pois permitem a avaliação do potencial de risco ambiental destas misturas. Uma outra inferência que pode ser feita, com relação aos efeitos citotóxicos e genotóxicos da tintura avaliada, seria quanto a ação tóxica do dióxido de titânio (TiO₂), um dos componentes da tintura capilar estudada. De acordo com a literatura, as partículas de TiO₂ podem causar ruptura das membranas plasmáticas, inibição da atividade mitocondrial e até mesmo alterar a funcionalidade dos lisossomos (DI VIRGILIO *et al.*, 1998; WANG; LI SHU; STONER, 2008; SHI *et al.*, 2013; MOHAMMADINEJAD *et al.*, 2019). Além disso, as partículas de TiO₂ também induziram danos citotóxicos em células hepáticas de ratos (LI *et al.*, 2017; JIA *et al.*, 2017; MARTINS *et al.*, 2017; PAPP *et al.*, 2020) e em seres humanos, de maneira dose-dependente (SHA *et al.*, 2011; SHAJARI; GOLESTANI; NOWROUZI, 2021), de forma semelhante aos resultados aqui apresentados.

Zhu *et al.* (2007), em ensaio *in vitro*, propuseram o mecanismo pelo qual as nanopartículas de TiO₂ interagem com o DNA e induzem a sua quebra. Os resultados de espectroscopia de infravermelho demonstraram que ocorre ligação destas nanopartículas com o DNA no grupo fosfato (P=O), formando P-O-Ti e afrouxando a ligação C-O-P, sem alterar as bases nitrogenadas do DNA. Essa alteração provoca a quebra do DNA, o que justificaria a fragmentação do material genético visualizada neste estudo pelo ensaio do cometa (MOHAMMADINEJAD *et al.*, 2019; LING *et al.*, 2021). Além disso, as nanopartículas de

TiO₂ também podem induzir a apoptose e necrose em células de mamíferos (LIU *et al.*, 2010; SHI *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2011; MOHAMMADINEJAD *et al.*, 2019).

Outros autores, como Galiotte *et al.* (2008), também constataram pelo ensaio do cometa, maior frequência de quebras no DNA de linfócitos de cabeleireiros expostos a diferentes substâncias químicas, como corantes capilares, quando comparados ao grupo controle que não sofreu exposição. Já para a OECD (2016), estas quebras no DNA podem tanto serem reparadas, resultando em efeito não persistente, como serem fixadas numa mutação, resultando em mudança permanente. Em geral, uma substância mutagênica é aquela que induz danos ao DNA, que são transmissíveis da célula mãe para as células-filhas (SANTELLI; SIVIEIRO, 2014). Além disso, a revisão de literatura de Roberto e Christofolletti (2019) relata diversos efeitos de ecotoxicidade das nanopartículas de TiO₂, como constatado por outro trabalho de nosso grupo de pesquisa, onde foi demonstrado o efeito tóxico destes efluentes sobre organismos aquáticos (GONÇALVES *et al.*, 2023).

Outro teste também utilizado em avaliações de genotoxicidade de substâncias e amostras ambientais (como as amostras de efluentes aqui avaliadas) é o teste do MN. Este teste é realizado com a finalidade de detectar fragmentos de cromossomos, cromossomos acêntricos e perda de cromossomos inteiros (FENECH, 2000; FENECH, 2007). Os resultados do teste do MN deste estudo mostraram ausência de MN para os ensaios realizados com todas as concentrações dos efluentes avaliados (EC e ET).

De acordo com Houtgraaf *et al.* (2006), os *checkpoints* do ciclo celular são ativados quando ocorrem danos no material genético, ocasionando parada do ciclo, para que o sistema de reparo consiga restaurar o DNA. Quando o reparo ocorre corretamente, as células continuam normalmente o seu ciclo celular, sem causar prejuízos ou alterações às células-filhas (BERTOLI *et al.*, 2013). Baseado na descrição dos autores citados acima (HOUTGRAAF *et al.*, 2006; BERTOLI *et al.*, 2013) e nos resultados do presente estudo, é possível inferir que os componentes dos efluentes avaliados induziram danos no material genético de HepG2/C3A, como os observados no ensaio do cometa, mas esses devem ter sido reparados, não se fixando nas células filhas, fato este que justifica a ausência de alterações no teste do MN.

Neste estudo também foram realizadas outras avaliações de citotoxicidade, simultaneamente ao teste do MN: índice de proliferação com bloqueio de citocinese (IPBC), índice de replicação (IR) e porcentagem de atividade citostática (LORGE *et al.*, 2008). O IPBC indica o número médio de ciclos que cada célula passou, durante o período de exposição à citocalasina B. Os resultados desses ensaios podem ser utilizados para calcular os níveis de proliferação celular. A outra medida recomendada, é o índice de replicação (IR). Este índice

infere, diretamente, a extensão da replicação celular nas culturas tratadas, em relação aos dados do teste controle.

A citotoxicidade de um agente pode resultar em citostase ou em morte celular. A citostase é um estado de interrupção temporária do ciclo celular, no qual as células param de se dividir ativamente. Esse processo pode ocorrer como resposta a vários estímulos ou condições do ambiente celular. Esse evento é geralmente induzido pela ação de inibidores da divisão celular, mas pode também ser induzido por agentes tóxicos que interferem em vias específicas do ciclo celular, causando seu atraso. Como a citostase também pode estar relacionada com morte celular, esse componente da citotoxicidade pode ser predominante e, portanto, deve ser sempre levado em consideração na avaliação da citotoxicidade global. De acordo com alguns autores, quando o teste de micronúcleo *in vitro* é realizado com citocalasina B, é recomendado que sejam aplicados, complementarmente, dois métodos para de medição de citotoxicidade, o do IPBC e do o IR (FELLOWS; O'DONOVAN, 2007; KIRKLAND *et al.*, 2007; FELLOWS *et al.*, 2008; LORGE *et al.*, 2008).

Neste estudo, as culturas tratadas com os efluentes de salões de beleza evidenciaram uma diminuição significativa do IPBC e do IR, bem como aumento da atividade citostática (Tabela 2). Foram observadas porcentagens diminuídas de IR, para os tratamentos EC e ET, associadas ao aumento da atividade citostática. A taxa mais baixa de IR foi registrada para as células expostas ao EC4 (IR = 53,2%; atividade citostática = 47,0%). Por esses resultados, pode-se inferir que a alta atividade citostática registrada possa estar relacionada ao aprisionamento do ciclo celular, desencadeado como resposta para inibir a fixação de danos e, conseqüentemente, a conferência de um maior tempo para reparo das lesões do material genético. Essa afirmação se justifica pela presença de quebras no material genético, observada pelo ensaio de Cometa, e ausência de MN no teste correspondente. Esse processo de aprisionamento do ciclo celular pode contribuir para o processo apoptótico e subsequentes danos à membrana plasmática e/ou às mitocôndrias, como elucidado anteriormente.

Os efluentes EC e ET apresentaram efeitos citotóxicos e genotóxicos sobre as células HepG2/C3A. Houve a fragmentação do DNA, diminuição do IPBC, diminuição do IR e aumento da atividade citostática. Esses resultados são preocupantes, pois os efluentes EC e ET interferiram na atividade mitocondrial, na permeabilidade e integridade da membrana celular e no desenvolvimento do ciclo celular. Os resultados relacionados aos efeitos observados no ciclo celular classificam os efluentes testados como potencialmente tóxicos para o modelo empregado.

5. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, é possível concluir que as concentrações testadas do EC e ET induziram efeitos citotóxicos e genotóxicos nas células de hepatocarcinoma humano (HepG2/C3A). Como não foram registradas frequências significativas de MN, acredita-se que os danos genotóxicos observados não foram transmitidos, tampouco fixados nas células-filhas. Além disso, a citotoxicidade observada pela diminuição dos índices IPBC e IR e aumento da atividade citostática, comprova que estes efluentes conferem riscos à integridade ambiental e à saúde humana, e ainda alerta para a necessidade de se estabelecer, urgentemente, estratégias que possam diminuir os impactos conferidos por este tipo de efluente. O estudo contribui ainda com informações sobre a toxicidade dos componentes das tinturas capilares, bem como dos efluentes gerados nos processos de tingimento de cabelos.

Apesar da cultura celular HepG2/C3A ter demonstrado sensibilidade na avaliação do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico do EC e ET, os dados não podem ser extrapolados, diretamente, para os organismos *in vivo* em geral. Ainda são necessários mais estudos complementares, desenvolvidos com diferentes bioindicadores, *endpoints* e ensaios, que possam certificar, de forma mais realista, a abrangência e os efeitos deste tipo de contaminação. Essa necessidade se torna ainda mais essencial devido ao uso crescente e contínuo destes produtos, à sua constituição complexa e tóxica, e ao alto potencial de reatividade com outros químicos usados no processo de tingimento, bem como com químicos ambientais. Por fim, é prudente alertar que o uso intensivo e generalizado de tinturas capilares pode ocasionar comprometimentos à saúde humana.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BARILE, A. F. **Introduction to In Vitro Cytotoxicology: Mechanisms and Methods**. 1. ed. Flórida: CRC Press. 1994.

BERTOLI, C. *et al.* Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 14, n. 8, p. 518-28, 2013.

BRAUSCH, J. M.; RAND, G. M. A review of personal care products in the aquatic environment: Environmental concentrations and toxicity. **Chemosphere**, v. 82, n. 11, p. 1518-1531, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.11.018>.

BRILLAS, E.; MARTINEZ-HUITLE C. Decontamination of wastewater containing synthetic organic dyes by electrochemical methods: An update review. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 166-167, p. 603-643, 2015.

CALABRESE, E.J. Toxicological consequences of multiple chemical interactions: a primer. **Toxicology**, v. 105, p. 121-135, 1995.

CARVALHO, T. E. M.; FUNGARO, D. A.; IZIDORO, J. C. Adsorção do corante reativo laranja 16 de soluções aquosas por zeólita sintética. **Química Nova**, v. 33, p. 358-363, 2010.

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

CHORILLI, M.; SCARPA, M. V.; LEONARDI, G. R.; FRANCO, Y. O. Toxicologia dos Cosméticos. **Latin American Journal of Pharmacy (Acta Farmacéutica Bonaerense)**, Buenos Aires, v.1, n.26, p. 144-154, 2007.

CLAXTON, L. D.; HOUK, V. S.; HUGHES, T. J. Genotoxicidade de resíduos e efluentes industriais. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 410, n. 3, p. 237-243, 1998.

CRAWFORD, E. D.; WELLS, J. A. Caspase Substrates and Cellular Remodeling. **Annual Review of Biochemistry**, v. 80, n. 1, p. 1055–1087, 2011.

CUNICO, M.M.; LIMA, C.P. **Os cosméticos e os riscos da vaidade precoce**. In: TREBIEN *et al.* Medicamentos: benefícios e riscos com ênfase na automedicação. 2011. Disponível em <http://www.mcunico.com.br/ebooks/cosmeticos-riscos.pdf>. Acesso em: 13 jan 2023.

DITTMAR, R.; POTIER, E.; VAN ZANDVOORT, M.; ITO, K. Assessment of cell viability in three-dimensional scaffolds using cellular auto-fluorescence. **Tissue Engineering - Part C: Methods**, v. 18, n. 3, p. 198–204, 2012. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2011.0334>

DLAMINI, Z.; MBITA, Z.; ZUNGU, M. Genealogy, expression, and molecular mechanisms in apoptosis. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 101, n. 1, p. 1-15, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2003.08.005>

EGGEN, R. *et al.* Redução da descarga de micropoluentes no ambiente aquático: os benefícios da modernização das estações de tratamento de águas residuais. **Environmental Science & Technology** v. 48, n.14, p. 7683–7689. 2014. DOI: 10.1021/es500907n

EISENBRAND, G. *et al.* Methods of *in vitro* toxicology. **Food and chemical toxicology**, v. 40, n. 2-3, p. 193-236, 2002. DOI: 10.1016/S0278-6915(01)00118-1. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11893398/>. Acesso em: 18 abr. 2021.

ESCHER, B. I.; FENNER, K. Recent advances in environmental risk assessment of transformation products. **Environmental Science & Technology**, v. 45, n. 9, p. 3835-3847, 2011.

FARRÉ, M.; BARCELÓ, D. Toxicity testing of wastewater and sewage sludge by biosensors, bioassays and chemical analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 5, p. 299-310, 2003.

FELLOWS, M.D.; O'DONOVAN, M.R. Cytotoxicity in cultured mammalian cells is a function of the method used to estimate it. **Mutagenesis**, v. 22, p. 275–280, 2007.

FELLOWS, M. D.; O'DONOVAN, M. R. O.; LORGE, E.; KIRKLAND, D. Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the in vitro micronucleus test II: Practical aspects with toxic agentes. **Mutation Research**, v. 655, p. 4-21, 2008.
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.06.004>

FENECH, M. Cytokinesis-block Micronucleus Cytome Assay. **Nature Protocols**, v. 2, n. 5, p. 1084-1104, 2007.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research -Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1–2, p. 81–95, 2000.
[https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(00\)00065-8](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(00)00065-8)

FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. *et al.* Toxicity of pesticides in wastewater: a comparative evaluation of rapid bioassays. **Analytica Chimica Acta**, v. 426, n. 2, p. 289-301, 2001.

GALIOTTE, M. P.; KOHLER, P.; MUSSI, G.; FIGARO GATTÁS, G. J. Assessment of Occupational Genotoxic Risk among Brazilian Hairdressers. **The Annals of Occupational Hygiene**, [S. l.], v. 52, n. 7, p. 645–651, 2008. DOI: 10.1093/annhyg/men037. Disponível em: <https://academic.oup.com/annweh/article/52/7/645/199108/Assessment-of-Occupational-Genotoxic-Risk-among>. Acesso em: 16 abr. 2021.

GEIGER, E.; HORNEK-GAUSTERER, R.; SAÇAN, M. T. Single and mixture toxicity of pharmaceuticals and chlorophenols to freshwater algae *Chlorella vulgaris*. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 129, p. 189-198, 2016.

GIAMPAZOLIAS, E.; TAIT, S. W. G. Caspase-independent cell death: An anticancer double whammy. **Cell Cycle**, v. 17, n. 3, p. 269–270, 2018.

GIRLING, A. E. *et al.* Development of methods for evaluating toxicity to freshwater ecosystems. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 45, n. 2, p. 148-176, 2000.

GONÇALVES, L. C.; ROBERTO, M. M.; PEIXOTO, P. V. L.; VIRIATO, C.; SILVA, A. F. C.; OLIVEIRA, J. A. V.; NARDI, M. C.; PEREIRA, L. C.; ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. Toxicity of Beauty Salon Effluents Contaminated with Hair Dye on Aquatic Organisms. **Toxics**, v. 11, n. 11, p. 911, 2023.
<https://doi.org/10.3390/toxics11110911>.

HALESTRAP, A. P. What is the mitochondrial permeability transition pore? **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 46, n. 6, p. 821-831, 2009.

HALESTRAP, A. P.; MCSTAY, G. P.; CLARKE, S. J. The permeability transition pore complex: another view. **Biochimie**, v. 84, n. 2-3, p. 153-166, 2002.

HANUMANTHAYYA, K. *et al.* Hair coloring – hair dyeing. **RGUHS Journal of Medical Sciences**, v. 8, n. 1, p. 13–17, 2018.

HE, L. *et al.* Hair dye ingredients and potential health risks from exposure to hair dyeing. **Chemical Research in Toxicology**, v. 35, n. 6, pág. 901-915, 2022.

HEMIELEWSKI, C.; LEITENBERG DA SILVEIRA, R. Compostos nocivos ao organismo presentes em tonalizantes capilares. **Ciências da Saúde**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 41–49, 2007.
HERNANDO, M. D. *et al.* Toxicity assays applied to wastewater treatment. **Talanta**, v. 65, n. 2, p. 358-366, 2005.

HIRSCH, T. *et al.* The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. **Oncogene**, v. 15, n. 13, p. 1573-1581, 1997.

HOUTGRAAF, J. H.; VERSMISSEN, J.; VAN DER GIESSEN, W. J. A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. **Cardiovascular Revascularization Medicine**, [S. l.], v. 7, n. 3, p. 165–172, 2006. DOI: 10.1016/j.carrev.2006.02.002.

HU, S.; ZHU, P.; ZHOU, H.; ZHANG, Y.; CHEN, Y. Efeitos Protetores Induzidos pela Melatonina nos Cardiomiócitos Contra Lesões de Reperfusão Parcialmente Através da Modulação Dde IP3R e SERCA por Meio da Ativação de ERK1. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 110, p. 44-51, 2018.

JIA, X. *et al.* The potential liver, brain, and embryo toxicity of titanium dioxide nanoparticles on mice. **Nanoscale Research Letters**, v. 12, n. 1, p. 478, 2017.

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

KIRKLAND, D; AARDEMA, M.; HENDERSON, L.; MÜLLER, L. Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens. I: Sensitivity, specificity and relative predictivity, **Mutation Research.**, v. 584, n. 1-2, p. 1–256, 2005.

KUWABARA, W.M.; CURI, R.; ALBA-LOUREIRO, T.C. Autophagy Is Impaired in Neutrophils from Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **Frontiers Immunology**, v. 8, p.24, 2017.

LAH, B. *et al.* Genotoxicity evaluation of water soil leachates by Ames test, comet assay, and preliminary Tradescantia micronucleus assay. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 139, p. 107–118, 2008.

LEBLANC, G. A.; WANG, G. Chemical mixtures: greater-than-additive effects? **Environmental Health Perspectives**, v. 114, n. 9, p. A517-A518, 2006.

LI, Y. *et al.* Genotoxicity and gene expression analyses of liver and lung tissues of mice treated with titanium dioxide nanoparticles. **Mutagenesis**, v. 32, n. 1, p. 33-46, 2017.

LIMA, J. P. P.; MELO, E. D.; AGUIAR, A. Characteristics and ways of treating cosmetic wastewater generated by Brazilian industries: A review. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 168, p. 601-612, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2022.10.031>

LING, C. *et al.* Genotoxicity evaluation of titanium dioxide nanoparticles in vitro: a systematic review of the literature and meta-analysis. **Biological Trace Element Research**, v. 199, p. 2057-2076, 2021.

LIU, Q. Pollution and treatment of dye waste-water. In: **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. IOP Publishing p. 052001. 2020.

LLANOS, A. A. *et al* Hair product use and breast cancer risk among African American and White women. **Carcinogenesis**, v. 38, n. 9, p. 883-892, 2017.

LORGE, E. *et al.* Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the in vitro micronucleus test: I. Theoretical aspects. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v.655, n 1-2, p. 1-3, 2008.
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.06.003>.

LOWRY, L.K. *et al.* Chemical monitoring of urine from workers potentially exposed to benzidine-derived azo dyes. **Toxicology Letters**, v.7, p.29-36, 1980.

LUI, P. P. Y. *et al.* Increased apoptosis at the late stage of tendon healing. **Wound Repair and Regeneration**, v. 15, n. 5, p. 702-707, 2007. DOI: 10.1111/j.1524-475X.2007.00276.x. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1524-475X.2007.00276.x>. Acesso em: 16 abr. 2021.

MACHADO, E. S. *et al.* Aspectos toxicológicos relacionados ao uso de cosméticos na conservação, alisamento e tingimento capilar: uma revisão de literatura. **Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 10, n. 1, 2017.

MAIFADI, S. *et al.* Analysis and pretreatment of beauty hair salon wastewater using a rapid granular multimedia filtration system. **Journal of Water Process Engineering**, v. 33, p. 101050, 2020.

MARTIN, L. J.; KAISER, A.; PRICE, A. C. Motor neuron degeneration after sciatic nerve avulsion in adult rat evolves with oxidative stress and is apoptosis. **Journal of neurobiology**, v. 40, n. 2, p. 185-201, 1999.

MARTINS, A. C. *et al.* Evaluation of distribution, redox parameters, and genotoxicity in Wistar rats co-exposed to silver and titanium dioxide nanoparticles. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A**, v. 80, n. 19-21, p. 1156-1165, 2017.

MELO, E. D.; MOUNTEER, A.H. Avaliação da tratabilidade de efluentes de indústrias de cosméticos capilares por processos biológicos aeróbios. **Revista Augustus**, v. 24, n. 49, p. 155-178, 2019.

MOHAMMADINEJAD, R. *et al.* Necrotic, apoptotic and autophagic cell fates triggered by nanoparticles. **Autophagy** v. 15, p. 4-33, 2019.

MONTES-GRAJALES, D.; FENNIX-AGUDELO, M.; MIRANDA-CASTRO, W. Occurrence of personal care products as emerging chemicals of concern in water resources: A review. **Science of the Total Environment**, v. 595, p. 601-614, 2017.

MORCIANO, G. *et al.* The mitochondrial permeability transition pore: an evolving concept critical for cell life and death. **Biological Reviews**, v. 96, n. 6, p. 2489-2521, 2021.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983. DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.

NATARAJAN, A. T.; DARROUDI, F. Use of human hepatoma cells for in vitro metabolic activation of chemical mutagens/carcinogens. **Mutagenesis**, v. 6, n. 5, p. 399–403, 1991. DOI: 10.1093/MUTAGE/6.5.399. Disponível em: <https://academic.oup.com/mutage/article/6/5/399/1013234>. Acesso em: 23 jan. 2021.

NELMS, M. D. *et al.* Proposal of an in silico profiler for categorisation of repeat dose toxicity data of hair dyes. **Archives of Toxicology**, v. 89, n. 5, p. 733–741, 2015. DOI: 10.1007/s00204-014-1277-8. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00204-014-1277-8>. Acesso em: 16 abr. 2021.

NESCI, S. The mitochondrial permeability transition pore in cell death: a promising drug binding bioarchitecture. **Medicinal Research Reviews**, v. 40, n. 2, p. 811-817, 2020.

NKANSAH, M.A.; OPOKU, F.; EPHRAIM, J.H.; WEMEGAH, D.D.; TETTEH, L.M. Characterization of Beauty Salon Wastewater from Kwame Nkrumah University of Science and Technology, Kumasi, Ghana, and Its Surrounding Communities. **Environmental Health Insights**. v.10, p. EHI. S40360, 2016. DOI: 10.4137/EHI.S40360.

NOHYNEK, G.J.; FAUTZ, R.; BENECH-KIEFFER, F.; TOUTAIN, H. Toxicity and human health risk of hair dyes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, n.4, p. 517-543, 2004. DOI: 10.1016/j.fct.2003.11.003.

OECD. The Organisation for Economic Co-operation and Development. **Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test**, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris: OECD Publishing 2016.

OECD. The Organisation for Economic Co-operation and Development. **Test Guideline No 489, In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay**. Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris: OECD Publishing 2016.

OLIVEIRA, R. A. G. *et al.* Química e toxicidade dos corantes de cabelo. **Química Nova**, Ribeirão Preto, v. 37, n. 6, p. 1037–1046, 2014. DOI: 10.5935/0100-4042.20140143.

OURAHMOUNE, N.; JURDI, H. E. Beauty salon - a marketplace icon. **Consumption Markets & Culture**, v. 24, n. 6, p. 611-619, 2020. <https://doi.org/10.1080/10253866.2020.1741356>

PAPP, A. *et al.* Presence of titanium and toxic effects observed in rat lungs, kidneys, and central nervous system *in vivo* and in cultured astrocytes in vitro on exposure by titanium dioxide nanorods. **International Journal of Nanomedicine**, p. 9939-9960, 2020.

PAROLIN, M. B.; REASON, I. J. M. Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 38, n. 2, p. 138-144, 2001.

PAVITHRA, K. G. *et al.* Removal of colorants from wastewater: A review on sources and treatment strategies. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 75, n. 1–19, 2019.

PAVLAKI, M. D.; PEREIRA, R.; LOUREIRO, S.; SOARES, A. M. V. M. Effects of binary mixtures on the life traits of *Daphnia magna*. **Ecotoxicology and Environmental safety**, v. 74, n. 1, p. 99-110, 2011.

PESSAYRE, D. *et al.* Withdrawal of life support, altruistic suicide, fratricidal killing and euthanasia by lymphocytes: different forms of drug-induced hepatic apoptosis. **Journal of Hepatology**, v.31, n.4, p. 760-770, 1999.

PORTIS, I. G. *et al.* Bioensaio citogenético para a caracterização da mutagenicidade e citotoxicidade da espécie *Choclospermum regium*. **Revista Eletrônica da Faculdade Evangélica de Ceres**, v. 5, n. 1, 2016.

QIN, L.; DENG, H. Y.; CHEN, S. J.; WEI, W. A Meta-Analysis on the Relationship Between Hair Dye and the Incidence of Non-Hodgkin's Lymphoma. **Medical Principles and Practice**, v. 28, n. 3, p. 222-230, 2019.

QUARLERI, J.; CEVALLOS, C.; DELPINO, M.V. Apoptosis in infectious diseases as a mechanism of immune evasion and survival. **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**, v. 125, p. 1- 24. 2021.

REGO, A. C.; OLIVEIRA, C. R. Mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species in excitotoxicity and apoptosis: Implications for the pathogenesis of neurodegenerative diseases. **Neurochemical Research**, v. 28, p. 1563-1574, 2003. DOI: 10.1023/A:1025682611389. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1025682611389>. Acesso em: 16 abr. 2021.

REIFFERSCHIED, G. *et al.* Measurement of genotoxicity in wastewater samples with the in vitro micronucleus test-Results of a round-robin study in the context of standardisation according to ISO. **Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 649, n. 1–2, p. 15–27, 2008. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2007.07.015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17980648/>. Acesso em: 18 abr. 2021.

ROBERTO, M.M.; CHRISTOFOLETTI, C.A. **How to Assess Nanomaterial Toxicity? An Environmental and Human Health Approach. In Nanomaterials—Toxicity, Human Health and Environment**; IntechOpen: London, UK, 2019.

ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, A. S. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 317–320, 2003. DOI: 10.1590/s1516-14392003000300003. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-14392003000300003&lng=en&nrm=iso&tlng=pt. Acesso em: 15 abr. 2021.

SAIK, O. V. *et al.* Prioritization of genes involved in endothelial cell apoptosis by 46 their implication in lymphedema using an analysis of associative gene networks with ANDSystem. **Bmc Medical Genomics**, v. 12, n. 47, p. 118-140, mar. 2019. Springer Science and Business

Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12920-019-0492-9>.

SALVADORI, F., D. M. Teste do micronúcleo em células humanas *in vitro*. **Mutagenese Ambiental**, p. 201-2020, 2003. Disponível em: <https://ci.nii.ac.jp/naid/10015247967>. Acesso em: 23 jan. 2021.

SAMPATHKUMAR, K.; YESUDAS, S. Hair dye poisoning and the developing world. **J Emerg Trauma Shock**, v. 2, n. 2, p. 129–131, 2009. doi: 10.4103/0974-2700.50749.

SANTELLI, G. M. M.; SIVIEIRO, F. **Mutagênese e Carcinogênese. Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo, p. 71-84, 2014.

SCHWARZENBACH, R. P. *et al.* The challenge of micropollutants in aquatic systems. **Science**, v. 313, n. 5790, p. 1072-1077, 2006.

SEBRAE. **Relatório Consolidado Projeto Salão de beleza – Redução de Desperdício e Eficiência Energética**. Brasília: SEBRAE, 2007. Disponível em: <https://docplayer.com.br/17499473-Relatorio-consolidado-projeto-salao-de-beleza-reducao-de-desperdicio-e-eficiencia-energetica-2007.html>. Acesso em: 03 de dez. 2023.

SHA, B. *et al.* Cytotoxicity of titanium dioxide nanoparticles differs in four liver cells from human and rat. *In: Composites Part B: Engineering*, v. 42, n.8, p. 2136–2144, 2011. DOI: 10.1016/j.compositesb.2011.05.009.

SHAJARI, Z.; GOLESTANI, A.; NOWROUZI, A. Acute cytotoxic effects of titanium dioxide (TiO₂) and chronic exposure to safe dose of nanoparticle on Hepatocarcinoma cell line (HepG2). **Nanomedicine Research Journal**, v. 6, no. 3, p. 269-278, 2021.

SHI, H.; MAGAYE, R.; CASTRANOVA, V.; ZHAO, J. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. **Part. Fibre Toxicol.**, v. 10, p. 1-33, 2013.

SINGH, N.P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, n. 1, p. 184–191, 1988. DOI: 10.1016/0014-4827(88)90265-0.

SISINNO, C. L. S.; OLIVEIRA-FILHO, E. C. **Princípios de toxicologia ambiental**. Digitaliza Conteúdo, 1 ed. Rio de Janeiro: Interciência, p. 198, 2021.

SOUSA, F. D. A. *et al.* Toxicologia dos cosméticos: avaliação dos riscos que os produtos capilares trazem à saúde. **Visão Acadêmica**, v. 20, n. 4, p. 78-93, 2020.

TICE, R. R. *et al.* Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000.

TURKEZ, H.; ARSLAN, M. E.; OZDEMIR, O. Genotoxicity testing: progress and prospects for the next decade. **Expert opinion on drug metabolism & toxicology**, v. 13, n. 10, p. 1089-1098, 2017.

VARONA-URIBE, M. E. *et al.* Exposure to pesticide mixtures and DNA damage among rice field workers. **Archives of environmental & occupational health**, v. 71, n. 1, p. 3-9, 2016.

VIEIRA, G. de F. *et al.* Electro-oxidation of wastewater from a beauty salon: The influence of electrolyte type in the removal of organic load and energy consumption. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 177, p. 1260-1271, 2023.

VIRGILIO, F. D. *et al.* Cytolytic P2X purinoceptors. **Cell Death & Differentiation**, v. 5, n. 3, p. 191-199, 1998.

WALLACE, K. B.; STARKOV, A. A. Mitochondrial targets of drug toxicity. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 40, n. 1, p. 353-388, 2000.

WANG, L. S.; STONER, G. D. Anthocyanins and their role in cancer prevention. **Cancer Letters**, v. 269, n. 2, p. 281–290, 2008. DOI: 10.1016/j.canlet.2008.05.020.

WYLLIE, A. H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. **Nature**, v. 284, n. 5756, p. 555-556, 1980.

XU, J. *et al.* Bioassay: A useful tool for evaluating reclaimed water safety. **Journal of Environmental Sciences**, v. 88, p. 165-176, 2020.

ZHAI, X. *et al.* Reversal effect of bufalin on multidrug resistance in K562/VCR vincristine-resistant leukemia cell line. **Journal of Traditional Chinese Medicine**, v. 34, n. 6, p. 678-683, 2014.

ZHANG, X. Q.; YIN, L. H.; TANG, M.; PU, Y. P. ZnO, TiO₂, SiO₂, and Al₂O₃ Nanoparticles-induced Toxic Effects on Human Fetal Lung Fibroblasts, **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 24, p. 06, 2011.

ZHU, R. R. *et al.* A Novel Toxicological Evaluation of TiO₂ Nanoparticles on DNA Structure. **Chinese Journal of Chemistry**, v. 25, n. 7, p. 958–961, 2007. DOI: 10.1002/cjoc.200790186. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/cjoc.200790186>. Acesso em: 16 abr. 2021.

ARTIGO 4 - TOXICITY OF BEAUTY SALON EFFLUENTS CONTAMINATED WITH HAIR DYE ON AQUATIC ORGANISMS.

Letícia C. Gonçalves ^{1,2} Matheus M. Roberto ^{2*} Paloma V. L. Peixoto ^{3,4}, Cristina Viriato ^{3,5},
Adriana F. C. da Silva ¹, Valdenilson J. A. de Oliveira ¹, Mariza C. C. Nardi ², Lilian C. Pereira
^{3,6}, Dejanira de F. de Angelis ¹ and Maria A. Marin-Morales ^{1*}

¹Department of General and Applied Biology, Institute of Biosciences, São Paulo State University (Unesp), Av. 24-A, 1515, Bela Vista, Rio Claro 13506-900, SP, Brazil

²University Center of Hermínio Ometto Foundation (FHO), Av. Dr. Maximiliano Baruto, 500, Jardim Universitário, Araras 13607-339, SP, Brazil

³Center for Evaluation of Environmental Impact on Human Health (TOXICAM), Botucatu Medical School, São Paulo State University (Unesp), Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro, s/n, Rubião Júnior, Botucatu 18618-687, SP, Brazil

⁴Department of Pathology, Botucatu Medical School, São Paulo State University (Unesp), Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro, s/n, Rubião Júnior, Botucatu 18618-687, SP, Brazil

⁵Department of Bioprocesses and Biotechnology, São Paulo State University (Unesp), R. Dr. José Barbosa de Barros, 1780, Fazenda Experimental Lageado, Botucatu 18610-307, SP, Brazil

⁶School of Agriculture (FCA), São Paulo State University (Unesp), Av. Universitária, 3780, Fazenda Experimental Lageado, Botucatu 18610-034, SP, Brazil

* Authors to whom correspondence should be addressed.

Artigo publicado: GONÇALVES, L.C. *et al.* Toxicity of beauty salon effluents contaminated with hair dye on aquatic organisms. **Toxics**, v. 11, n. 11, artigo 911, 2023;
<https://doi.org/10.3390/toxics11110911>

Original submission received: 5 August 2023 / Revised: 10 September 2023 / Accepted: 28 September 2023 / Published: 7 November 2023

(This article belongs to the *Special Issue Environmental Pollutants Toxicity Mechanism and Safety Testing: Zebrafish as a Model Organism*)

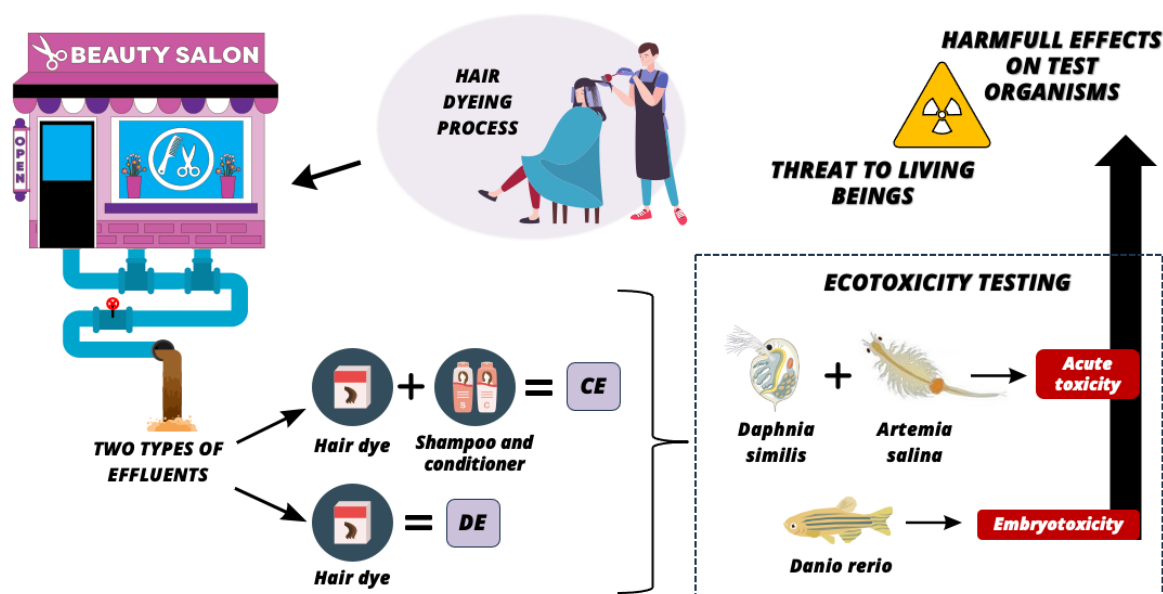
Abstract

Cosmetic residues have been found in water resources, especially trace elements of precursors, couplers, and pigments of hair dyes, which are indiscriminately disposed of in the sewage system. These contaminants are persistent, bioactive, and bioaccumulative, and may pose risks to living beings. Thus, the present study assessed the ecotoxicity of two types of effluents generated in beauty salons after the hair dyeing process. The toxicity of effluent derived from capillary washing with water, shampoo, and conditioner (complete effluent—CE) and effluent

not associated with these products (dye effluent—DE) was evaluated by tests carried out with the aquatic organisms *Artemia salina*, *Daphnia similis*, and *Danio rerio*. The bioindicators were exposed to pure samples and different dilutions of both effluents. The results showed toxicity in *D. similis* (CE₅₀ of 3.43% and 0.54% for CE and DE, respectively); *A. salina* (LC₅₀ 8.327% and 3.874% for CE and DE, respectively); and *D. rerio* (LC₅₀ of 4.25–4.59% and 7.33–8.18% for CE and DE, respectively). Given these results, we can infer that hair dyes, even at low concentrations, have a high toxic potential for aquatic biota, as they induced deleterious effects in all tested bioindicators.

Keywords: ecotoxicity; aquatic ecotoxicology; emerging environmental contaminants; cosmetic residues; zebrafish embryotoxicity; lethality test.

Graphical Abstract



1. INTRODUCTION

The aquatic environment is highly complex, characterized by diverse ecosystems such as rivers, lakes, estuaries, seas, and oceans [1]. However, this classification is simplistic, because these ecosystems are dynamic structures with specific characteristics [2]. When pollutants are released into the environment, they can disperse inside a distinct compartment, such as soil, water, and air, and be transported among them. Despite fabrication processes that generate distinct effluents, generally, cosmetics are released as domestic sewage, bypass the conventional wastewater treatment system (when present), and reach different receiving waters, such as freshwater bodies, and then marine environments [3]. During the movement of a contaminant, several interactions between abiotic and biotic factors occur, reaching exposed organisms. Once it enters into the biota, bioaccumulation becomes an impairment factor for living beings, and through the trophic chain, biomagnification worsens the scenario [4,5].

The integrity of aquatic ecosystems has been disturbed by anthropogenic activities, derived from changes in lifestyle, social context, agriculture, industry, and technological advances [6]. The changes in these environments happen directly or indirectly, and their ecotoxicological damage is unpredictable and of high complexity [7]. Hüttl et al. [7] also highlight that the maintenance of environmental quality will only be possible if interdisciplinary studies are implemented, which include a multifaceted view of the complexity of the environmental problem.

Regarding water sustainability, there is also a concern about establishing a water ethics program, with proposals for the conduct of rigid decisions, especially for natural environments that are little or not fully known [7]. This call for a new water ethics policy is also based on concerns about the increased degradation of water systems [7,8]. To attend to the concept of “one health” (the decompartmentalization of human, animal, and ecosystem health) and reveal unknown impacts, the interlocution among different study areas should be strengthened, such as environmental chemistry, human toxicology, and ecotoxicology [9].

In recent years, some studies of aquatic ecosystems have shown the presence of traces of dyes, precursors, and couplers, whose origin would be from the process of hair dyeing [10]. The effluents generated in beauty salons are, in most cases, directly disposed of into the environment or incorporated into the urban sewer system. The characteristics of this effluent are much closer to industrial than to domestic effluent [5]. However, as the conventional system used in sewage treatment plants is not completely efficient for the removal of this pollutant, many cosmetic products remain in surface waters [5,11].

As an example, the work of Yurtsever [12] describes how glitter particles from some cosmetics are found in the environment, first in sewage sludge, then in rivers (water and sediment), and finally in oceans. Hair dyes also constitute a serious environmental threat, and their effluents must be investigated.

The indiscriminate disposal of toxic agents in the environment can be characterized as a risk factor for the survival of organisms [13,14], in a more intensive way for aquatic species whose entire life cycles can be assumed to be aqueous [15]. Considering the current high consumption of hair dyes and the dyeing process, beauty salons generate a large volume of complex effluents (with compounds belonging to groups of preservatives, humectants, organic solvents, surfactant oils, and also with dyes based on heavy metals, such as lead, cadmium, chromium, and arsenic) [16,17].

Studies of water quality and the polluting load of effluents are usually done by physicochemical analyses [18]. However, this type of evaluation is very limited, as the analyses

are insufficient to estimate the real toxic potential of a given contaminant [19,20]. On the other hand, ecotoxicological studies allow the meticulous assessment of the toxicity of both effluents and their receiving bodies. These tests are performed with aquatic bioindicators of high sensitivity, whose patterns of effects may reflect the possible damages on other biological categories [21]. Bioindicators are tools widely used by environmental regulatory bodies [18] to identify effects on the aquatic biota of inland, estuarine, and marine waters, and can be used both in laboratory and field conditions [22].

With these tests, it is also possible to establish permissible limits for different substances, as well as to evaluate the impact of complex mixtures on the aquatic organisms of the receiving bodies [19]. According to Domingues and Bertoletti [23], when conducting ecotoxicological tests on aquatic organisms, it is important to use taxonomic groups that are representative of the ecosystem. Also, it is recommended to use organisms from different trophic levels to get an idea of the natural sensitivity variability of organisms in the ecosystem under consideration.

Given the health and environmental problems related to hair dyes, it is essential to conduct studies that help in understanding the interaction of these compounds with the aquatic biota, as well as the possible damage that these contaminants may induce in living beings in general. In the present study, by *in vivo* tests, the toxicity and embryotoxicity of two types of effluents generated in the hair dyeing process were evaluated on three bioindicators of various trophic levels: *Artemia salina*, *Daphnia similis*, and *Danio rerio*.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Obtaining, Storing, and Determining Effluent Samples

To perform the tests, effluents generated from the hair dyeing process were collected from a beauty salon (city of Rio Claro, São Paulo, Brazil). Two types of effluents were collected under the authorization of the owner of the establishment and its customers: (1) effluent derived from the freshly dyed hair washed using water, shampoo, and conditioner (complete effluent—CE); and (2) effluent composed of wash water and only the dye removed from the hair (dye effluent—DE), i.e., without shampoo and conditioner. Brown hair dye was applied to the hair according to the manufacturer's instructions, for 40 min. Then, a complete wash was done (removal of excessive dye by washing with water, shampoo, and conditioner), generating CE. Following the same protocol of the dyeing process on another person, the washing was performed only with tap water (until the complete removal of the dye that was not fixed to the hair), generating DE. To remove possible impurities, such as hair strands, the samples were

filtered by qualitative filter paper (80 g/m²) and stored, separately, in properly identified polypropylene carboys (20 L capacity—much more effluent was discarded). To avoid the degradation of the components of the effluents until the assembly of the tests, samples were stored in a freezer (−10 °C).

2.2. Treatments

The bioassays were performed with both types of effluents (DE and CE), followed by their respective control tests. The bioassays performed with *A. salina* and *D. rerio* were developed with the same concentrations/dilutions of DE and CE, as follows: pure sample (100%) and dilutions of 3.125, 6.25, 12.50, 25.00, and 50.00%. The bioassays with *D. similis* were performed with pure sample (100%) and dilutions of the effluents (1.00, 3.00, 3.125, 6.25, 12.50, 25.00, and 50.00%). For DE and CE EC₅₀ determination, 0.5 and 5.0% treatments were added, respectively, for test validation.

2.3. Bioassays

2.3.1. Test Method with *Artemia salina*

The bioassays of acute ecotoxicity with *Artemia salina* followed the guideline of ABNT NBR 16530/2016 [24]. For greater reliability of the results obtained in the test, larvae (nauplii) were obtained from the hatching of selected and vacuum-packed cysts (*Artemia salina* RN[®], Natal, Brazil) acquired in an aquarium store. The cysts and nauplii were maintained in optimal conditions of hatching and growth (25.0 ± 2.0 °C, salinity around 3.2%, and slightly alkaline pH ~8.0).

The experiment was carried out in a glass aquarium of 19 × 10 × 15 cm dimensions, with one of the walls covered by aluminum foil. The volume of the aquarium was separated into two parts by a partition plate, uniformly perforated (~2 mm in diameter, spaced by 4 mm). The aquarium received 500 mL of reconstituted water (synthetic seawater), prepared by dissolving commercial sea salt (Blue Treasure Reef Sea[®], Qingdao Sea-Salt Aquarium Technology Co., Ltd., Qingdao, China) in distilled water, according to the manufacturer's guidelines.

The aquarium was accommodated in a biological oxygen demand (BOD) incubator with the temperature controlled at 25.0 ± 2.0 °C, constant aeration, and lighting. One of the parts of the aquarium received constant illumination (aquarium wall without aluminum foil cover), i.e., it was exposed to a fluorescent lamp of 15 W. The other part, covered with aluminum foil, and therefore without lighting (dark), received 0.3 g/L of *A. salina* cysts. The light/dark system of

the aquarium was prepared to attract the newly hatched larvae to the light side, forcing them to cross the partition (through the holes) due to the positive phototropism they have, standardizing the organisms used in the test. Incubation was carried out for a period of 48 h.

After the incubation period, the *A. salina* nauplii were separated and exposed to different effluent dilutions (described in Section 2.2) for 48 h in a static system. Test tubes received 10 individuals and 10 mL of sample, and each treatment was organized in quadruplicate. Through the lethality results, the LC₅₀ of the samples of each effluent was determined, characterizing the concentration responsible for causing death in 50% of the organisms.

The exposure of the organisms was accompanied by a negative control (NC), performed only with reconstituted water. In addition, the sensitivity of the bioindicator was ensured by exposure to a reference substance, sodium dodecyl sulfate (SDS—0.625, 1.25, 2.5, 5.0, 10.0, and 20.0 mg/L), solubilized in reconstituted water.

2.3.2. Test Method with *Daphnia similis*

The acute toxicity bioassays carried out with the microcrustacean *Daphnia similis* followed the guideline ABNT NBR 12713/2016 [25]. The individuals of *D. similis* used in the experiment were obtained from cultures maintained in the Water Toxicity Laboratory, from the Department of General and Applied Biology, São Paulo State University (UNESP), Rio Claro, Brazil. The cultures were maintained following the technical standards recommended by ABNT NBR 12713/2016 [25].

To assess the toxicity of the effluents, a total of five neonates, aged between 6 and 24 h, were exposed to 10 mL of the samples in treatments organized in quadruplicate. Different concentrations of the samples were evaluated (according to Section 2.2), accompanied by a negative control (NC), consisting only of diluted water (culture water of the organisms—hardness 40 mg/L to 48 mg/L and pH in the range of 7.2 to 7.6) [25]. The test tubes containing the organisms were kept in a BOD incubator at 20 ± 2 °C, in the dark, without feeding, for 48 h. At the end of the exposure period, the toxicity of the effluents was evaluated by the number of mobile and immobile organisms (lethality parameter).

2.3.3. FET Test

Zebrafish Maintenance and Spawning

The procedures for the care and use of animals were approved by the Ethiculture, and spawning and test procedures were conducted according to OECD guidelines (OECD No. 236,

Commission, 2013) [26], in the Zebrafish Animal Laboratory located at UNIPEX—Experimental Research Unit of Botucatu Medical School, UNESP, Brazil, approved by CEUA n° 1392/2021.

Adult male and female zebrafish (*Danio rerio*) were kept separately in a recirculating aquaculture system containing mechanical biological filtration and disinfection. The temperature was 26.0 ± 1.0 °C in a 14 h light/10 h dark cycle. Water hardness was approximately 150 mg CaCO₃/L and pH was 6.8 to 8.5. The dissolved oxygen concentration was above 6.0 mg/L. Fish were fed with *Artemia salina* three times daily. Sexually mature male and female zebrafish were transferred into a spawning tank separated by a partition and placed in a dark and quiet environment (2 males:1 female), and breeding began with the presence of light the following day. Approximately 35 min after spawning, fertilized eggs were collected and selected with an inverted microscope (Motic®, AE2000). Viable eggs were selected for the embryotoxicity test.

Fish Embryo Exposure Assays

The Fish Embryo Acute Toxicity (FET) test (OECD No. 236, Commission, 2013) [26] was performed in independent replicates with 24-well plates (SPL Life Sciences), one embryo per well. The experimental design consisted of four treatments with different dilutions for each effluent (DE and CE): 3.125, 6.25, and 12.5%; a negative control (NC) (reconstituted water—ISO-7346); and a positive control (4.0 mg/L 3,4-dichloroaniline). In the NC, 24 embryos were exposed to the ISO-7346 water. On the other plates, 20 eggs were exposed to each different dilution for each effluent (DE and CE), and four eggs in ISO-7346 water were the internal NC. For each effluent, three replicates were used ($n = 3$).

Embryonic development was evaluated at 8, 24, 48, 72, 96, 120, and 144 h post-fertilization (hpf) with an inverted microscope (AE2000, Motic®, Barcelona, Spain). Mortality was recorded daily according to lethality observations: coagulation of embryos, lack of somite formation, non-detachment of the tail, and lack of heartbeat. Microphotographs (24 and 144 hpf) were recorded with an Olympus MVX10 magnifier. Images were processed with Fiji-ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). The LC₅₀ (median lethal concentration—for embryo-lethality) was determined at 24, 96, and 144 hpf for DE and CE, and it was determined whether there was a significant difference in these values between the effluents. For DE LC₅₀ determination, a 0.5% treatment was added for test validation.

2.4. Physicochemical Analysis

Water samples were measured after collection using the Horiba multiparameter probe (Multi Water Quality Checker U-50 Series, Kyoto, Japan). The parameters evaluated by the probe were: temperature, pH, conductivity, turbidity, dissolved oxygen, total dissolved solids, and salinity.

2.5. Spectrophotometric Analysis

The evaluation of the remaining concentration of hair dye in the effluents studied (DE and CE) was performed using UV-visible spectrophotometry (UV-5100, Global Trade Technology[®], Jaboticabal, Brazil). For this, a standard solution was prepared with the commercial mixture at 12.0 g/L, the same used in the hair coloring process to obtain the effluents. Then, the absorbance reading was performed by spectrophotometry, using the external calibration method, to identify the wavelength of maximum light absorption by the mixture. The wavelength corresponding to maximum light absorption occurred at 290 nm. Thus, absorbance readings of the standard solution and different dilutions of the same mixture (0.6, 1.2, 2.4, 4.8, 6.0, and 12.0 g/L) were performed to obtain the standard curve by linear regression. After making the standard curve, an aliquot of each effluent was subjected to centrifugation for 4 min at 484× g (Centrifuge 80-2B, Centribio[®], São Paulo, Brazil), to remove possible impurities, and read at 290 nm. Thus, based on the absorbances obtained, the concentration of the capillary dye mixture of each effluent was determined using the equation of linear regression [27,28,29].

2.6. Statistical Analysis

For *D. rerio* data, the median lethal concentrations of the effluents DE and CE were estimated using the GW-Basic 3.0 Software, according to the “Trimmed Spearman Karber” statistical method [30]. Differences in LC₅₀ values were determined using Student’s t-test. The data obtained in this study were submitted for analysis of variance (one-way ANOVA). Shapiro-Wilk and Levene tests respectively verified the subjects of normality and homogeneity of the variances of the residues. When significant differences between treatments were detected ($p < 0.05$), Tukey’s a posteriori test was used. In the case of non-parametric data, the Kruskal Wallis test was used, followed by the multiple comparison test as an a posteriori test [31].

The determinations of LC₅₀ (*A. salina*) and EC₅₀ (*D. similis*) were performed by the “Trimmed Spearman Karber” method, as described in ABNT NBR 16530/2016 and ABNT NBR 12713/2016, respectively [24,25].

3. RESULTS

3.1. *Artemia salina*

The mortality of the bioindicator *A. salina* for the different dilutions of DE and CE is shown in Table 1. The results indicate mortality of 100% for concentrations of 25, 50 and 100% for both effluents and higher mean percentages for non-lethal DE concentrations. The estimated mean values for LC₅₀ were statistically determined as 3.874% for DE and 8.327% for CE.

Table 1. Mean mortality of *Artemia salina* during the 48-h exposure to different concentrations of DE and CE.

Treatments	DE	CE
NC	0.00%	0.00%
3.125%	22.50%	6.25%
6.250%	33.75%	25.00%
12.500%	41.25%	28.75%
25.000%	100.00%	100.00%
50.000%	100.00%	100.00%
100.000%	100.00%	100.00%
LC ₅₀	3.874%	8.327%

NC: negative control; DE: Dye effluent; CE: Complete effluent (hair dye, shampoo, and conditioner); LC₅₀: average lethal concentration.

3.2. *Daphnia similis*

The mean mortality of *D. similis* exposed to the different dilutions of DE and CE effluents are shown in Table 2. The results indicate mortality of 100% for concentrations of 3.00, 3.125, 6.25, 12.50, 50.00, and 100.00% of the DE. The treatment performed with CE also induced mortality of 100% for the same concentrations, except for 3.00%. The mean EC₅₀ values were statistically determined as 0.54% for DE and 3.43% for CE.

Table 2. Mean mortality of *Daphnia similis* for 48 h exposure to different concentrations of DE and CE.

Tratamentos	DE	CE
NC	0.00%	0.00%
0.50%	45.00%	-
1.00%	90.00%	0.00%
3.00%	100.00%	15.00%
5.00%	-	100.00%
3.13%	100.00%	100.00%
6.25%	100.00%	100.00%
12.50%	100.00%	100.00%
25.00%	100.00%	100.00%
50.00%	100.00%	100.00%
100.00%	100.00%	100.00%
EC ₅₀	0.54%	3.43%

NC: negative control; DE: Dye effluent; CE: Complete effluent (hair dye, shampoo, and conditioner); EC₅₀: average effective concentration.

3.3. FET Test

The LC₅₀ for 24 hpf for zebrafish (*Danio rerio*) embryos exposed to DE was 7.33% (95% confidence interval: 6.25–8.65%) and to CE was 4.59% (95% confidence interval: 3.94–5.36%). At the end of the 144-h post-fertilization exposure, the LC₅₀ was 8.18% (95% confidence interval: 7.13–9.4%) for DE and 4.25% (95% confidence interval: 3.67–4.93%,) for CE. The results of LC₅₀ showed significant differences for all times of exposure (24, 96, and 144 hpf) between DE and CE (Table 3). Embryonic coagulation was the most observed lethal endpoint in DE and CE treatments (Figure 1). High mortality was verified at 24 hpf in the effluents at concentrations $\geq 6.25\%$ (Figure 1a,b; examples of mortality are shown in Figure 1c). The data obtained showed that CE exposure is more toxic than exposure to DE for zebrafish embryo-larval development.

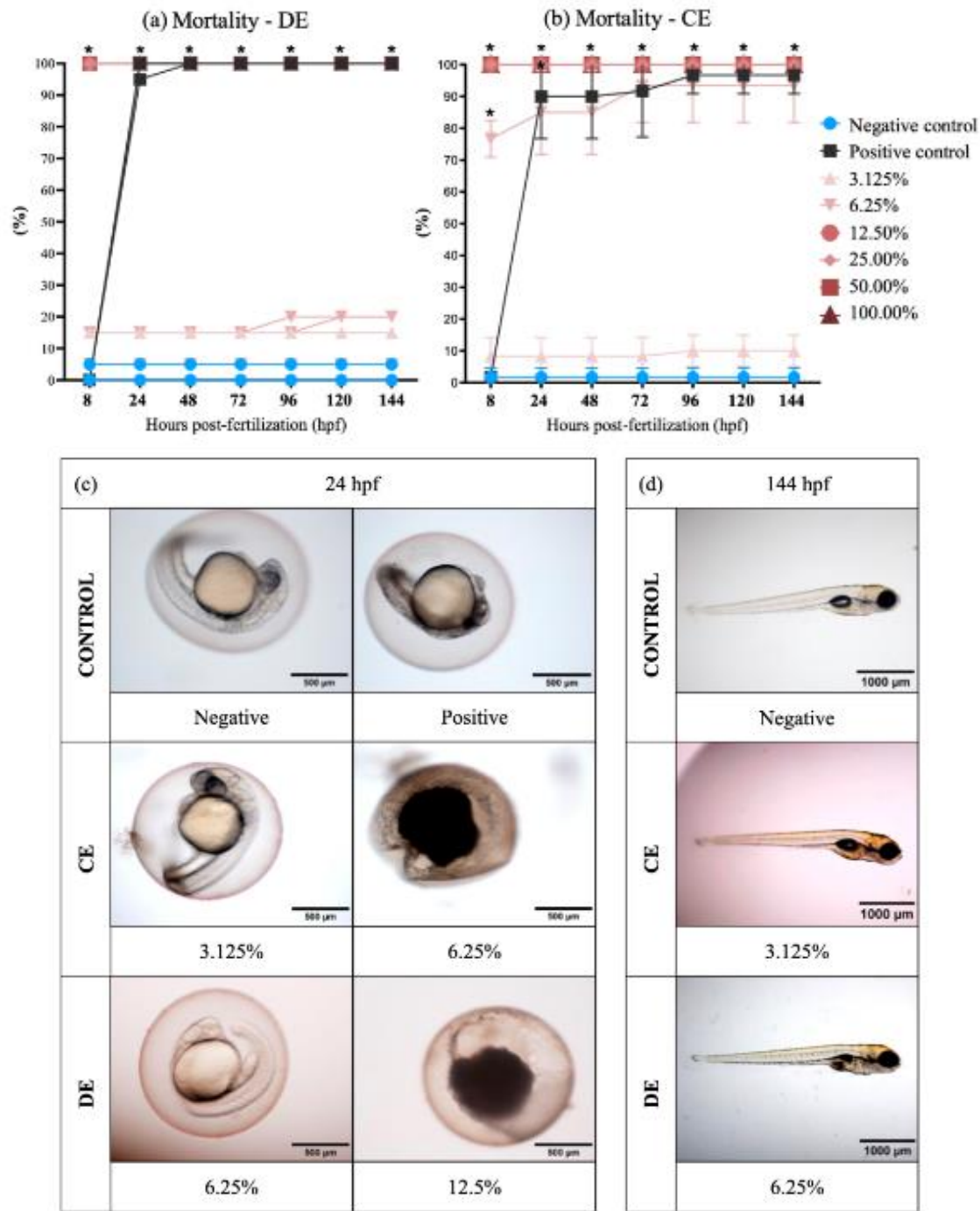


Figure 1. Mortality in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. (a,b) Graphic representation of zebrafish embryo and larvae mortality, expressed by the proportion of coagulated eggs and absence of heartbeats per effluent, concentration, and exposure time. The negative control corresponds to the healthy embryos not exposed to effluents. Significant mortality of exposed zebrafish ($p \leq 0.05$) relative to the control is identified with (*). Prepared with GraphPad Prism 5.01 software. (c) Micrographs showing zebrafish mortality: at the 6.125% dilution compared to negative control and the 3.125% dilution in the associated effluent (CE); and at the 12.5% dilution compared to the negative control and the 6.25% dilution in the non-associated effluent (DE) (2 $\times$ magnification on MVX10 microscope, Olympus, Tokyo, Japan). Photographs are representative (n = 3) and were taken at 24 hpf. (d) Micrographs showing zebrafish survival from dilutions of 3.125% in the associated effluent (CE) and 6.25% in the non-associated

effluent (DE) at the end of the exposure (1.6× magnification on Olympus MVX10 microscope). Photographs are representative (n = 3) and were taken at 144 hpf.

Table 3. Results of LC₅₀ after exposure to DE and CE during different periods (24, 96, and 144 hpf).

Stage (Kimmel, 1995)	Exposure period (hpf)	DE		CE	
		Test range (%)	LC ₅₀ (%)	Test range (%)	LC ₅₀ (%)
Pharyngula	24	0.5 – 12.5	6.59 (5.24-8.30)	3.125 – 12.5	4.93 (4.11-5.92)
Early larva	96	0.5 – 12.5	6.59 (5.24-8.30)	3.125 – 12.5	3.90 (3.29-4.61)
Early larva	144	0.5 – 12.5	6.37 (5.02-8.07)	3.125 – 12.5	3.90 (3.29-4.61)

Hpf: Hours Post-Fertilization; DE: Dye effluent; CE: Complete effluent.

The survivor embryos in CE treatments showed no malformations significantly up to 144 hpf (Figure 1d), but some results showed pericardial and yolk sac edema in embryos of DE treatments (Figure 2). The highest percentage of malformations was present at 48 h. After 120 h, the edema disappeared, showing an adaptive response of the embryo.

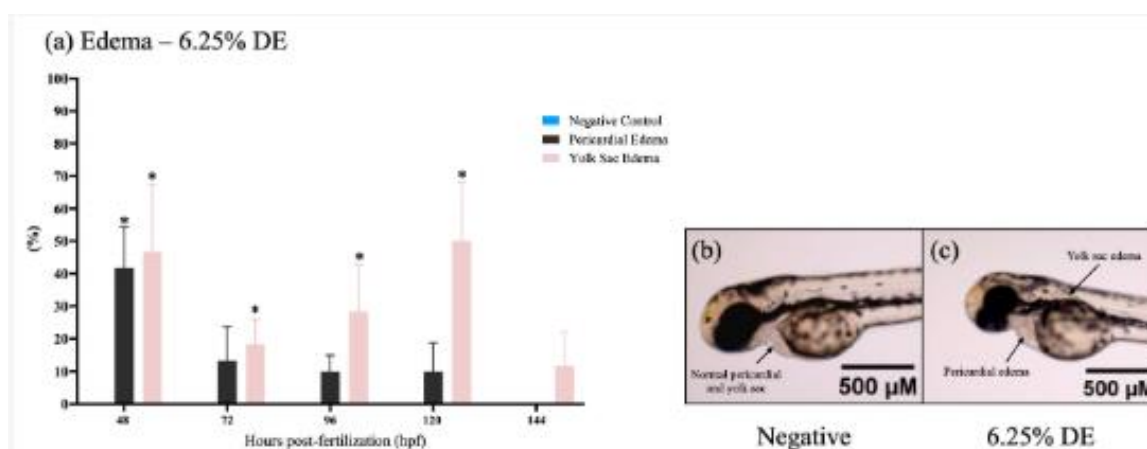


Figure 2. Pericardial and yolk sac edema in zebrafish (*Danio rerio*) (a) Graphic representation of pericardial edema rate and yolk sac edema rate in zebrafish larvae expressed by the incidence of this effect by DE dilution 6.25%, and exposure time. The negative control corresponds to the healthy embryos not exposed to effluents. The incidence of exposed zebrafish was significant if ($p \leq 0.05$) relative to the control, as identified with (*). Prepared with GraphPad Prism 5.01 software. (b) Micrograph of the absence of pericardial edema and yolk sac edema in the negative control. (c) Micrograph showing the presence of pericardial edema and yolk sac edema in zebrafish exposed to DE (non-associated) effluent at 6.25% dilution (1.6× magnification on Olympus MVX10 microscope). Photographs are representative (n = 3) and were taken at 72 hpf.

3.4. Physicochemical Analysis

The results of the physicochemical analyses of the DE and CE samples, obtained with the multiparameter probe (Table 4), showed differences in turbidity, for CE, and in dissolved oxygen and turbidity for DE, when compared with two Brazilian laws established by the National Environment Council (Conselho Nacional do Meio Ambiente—CONAMA—n° 357/2005 e n° 430/2011) [32,33] and an international document from the European Union concerning urban wastewater treatment (Council Directive n° 91/271/EEC of 21 May 1991; EUR-LEX, 1991) [34].

Table 4. Results of physicochemical analyses of DE and CE samples, obtained with the multiparameter probe.

Parameters	Samples		Values recommended by Brazilian and international legislation		
			CONAMA n° 357/2005	CONAMA n° 430/2011	Directive 91/271/EEC of 21/05/1991
	DE	CE			
Temperature (°C)	17.89	19.46	< 40.0	< 40.0	---
pH	6.16	5.14	5.00 to 9.00	5.00 to 9.00	---
Conductivity (μ S/cm)	391.0	204.0	---	---	---
Dissolved oxygen (mg/L)	2.37	5.60	≥ 5.00	---	---
TSS (g/L)	0.254	0.126	≤ 0.5	---	35-60
Turbidity (NTU)	369	173	≤ 100	---	---
Salinity	0.01 %	0.0 %	$\leq 0.5\%$	---	---

DE: Dye effluent; CE: Complete effluent; TSS: Total soluble solids; EEC: European Economic Community.

3.5. Spectrophotometric Analysis

The absorbance measured for DE was 0.192, and that for CE was 0.342. Thus, the concentration of the hair dye mixture was determined by the analytical curve (Figure 3), resulting in values of 1.505 g/L for CE and 0.895 g/L for DE.

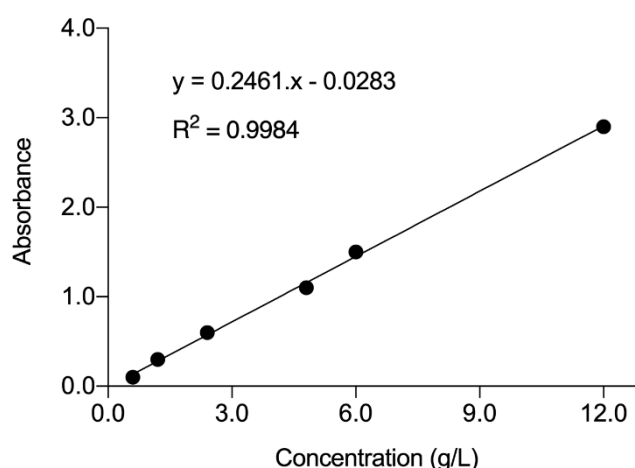


Figure 3. Standard curve for hair dye mixture obtained by linear regression. Readings were performed at 290 nm, the most suitable wavelength for maximum light absorption.

4. DISCUSSION

The assessment of the polluting loads of the studied effluents (DE and CE) was performed by physicochemical characterization, measured by a multiparameter probe. In this analysis, the parameters of pH, temperature, conductivity, dissolved oxygen, total soluble solids, turbidity, and salinity were considered. These parameters obeyed Resolution No. 357/2005 of CONAMA, which classifies Brazilian freshwater bodies into different categories, according to the water quality standards [32].

Another legislation used was Resolution No. 430/2011 of this same Brazilian council, which provides conditions, parameters, and standards for the discharge of effluents into water bodies [33]. According to the few reference parameters of this resolution, it is noted that the DE and CE presented temperature, pH, and salinity within the acceptable range. In addition to these Brazilian legislations used to classify the effluents studied here, the European Union Council Directive No. 91/271/EEC [34] was also considered to evaluate the quality of the effluents, regarding the requirements recommended at the international level.

The pH measured for both effluents (6.19 and 5.14 for DE and CE, respectively) is within the standards defined by Resolution 357/2005 [32] and by Resolution 430/2011 [33], which determines a pH range for effluents between 5.0 and 9.0. The determination of this pH range is due to the water quality safety policy because values below 5.0 or above 9.0 can cause a decrease in cellular activity, making survival impossible for aquatic organisms [32,33]. The pH is considered an important variable of water quality, as it influences several biological and chemical processes. Changes in pH can affect the survival of aquatic organisms as they have

pH-dependent metabolic activities [35]. According to Omer [36], most aquatic organisms are already adapted to a specific pH and changes can impair their survival; a pH below 3.0 is commonly fatal. Also, this author highlights that pH affects the solubility of other chemicals in water, which endangers the exposed biota. The maintenance of the recommended values for this parameter is essential, as preserving the water quality also directly meets two of the goals established by the UN 2030 Agenda (goals 6 and 14) [37] and the water ethics policy [7,8].

According to the Annual Inland Water Quality Report in the State of São Paulo [38], Brazil, conductivity can be considered the numerical expression of the capacity of water to conduct electric current. That is, considering a freshwater environment, the conductivity value expresses the quantity of salt in the water, representing an indirect measure of pollutant concentration. Conductivity also acts as an indication of changes in water bodies, because this parameter tends to be constant when there is no anthropic interference in the environment [39].

Although there is no legislation that defines effluent conductivity limits, impacted environments are those that have conductivity levels higher than 100 $\mu\text{S}/\text{cm}$ [40]. The DE and CE samples presented conductivity values higher than 100 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (391.0 and 204.0 $\mu\text{S}/\text{cm}$, respectively). Therefore, because this parameter is considered an indirect measure of the concentration of pollutants [40], it can be inferred that effluents contaminated with hair dye can compromise the water quality of their receiving water bodies.

Rodrigues et al. [41] suggest that the amounts of dye that are fixed in the hair may vary according to the type of dyed hair, a fact that could generate variation in the composition of the effluents of the hair washes. Considering this concern, in the present study a spectrophotometric analysis was performed to quantify the presence of brown hair dye in each of the effluents evaluated. In this analysis, a higher concentration of dye was observed in the CE (1.505 g/L) than in the DE (0.895 g/L), which can be explained by the use of shampoo during hair washing. Professional shampoos have ingredients in extremely concentrated forms or special anionic or cationic detergents, capable of removing the residues of chemicals applied in the hair coloring process [42].

Another physicochemical parameter considered in the present study was turbidity. This parameter scores the presence of solid particles in suspension [43]. However, although the parameters turbidity and total solids are associated with each other, they are not absolutely equivalent [44]. In the analysis performed with the studied effluents, both presented high turbidity values (369 NTU and 173 NTU for DE and CE, respectively) for Class 2 rivers, compared to the recommended value of ≤ 100 NTU (Resolution No. 357/2005). High turbidity

values tend to compromise light scattering, which affects the process of photosynthesis and, consequently, the functioning of aquatic ecosystems [45].

Nkansah et al. [46] attribute the high turbidity of salon effluents to the cosmetics components, such as volatile organic compounds, methacrylates, phthalates, sulfates, parabens, and formaldehyde. The authors also highlight that the turbidity derived specifically from hair dyeing processes is related to the excess of emulsifiers, composed of precursor agents, couplers, and oxidants. The altered turbidity results of the DE and CE corroborate the pH and conductivity data, thus reaffirming the polluting potential of hair dyes for aquatic environments.

According to Article 18 of the V Decree No. 8468/1976 [47], effluents from any polluting source can only be released into water resources, directly or indirectly, if they present dissolved oxygen (DO) concentration greater than 5.0 mg/L. The DO value of CE (5.60 mg/L) was very close to the reference value mentioned above, whereas DE presented a value considerably lower (2.37 mg/L) than recommended by Brazilian law. This low concentration of DO is worrisome because this parameter is a limiting factor for the maintenance of aquatic life, as well as for the processes of self-purification of natural aquatic systems [48,49,50]. Oxygen is necessary for aerobic organisms [36], so its depletion impairs the physiological processes and metabolic rate of aquatic species [51]. These data corroborate the records for pH, conductivity, and turbidity, confirming, once again, the concern of releasing these effluents directly into water bodies.

The effluents analyzed presented characteristics that can compromise the receiving water body, especially if released without treatment and in low-flow rivers. However, as the composition of salon effluents may vary according to the hair coloring process and the use of additional products, traditional physicochemical analyses serve only to identify and quantify the present compounds, but not to evaluate the biological effects and their potential risk [52,53]. Thus, physicochemical analyses are important as auxiliary information to ecotoxicity tests.

Aquatic ecotoxicity analyses should be done in a multifaceted way, with bioindicators of distinct taxonomic groups and different trophic levels [23]. The analyses should also consider the variability of the organisms' sensitivity and the possible impacts on the ecosystem. The species *Daphnia similis*, *Artemia salina*, and *Danio rerio* have been successfully applied in this type of evaluation, so they were used as bioindicators of this study.

The species *D. similis* is a freshwater microcrustacean (order *Cladocera*), also known as a water flea. It is a species widely used in ecotoxicity tests because of its place in the aquatic trophic chain as an important food source for fish [54,55,56]. The organism has a relatively short life cycle, is easy to grow in the laboratory, and, due to its small size, requires low volumes

of samples to perform the tests. In addition, it is an organism that presents high sensitivity to several aquatic contaminants [57,58,59].

The assays developed with *D. similis* showed a high sensitivity to both samples (DE $EC_{50} = 0.54\%$; CE $EC_{50} = 3.43\%$), with DE being more toxic than CE for this species. Associating these EC_{50} results with the physicochemical profile, it is possible to link the higher toxicity of DE with the higher turbidity (369 NTU), higher conductivity (391.0 $\mu\text{S}/\text{cm}$), and lower DO concentration (2.37 mg/L) of this effluent. These results corroborate the data of Melo et al. [53,60], who also reported higher acute toxicity to *D. similis* when exposed to effluents from the hair products industry, whose turbidity ranged from 313 to 5000 NTU.

Another microcrustacean used in the ecotoxicity evaluations of this study was *A. salina*. This saltwater microcrustacean is widely used as live food for small fish, which are the main representatives of secondary consumers in the food chains of marine environments [61,62]. This species of the order Anostraca is considered a good indicator of toxicity due to its short life cycle (2 to 4 months); high sensitivity to toxic substances; small size (8 to 12 mm for adults); high adaptability to various test conditions; low cost and rapid response test; and availability of commercial cysts that can be stored and used for long periods [63,64,65,66,67]. Based on the results presented here, this bioindicator showed a higher ecotoxicity for DE ($LC_{50} = 3.874\%$) when compared to CE ($LC_{50} = 8.327\%$). Although the results obtained in this evaluation with *A. salina* were, in general, similar to those of *D. similis*, the latter was more sensitive. Studies conducted in joint trials with *Daphnia* sp. and *Artemia* sp. by de Vega et al. [68] and Favilla et al. [69] also showed higher sensitivity in *Daphnia* sp. However, the direct comparison of the sensitivity of both species should be performed with great caution because there is a difference in the complexity of these test organisms.

Fish can also be used as bioindicators of toxicity tests. Among the most used fish species in ecotoxicology is *D. rerio*, popularly known as zebrafish [70,71,72]. Zebrafish have characteristics that make them an excellent vertebrate animal model for toxicity assessment, such as small size; easy maintenance; high reproductive rate; easily observable and quantifiable behavior; and having about 70% genetic homology with mammals [73,74,75].

The bioassays with *D. rerio* performed in this study showed higher toxicity to CE compared to DE. We also observed an increase in toxicity after 144 h of exposure to both effluents (DE: 24 hpf – $LC_{50} = 6.59\%$; 96 hpf – $LC_{50} = 6.59\%$; 144 hpf – $LC_{50} = 6.37\%$ and CE: 24 hpf – $LC_{50} = 4.93\%$; 96 hpf – $LC_{50} = 3.90\%$; 144 hpf – $LC_{50} = 3.90\%$). Generally, $\text{TiO}_2\text{-NP}$ is used in cosmetic products, mainly in the production of pigments [76,77], so the toxicity observed in this assay may be associated with the presence of these compounds in the studied

hair dye (see the cosmetics ingredients in Supplementary Material Table S1). There is now a growing concern about the harmful effects of these nanoparticles, due to their ability to associate with colloids naturally present in the aquatic environment [77].

In this context, the greater toxicity presented by the CE can be attributed to the association of TiO₂-NP with the organic matter of this effluent, since it presents, in addition to the components of the dye, ingredients of the shampoo and conditioner. Thus, it is possible to infer that the association of TiO₂-NP with the components from shampoo and conditioner increases the toxicological potential of CE. According to Vale et al. [78], TiO₂-NP can interact with molecules of the biotic and abiotic environment of natural systems, generating effects that remain unknown. Adam et al. [79] warn that the reactivity of TiO₂-NP with other elements is one of the most important processes to understand and predict how these particles are transported in the environment and what could be their potential effects on organisms. According to the study developed by Zhu et al. [62], exposure to TiO₂-NP resulted in toxic effects on embryos and larvae of *D. rerio*, which corroborates the information and discussions of the present study.

Egg mortality was another endpoint evaluated, and the egg coagulation process was evident after 144 hpf of exposure to DE (12.5%) and CE (3.125 and 6.25%). Some studies reinforce that the toxicity of dyes may be a result of the action of TiO₂-NP. According to Chen [80] and Clemente et al. [81], TiO₂-NP tend to adhere to the chorion of the egg, forming a white and black outer layer. This event was also observed in this study (Figure 1c), more intensely for CE exposure. This uncommon structure may have caused the coagulation of the eggs and the embryonic development disruption, observed in the highest concentrations of both effluents.

There is evidence that TiO₂-NP can adhere to the chorion of the embryo, being absorbed and evenly distributed across the tissues of the fish, without any tissue specificity [82]. Also, some studies cite that TiO₂-NP toxicity would be caused by dyspnea and hypoxia, resulting from their adsorption to the surfaces of respiratory organs and subsequent tissue damage [83,84].

The increase in toxicity, which occurred in a time-dependent manner for both effluents, can also be attributed to the interaction of TiO₂-NP and chorion. Ma and Diamond [85] suggest that this interaction may interfere with the oxygen transport process and that waste products may generate reactive oxygen species (ROS). Among the possible changes in redox balance, TiO₂-NP may accelerate the production of hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$), through the reactions of Fenton and Haber–Weiss, because it is based on a transition metal. TiO₂-NP can also dissociate into cations, promoting competition with enzymatic factors for the allosteric site of superoxide

dismutase, causing its inhibition [86,87]. Thus, it is estimated that the production of ROS, over the exposure time, may cause an oxidative disturbance and, consequently, potentiate the toxicity of both DE and CE.

In addition, edema of the pericardium and yolk sac was observed after 72 hpf when exposed to 6.25% of DE. According to the literature, edema is characterized as an abnormal accumulation of fluid in any tissue of the body [88]. The appearance of pericardial edema may be associated with cardiac dysfunction, acting as an indicator of osmotic or metabolic dysfunction, which is often correlated with the extravasation of endothelial vessels [89,90].

Verma et al. [91] found morphological and anatomical changes in zebrafish when the animals were treated with lower ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) and higher ($250 \mu\text{g mL}^{-1}$) concentrations of TiO_2 . In addition, the authors also observed the presence of abnormalities, such as deformation of the chorion and yolk sac at 48 hpf, whereas flexed tails, notochord malformation, and abnormal heart development were identified at 96 hpf. These effects were related to the accumulation of TiO_2 -NP in the different tissues of the animals [91]. In their review work, Roberto and Christofolletti [92] point out additional studies regarding the possible effects of TiO_2 -NP on chordate animals, such as *D. rerio*, *Pimephales promelas*, and *Xenopus laevis*.

Therefore, the endpoints adopted in the environmental toxicity tests presented in this work clearly demonstrate that the effluents containing hair dyes induced significant losses in the three test organisms. Although the effects varied among the bioindicators, the effluents containing capillary dyes acted on multiple targets, which suggests that they could compromise the population dynamics of aquatic ecosystems.

5. CONCLUSIONS

Considering all of the results reported here, we can conclude that the effluents generated in beauty salons after the use of hair dye (in this case, the brown color), associated or not with shampoo and conditioner, present high toxic potential concerning the aquatic biota as they induced deleterious effects to all studied organisms (*Daphnia similis*, *Artemia salina*, and *Danio rerio*).

Among the species used in the present study, *D. similis* was the one with the highest sensitivity, followed by *A. salina* and *D. rerio*. Although it was possible to determine and differentiate the toxic sensitivities of each indicator, the tests performed with *D. rerio* allowed a slightly better understanding of the effects of hair dye effluents. However, additional studies are still needed to elucidate the possible mechanisms of action of these compounds on each of the organisms tested.

The ecotoxicological evaluation proposed here was developed through tests performed with organisms of different taxonomic groups and trophic levels, to simulate, in a simplified way, the impacts that hairdressing salon effluents promote in aquatic ecosystems when released into the environment. Our results are corroborated by other toxicity studies performed with hair dyes, so it can be concluded that this class of effluent must receive specific prior treatment before being discarded in the environment. This study also provides support and highlights the need to create water ethics policies, especially concerning emerging contaminants from cosmetics, whose disposal is not yet regulated.

Supplementary Materials

The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/toxics11110911/s1>, Table S1: Components of brown hair dye, shampoo and hair conditioner.

Author Contributions

L.C.G.: Conceptualization, methodology, validation, formal analysis, investigation, resources, writing—original draft preparation, visualization. M.M.R.: Conceptualization, validation, formal analysis, investigation, writing—review and editing, visualization, supervision. P.V.L.P.: Methodology, software, validation, formal analysis, investigation. C.V.: Methodology, software, validation, formal analysis, investigation. A.F.C.d.S.: Methodology, validation. V.J.A.d.O.: Methodology, validation. M.C.C.N.: Methodology, validation, formal analysis. L.C.P.: Conceptualization, writing—review and editing, project administration, supervision, resources, funding acquisition. D.d.F.d.A.: Conceptualization, methodology, resources. M.A.M.-M.: Conceptualization, writing—review and editing, visualization, supervision, project administration, resources, funding acquisition. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding

This research was funded by CNPq—National Council for Scientific and Technological Development, Project PP n306062/2019-4.

Institutional Review Board Statement

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee CEUA of UNESP, Brazil (protocol code n° 1392/2021 of 31 August 2021).

Informed Consent Statement

Not applicable.

Data Availability Statement

The data presented in this study are available upon request from the corresponding authors.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Sieber, G.; Beisser, D.; Bock, C.; Boenigk, J. Protistan and fungal diversity in soils and freshwater lakes are substantially different. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 20025.
2. Saxena, A.; Tiwari, A.; Kaushik, R.; Iqbal, H.M.; Parra-Saldívar, R. Diatoms recovery from wastewater: Overview from an ecological and economic perspective. *J. Water Process. Eng.* **2021**, *39*, 101705.
3. Zhou, Y.; Ashokkumar, V.; Amobonye, A.; Bhattacharjee, G.; Sirohi, R.; Singh, V.; Flora, G.; Kumar, V.; Pillai, S.; Zhang, Z.; et al. Current research trends on cosmetic microplastic pollution and its impacts on the ecosystem: A review. *Environ. Pollut.* **2023**, *320*, 121106.
4. Chowdhury, A.; Naz, A.; Maiti, S.K. Distribution, speciation, and bioaccumulation of potentially toxic elements in the grey mangroves at Indian Sundarbans, in relation to vessel movements. *Mar. Environ. Res.* **2023**, *189*, 106042.
5. Morin-Crini, N.; Lichtfouse, E.; Liu, G.; Balaram, V.; Ribeiro, A.R.L.; Lu, Z.; Stock, F.; Carmona, E.; Teixeira, M.R.; Picos-Corrales, L.A.; et al. Worldwide cases of water pollution by emerging contaminants: A review. *Environ. Chem. Lett.* **2022**, *20*, 2311–2338.
6. Coronado-Apodaca, K.G.; González-Meza, G.M.; Aguayo-Acosta, A.; Araújo, R.G.; Gonzalez-Gonzalez, R.B.; Oyervides-Muñoz, M.A.; Martínez-Ruiz, M.; Melchor-Martínez, E.M.; Barceló, D.; Parra-Saldívar, R.; et al. Immobilized Enzyme-based Novel Biosensing System for Recognition of Toxic Elements in the Aqueous Environment. *Top. Catal.* **2023**, *66*, 606–624.
7. Hüttel, R.F.; Bens, O.; Bismuth, C.; Hoehstetter, S.; Frede, H.-G.; Kümpel, H.-J. Introduction: A Critical Appraisal of Major Water Engineering Projects and the Need for Interdisciplinary Approaches. In *Society-Water-Technology: A Critical Appraisal*

- of Major Water Engineering Projects*; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, **2016**; pp. 3–9.
8. Armstrong, A. Ethical issues in water use and sustainability. *Area* **2006**, 38, 9–15.
 9. Ford, A.T.; Ågerstrand, M.; Brooks, B.W.; Allen, J.; Bertram, M.G.; Brodin, T.; Dang, Z.; Duquesne, S.; Sahm, R.; Hoffmann, F.; et al. The Role of Behavioral Ecotoxicology in Environmental Protection. *Environ. Sci. Technol.* **2021**, 55, 5620–5628.
 10. Christie, R.M.; Morel, O.J.X. *The Coloration of Human Hair. In The Coloration of Wool and other Keratin Fibres*; Lewis, D.M., Rippon, J.A., Eds.; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, 2013; pp. 357–391.
 11. Arman, N.Z.; Salmiati, S.; Aris, A.; Salim, M.R.; Nazifa, T.H.; Muhamad, M.S.; Marpongahtun, M. A Review on Emerging Pollutants in the Water Environment: Existences, Health Effects and Treatment Processes. *Water* **2021**, 13, 3258.
 12. Yurtsever, M. Glitters as a Source of Primary Microplastics: An Approach to Environmental Responsibility and Ethics. *J. Agric. Environ. Ethics* **2019**, 32, 459–478.
 13. Bilal, M.; Mehmood, S.; Iqbal, H.M.N. The Beast of Beauty: Environmental and Health Concerns of Toxic Components in Cosmetics. *Cosmetics* **2020**, 7, 13.
 14. Iqbal, F.; Qureshi, I.Z.; Ali, M. Histopathological changes in the kidney of common carp, *Cyprinus carpio*, following nitrate exposure. *J. Res.* **2004**, 15, 411–418.
 15. Wang, W.X. Incorporating exposure into aquatic toxicological studies: An imperative. *Aquat. Toxicol.* **2011**, 105, 9–15.
 16. Pavithra, K.G.; Jaikumar, V. Removal of colorants from wastewater: A review on sources and treatment strategies. *J. Ind. Eng. Chem.* **2019**, 75, 1–19.
 17. Maifadi, S.; Mhlanga, S.D.; Nxumalo, E.N.; Motsa, M.M.; Kuvarega, A.T. Carbon nanotube embedded ultrafiltration membranes for the treatment of rapid granular multimedia prefiltered beauty hair salon and municipal wastewater. *Sep. Purif. Technol.* **2021**, 267, 118618.
 18. Freddi, L.A.; Américo-Pinheiro, J.H.P. Ecotoxicidade de Efluentes Para Organismos Aquáticos. *Rev. Científica ANAP Bras.* **2017**, 10, 38–48.

19. Zagatto, P.A. Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações. In Proceedings of the 2015: IV Seminário sobre Ecotoxicologia, São José do Barreto, Macaé, RJ, Brazil, 10–12 September 2015
20. Rodrigues-Chaparro, T.R.; Cleto- Pires, E.C. Toxicity evaluation as a tool to assess the performance of an anaerobic immobilized biomass reactor. *Dyna* **2010**, *77*, 284–291.
21. De Paiva Magalhães, D.; Da, A.; Filho, S.F. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos a ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecol. Bras.* **2008**, *12*, 355–381.
22. Martins, T.F.G.; de Ferreira, K.S.; Rojas, I.E.B.; Pompêo, M. *Aspectos da Ecotoxicidade em Ambientes Aquáticos*; Instituto de Biociências da USP: São Paulo, Brazil, 2022; 274p.
23. Domingues, D.F.; Bertoletti, E. Seleção, Manutenção e Cultivo de Organismos Aquáticos. In *Ecotoxicologia Aquática—Princípios e Aplicações*; Editora Rima: São Carlos, Brazil, 2006; pp. 153–184.
24. ABNT—Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 16530. *Ecotoxicologia Aquática—Toxicidade Aguda—Método de Ensaio Com Artemia sp. (Crustacea, Brachiopoda)*; ABNT: Rio de Janeiro, Brazil, 2016.
25. ABNT—Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 12713. *Ecotoxicologia Aquática—Toxicidade Aguda—Método de Ensaio Com Daphnia sp. (Crustacea, Cladocera)*; ABNT: Rio de Janeiro, Brazil, 2016.
26. OECD. *Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2: Effects on Biotic Systems Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test*; Organization for Economic Cooperation and Development: Paris, France, 2013; Available online: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-236-fish-embryo-acute-toxicity-fet-test_9789264203709-en (accessed on 9 January 2023).
27. Rocha, F.R.P.; Teixeira, L.S.G. Estratégias Para Aumento de Sensibilidade em Espectrofotometria UV-VIS. *Química Nova* **2004**, *27*, 807–812.
28. Holler, F.J.; Skoog, D.A.; Crouch, S.R.; Pasquini, C.J.; Rohwedder, J.J.R. *Princípios de Análise Instrumental*, 6th ed.; Bookman: Porto Alegre, Brazil, 2009.
29. Canassa, T.A.; Lamonato, A.L.; Ribeiro, A.V. Utilização da Lei de Lambert-Beer Para Determinação da Concentração de Soluções. *J. Exp. Tech. Instrum.* **2018**, *1*, 23.

30. Hamilton, M.A.; Russo, R.C.; Thurston, R.V. Trimmed Spearman-Kärber Method for Estimating Median Lethal Concentrations in Toxicity Bioassays. *Environ. Sci. Technol.* **1977**, *11*, 714–719.
31. Kimmel, C.B.; Ballard, W.W.; Kimmel, S.R.; Ullmann, B.; Schilling, T.F. Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. *Dev. Dyn.* **1995**, *203*, 253–310.
32. CONAMA—Conselho Nacional de Meio Ambiente. Dispõe Sobre a Classificação Dos Corpos de Água e Diretrizes Ambientais Para Seu Enquadramento, Bem Como Estabelece as Condições e Padrões de Lançamentos de Efluentes. Resoluções no 357, de 17 de março de 2005. Available online: https://www.mpf.mp.br/atuacao-tematica/ccr4/dados-da-atuacao/projetos/qualidade-da-agua/legislacao/resolucoes/resolucao-conama-no-357-de-17-de-marco-de-2005/at_download/file (accessed on 29 September 2023).
33. CONAMA—Conselho Nacional de Meio Ambiente CONAMA No 430 de 13 de maio de 2011. Diário Oficial da União. Republica Federativa do Brasil, P.E.B.D. 16 mai. 2011, Ed. 2011. Available online: <https://conexaoagua.mpf.mp.br/arquivos/legislacao/resolucoes/resolucao-conama-430-2011.pdf> (accessed on 29 September 2023).
34. EUR-LEX; Council of the European Communities. *Council Directive of 21 May 1991 Concerning Urban Waste Water Treatment (91/271/EEC)*; Official Journal of the European Communities: Luxembourg, 1991.
35. Osibanjo, O.; Daso, A.P.; Gbadebo, A.M. The impact of industries on surface water quality of River Ona and River Alaro in Oluyole Industrial Estate, Ibadan, Nigeria. *Afr. J. Biotechnol.* **2011**, *10*, 696–702.
36. Omer, N.H. Water Quality Parameters. In *Water Quality—Science, Assessments and Policy*; Summers, J.K., Ed.; IntechOpen: London, UK, 2019.
37. ONU—Organização das Nações Unidas. Take Action for the Sustainable Development Goals. Available online: <https://www.un.org/sustainabledevelopment/sustainable-development-goals> (accessed on 26 July 2023).
38. CETESB. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo Qualidade Das Águas Interiores No Estado de São Paulo. Apêndice C—Significado Ambiental e Sanitário Das Variáveis de Qualidade Das Águas e Dos Sedimentos e Metodologias Analíticas e de Amostragem 2021. Available online: <https://cetesb.sp.gov.br/aguas-interiores/wp-content/uploads/sites/12/2022/11/Apendice-C-Significado-ambiental-e-sanitario-das-variaveis-de-qualidade-das-aguas-e-dos-sedimentos-e-metodologias-analiticas-e-de-amostragem.pdf> (accessed on 26 July 2023).

39. Maciel, M.A.M.; Dos Reis, S.M.; Ramalho, H.M.M. *Águas Potáveis: Padrões de Qualidade, Metodologias Experimentais e Técnicas de Purificação*; Amplla Editora: Campina Grande, Brazil, 2022.
40. Abreu, C.H.M.; Cunha, A.C. Qualidade Da Água e Índice Trófico em Rio de Ecossistema Tropical Sob Impacto Ambiental. *Eng. Sanit. Ambient.* **2016**, *22*, 45–56.
41. Rodrigues, J.C.; Oliveira, J.T.; Pires, M.J.R.; Bernardes, A.M.H. A Estudo Da Oxidação Fotoquímica em Efluentes Líquidos Gerados em Salões de Beleza. In *Simpósio Internacional de Qualidade Ambiental*; ABES-RS: Porto Alegre, Brazil, 2016; pp. 1–11.
42. D’Souza, P.; Rathi, S.K. Shampoo and Conditioners: What a Dermatologist Should Know? *Indian J. Dermatol.* **2015**, *60*, 248.
43. Ameen, H.A. Spring Water Quality Assessment Using Water Quality Index in Villages of Barwari Bala, Duhok, Kurdistan Region, Iraq. *Appl. Water Sci.* **2019**, *9*, 176.
44. BRASIL, Ministério da Saúde; Secretaria de Vigilância em Saúde. *Vigilância e Controle da Qualidade da Água Para Consumo Humano*; Ministério da Saúde: Brasília, Brazil, 2006.
45. Health Canada. *Guidelines for Canadian Drinking Water Quality: Guideline Technical Document—Turbidity*; Water, Air and Climate Change Bureau, Healthy 105 Environments and Consumer Safety Branch, Health Canada: Ottawa, ON, Canada, 2012.
46. Nkansah, M.A.; Opoku, F.; Ephraim, J.H.; Wemegah, D.D.; Tetteh, L.P.M. Characterization of Beauty Salon Wastewater from Kwame Nkrumah University of Science and Technology, Kumasi, Ghana, and Its Surrounding Communities. *Environ. Health Insights* **2016**, *10*, EHI-S40360.
47. SÃO PAULO Decreto No 10.755, de 22 de Novembro de 1977. *Dispõe Sobre o Enquadramento Dos Corpos Receptores Na Classificação Prevista No Decreto No 8.468, de 08 de Setembro de 1976 e Dá Providências Correlatas*; Diário Oficial do Estado de São Paulo, Ed.; Caderno Executivo, n. 221: São Paulo, Brazil, 1976. Available online: <https://www.al.sp.gov.br/repositorio/legislacao/decreto/1977/decreto-10755-22.11.1977.html> (accessed on 29 September 2023).
48. Oliveira, G.H.; Pinto, A.L.; Pereira, G.A. Avaliação da eficiência da utilização do oxigênio dissolvido como principal indicador da qualidade das águas superficiais da bacia do córrego bom jardim, Brasilândia/MS. *Rev. Geomae* **2010**, *1*, 69–82.

49. Queiroz, J.F.; Boeira, R.C. *Boas Práticas de Manejo Para Manter Concentrações Adequadas de Oxigênio Dissolvido em Viveiros de Piscicultura*; Embrapa Meio Ambiente: Jaguariúna, Brazil, 2016; Available online: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/172486/1/2017CT03.pdf> (accessed on 29 September 2023).
50. CETESB—Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Matéria Orgânica e Nutrientes; São Paulo. 2019. Available online: <https://cetesb.sp.gov.br/mortandade-peixes/alteracoes-fisicas-e-quimicas/materiaorganica-e-nutrientes/#targetText=A%20mat%C3%A9ria%20org%C3%A2nica%20sofre%20um,do%20oxig%C3%AAnio%20presente%20no%20meio.&targetText=O%20processo%20de%20enriquecimento%20das,vinhoto%2C%20acarretando%20graves%20problemas%20ambientais> (accessed on 14 June 2023).
51. Ferreira, A.L.G.; Loureiro, S.; Soares, A.M.V.M. Toxicity prediction of binary combinations of cadmium, carbendazim and low dissolved oxygen on *Daphnia magna*. *Aquat. Toxicol.* **2008**, *89*, 28–39.
52. Perdigón-Melón, J.A.; Carbajo, J.B.; Petre, A.L.; Rosal, R.; García-Calvo, E. Coagulation–Fenton Coupled Treatment for Ecotoxicity Reduction in Highly Polluted Industrial Wastewater. *J. Hazard. Mater.* **2010**, *181*, 127–132.
53. De Melo, E.D.; Mounteer, A.H.; Leão, L.H. de S.; Bahia, R.C.B.; Campos, I.M.F. Toxicity Identification Evaluation of Cosmetics Industry Wastewater. *J. Hazard. Mater.* **2013**, *244*, 329–334.
54. Knie, J.L.W.; Lopes, E.W.B. *Testes Ecotoxicológicos: Métodos, Técnicas e Aplicações*; FATMA/GTZ: Florianópolis, Brazil, 2004; 289p.
55. Personne, E.; Loubet, B.; Herrmann, B.; Mattsson, M.; Schjoerring, J.K.; Nemitz, E.; Sutton, M.A.; Cellier, P. SURFATM-NH₃: A Model Combining the Surface Energy Balance and Bi-Directional Exchanges of Ammonia Applied at the Field Scale. *Biogeosciences* **2009**, *6*, 1371–1388.
56. Dodson, S.L.; Cáceres, C.E.; Rogers, D.C. Cladocera and Other Branchiopoda. In *Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2010; pp. 773–827.
57. Versteeg, D.J.; Stalmans, M.; Dyer, S.D.; Janssen, C. Ceriodaphnia and Daphnia: A Comparison of Their Sensitivity to Xenobiotics and Utility as a Test Species. *Chemosphere* **1997**, *34*, 869–892.

58. Radix, P.; Léonard, M.; Papantoniou, C.; Roman, G.; Saouter, E.; Gallotti-Schmitt, S.; Thiébaud, H.; Vasseur, P. Comparison of Brachionus Calyciflorus 2-d and Microtox® Chronic 22-h Tests with Daphnia magna 21-d Test for the Chronic Toxicity Assessment of Chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.* **1999**, *18*, 2178–2185.
59. Baird, C. *Química Ambiental*, 2nd ed.; Bookman: Porto Alegre, Brazil, 2002; 622p.
60. De Melo, E.D.; Mounteer, A.; Reis, E.; Costa, E.; Vilete, A. Screening of Physicochemical Treatment Processes for Reducing Toxicity of Hair Care Products Wastewaters. *J. Environ. Manag.* **2018**, *212*, 349–356.
61. Siqueira, J.M.; Bomm, M.D.; Pereira, N.F.G.; Garcez, W.S.; Boaventura, M.A.D. Estudo Fitoquímico de *Unonopsis Lindmanii*—Annonaceae, Biomonitorado Pelo Ensaio de Toxicidade Sobre a *Artemia salina* Leach. *Química Nova* **1998**, *21*, 557–559.
62. Zhu, X.; Zhu, L.; Duan, Z.; Qi, R.; Li, Y.; Lang, Y. Comparative Toxicity of Several Metal Oxide Nanoparticle Aqueous Suspensions to Zebrafish (*Danio rerio*) Early Developmental Stage. *J. Environ. Sci. Health* **2008**, *43*, 278–284.
63. Dvorak, P.; Benova, K.; Vitek, J. Alternative Biotest on *Artemia franciscana*. In *Ecotoxicology*, 1st ed.; Begum, G., Ed.; IntechOpen: London, UK, 2012.
64. Zhang, Y.; Mu, J.; Han, J.; Gu, X. An Improved Brine Shrimp Larvae Lethality Microwell Test Method. *Toxicol. Mech. Methods* **2011**, *22*, 23–30.
65. Bueno, A.C.; Piovezan, M. Bioensaio Toxicológico Utilizando *Artemia salina*: Fatores Envolvidos Em Sua Eficácia. Instituto Federal de Santa Catarina. 2015. Available online: <http://docente.ifsc.edu.br/michael.nunes/MaterialDidatico/Analises%20Quimicas/TCC%20II/TCC%202015%202/Ariele.pdf> (accessed on 29 September 2023).
66. Libralato, G.; Prato, E.; Migliore, L.; Cicero, A.M.; Manfra, L. A Review of Toxicity Testing Protocols and Endpoints with *Artemia Spp.* *Ecol. Indic.* **2016**, *69*, 35–49.
67. Ntungwe, N.E.; Domínguez-Martín, E.M.; Roberto, A.; Tavares, J.; Isca, V.M.S.; Pereira, P.; Cebola, M.-J.; Rijo, P. *Artemia* Species: An Important Tool to Screen General Toxicity Samples. *Curr. Pharm. Des.* **2020**, *26*, 2892–2908.
68. Vega, A.C.S.; Cruz-Alcalde, A.; Mazón, C.S.; Diaz-Cruz, M.S. Nano-TiO₂ Phototoxicity in Fresh and Seawater: *Daphnia magna* and *Artemia Sp.* as Proxies. *Water* **2020**, *13*, 55.

69. Favilla, M.; Macchia, L.; Gallo, A.; Altomare, C. Toxicity assessment of metabolites of fungal biocontrol agents using two different (*Artemia salina* and *Daphnia magna*) invertebrate bioassays. *Food Chem. Toxicol.* **2006**, 44, 1922–1931. 4
70. Spence, R.; Gerlach, G.; Lawrence, C.; Smith, C. The Behaviour and Ecology of the Zebrafish, *Danio rerio*. *Biol. Rev.* **2008**, 83, 13–34.
71. D’Costa, A.; Shepherd, I.T. Zebrafish Development and Genetics: Introducing Undergraduates to Developmental Biology and Genetics in a Large Introductory Laboratory Class. *Zebrafish* **2009**, 6, 169–177.
72. Aluru, N. Epigenetic Effects of Environmental Chemicals: Insights from Zebrafish. *Curr. Opin. Toxicol.* **2017**, 6, 26–33.
73. Kari, G.; Rodeck, U.; Dicker, A.P. Zebrafish: An Emerging Model System for Human Disease and Drug Discovery. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2007**, 82, 70–80.
74. Lieschke, G.J.; Currie, P.D. Animal Models of Human Disease: Zebrafish Swim into View. *Nat. Rev. Genet.* **2007**, 8, 353–367.
75. Howe, K.; Clark, M.D.; Torroja, C.F.; Torrance, J.; Berthelot, C.; Muffato, M.; Collins, J.E.; Humphray, S.; McLaren, K.; Matthews, L.; et al. The Zebrafish Reference Genome Sequence and Its Relationship to the Human Genome. *Nature* **2013**, 496, 498–503.
76. Hossain, F.; Perales-Perez, O.J.; Hwang, S.; Román, F. Antimicrobial Nanomaterials as Water Disinfectant: Applications, Limitations and Future Perspectives. *Sci. Total Environ.* **2014**, 466, 1047–1059.
77. Moore, M.N. Do Nanoparticles Present Ecotoxicological Risks for the Health of the Aquatic Environment? *Environ. Int.* **2006**, 32, 967–976.
78. Vale, G.; Mehennaoui, K.; Cambier, S.; Libralato, G.; Jomini, S.; Domingos, R.F. Manufactured Nanoparticles in the Aquatic Environment-Biochemical Responses on Freshwater Organisms: A Critical Overview. *Aquatic. Toxicol.* **2016**, 170, 162–174.
79. Adam, V.; Loyaux-Lawniczak, S.; Labille, J.; Galindo, C.; del Nero, M.; Gangloff, S.; Weber, T.; Quaranta, G. Aggregation Behaviour of TiO₂ Nanoparticles in Natural River Water. *J. Nanoparticle Res.* **2016**, 18, 1–11.
80. Chen, G. Electrochemical Technologies in Wastewater Treatment. *Sep. Purif. Technol.* **2004**, 38, 11–41

81. Clemente, Z.; Castro, V.L.S.S.; Moura, M.A.M.; Jonsson, C.M.; Fraceto, L.F. Toxicity Assessment of TiO₂ Nanoparticles in Zebrafish Embryos under Different Exposure Conditions. *Aquatic. Toxicol.* **2014**, 147, 129–139.
82. Bar-Ilan, O.; Louis, K.M.; Yang, S.P.; Pedersen, J.A.; Hamers, R.J.; Peterson, R.E.; Heideman, W. Titanium Dioxide Nanoparticles Produce Phototoxicity in the Developing Zebrafish. *Nanotoxicology* **2012**, 6, 670–679.
83. Xiong, D.; Fang, T.; Yu, L.; Sima, X.; Zhu, W. Effects of Nano-Scale TiO₂, ZnO and Their Bulk Counterparts on Zebrafish: Acute Toxicity, Oxidative Stress and Oxidative Damage. *Sci. Total Environ.* **2011**, 409, 1444–1452.
84. Boyle, D.; Al-Bairuty, G.A.; Henry, T.B.; Handy, R.D. Critical Comparison of Intravenous Injection of TiO₂ Nanoparticles with Waterborne and Dietary Exposures Concludes Minimal Environmentally-Relevant Toxicity in Juvenile Rainbow Trout *Oncorhynchus Mykiss*. *Environ. Pollut.* **2013**, 182, 70–79.
85. Ma, H.; Diamond, S.A. Phototoxicity of TiO₂ Nanoparticles to Zebrafish (*Danio rerio*) Is Dependent on Life Stage. *Environ. Toxicol. Chem.* **2013**, 32, 2139–2143.
86. Ercal, B.; Gurer-Orhan, B.; Nukhet Aykin-Burns, B. Toxic Metals and Oxidative Stress Part I: Mechanisms Involved in Metal-Induced Oxidative Damage. *Curr. Top. Med. Chem.* **2005**, 1, 529–539.
87. Henkel, R.R. Leukocytes and Oxidative Stress: Dilemma for Sperm Function and Male Fertility. *Asian J. Androl.* **2011**, 13, 43.
88. Huang, X.; Wang, J.; Liu, J.; Hua, L.; Zhang, D.; Hu, T.; Ge, Z.L. Maternal Periodontal Disease and Risk of Preeclampsia: A Meta-Analysis. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol.—Med. Sci.* **2014**, 34, 729–735.
89. Dejana, E.; Tournier-Lasserre, E.; Weinstein, B.M. The Control of Vascular Integrity by Endothelial Cell Junctions: Molecular Basis and Pathological Implications. *Dev. Cell* **2009**, 16, 209–221.
90. Hallare, A.V.; Schirling, M.; Luckenbach, T.; Köhler, H.R.; Triebkorn, R. Combined Effects of Temperature and Cadmium on Developmental Parameters and Biomarker Responses in Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos. *J. Therm. Biol.* **2005**, 30, 7–17.
91. Verma, S.K.; Jha, E.; Panda, P.K.; Mukherjee, M.; Thirumurugan, A.; Makkar, H.; Das, B.; Parashar, S.K.S.; Suar, M. Mechanistic Insight into ROS and Neutral Lipid Alteration Induced Toxicity in the Human Model with Fins (*Danio rerio*) by

Industrially Synthesized Titanium Dioxide Nanoparticles. *Toxicol. Res.* **2018**, 7, 244–257.

92. Roberto, M.M.; Christofolletti, C.A. How to Assess Nanomaterial Toxicity? An Environmental and Human Health Approach. In *Nanomaterials—Toxicity, Human Health and Environment*; IntechOpen: London, UK, 2019.

6. CONCLUSÕES GERAIS

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, podemos concluir que:

➤ Os ensaios realizados com *Allium cepa* revelaram que o tratamento EC-NF induziu diferença significativa do IM, para a concentração D1 (50,0%), enquanto que nenhum dos tratamentos EC-F induziu este tipo de alteração. Os tratamentos ET-NF e ET-F, nas diluições D1 (50,0%) e D3 (12,5%), induziram alterações para este parâmetro;

➤ Quanto ao IGen, o tratamento EC-NF, diluições D1 50,0%) e D3 (12,5%, foi genotóxico para *A. cepa*, enquanto que apenas a diluição D1 (50,0%) do EC-F apresentou esse tipo de toxicidade. Para o tratamento com ET-F, todas as diluições (D1 50,0%, D3 12,5% e D5 3,125%), induziram diferenças significativas de IGen, enquanto que, apenas as diluições D1 (50,0%) e D3 (12,5%) do tratamento ET-F, induziram essas alterações;

➤ A genotoxicidade observada sugere ação aneugênica e pode estar relacionada com a presença de compostos presentes no cosmético estudado, como as nanopartículas de TiO₂ e os compostos tensoativos;

➤ Os resultados para IMut, avaliados em células F1 de *A. cepa*, demonstram que nenhuma das diluições testadas (D1, D3 e D5) induziu formação de micronúcleo, portanto não apresentaram efeitos mutagênicos para esse bioindicador, independentemente do tratamento realizado (ET-NF; ET-F; EC-NF e EC-F);

➤ Os ensaios realizados com *Lactuca sativa*, relacionados à determinação das taxas de germinação, indicaram que todos os tratamentos (ET-NF; ET-F; EC-NF e EC-F) em todas as concentrações testadas (D0=100,0%; D1=50,0%; D2=25,0%; D3=12,5%; D4=6,25% e D5=3,125%) interferiram na taxa de germinação. Quanto aos resultados obtidos para o crescimento de raiz, todas os tratamentos (EC-NF; EC-F; ET-NF) apresentaram fitotoxicidade para este bioindicador. O mesmo resultado foi observado para os tratamentos realizados com as amostras do ET-F, exceto para D5 (3,125%);

➤ A diminuição nas taxas de crescimento pode estar relacionada com a presença de elementos fitotóxicos dos cosméticos, como TiO₂. Os resultados de taxa de germinação também foram utilizados para a construção da curva de regressão, necessária para determinação da concentração inibitória de 50% da germinação das sementes (IC₅₀). Para o EC-NF, foi possível encontrar um IC₅₀ estimado em 63,14%, enquanto para EC-F, o valor foi estimado em 65,05%. Já em relação ao tratamento ET-NF, foi verificado um valor de IC₅₀ de 73,59%, enquanto para o ET-F, este valor foi maior, equivalente a 90,28%. Deste modo, foi verificado que os efluentes contaminados com resíduos da tintura capilar castanha, associada ou não com xampu e

condicionador, apresentaram fitotoxicidade. Comparando-se os processos de filtração, foi possível inferir que efeito fitotóxico foi menos expressivo para as amostras que foram submetidas ao filtro de PVDF, ao invés de papel filtro qualitativo;

➤ Os ensaios de viabilidade celular com o MTT, realizados com cultura de células humanas (HepG2/C3A), demonstraram que as amostras 1 (100,0%) e 2 (50,0%) do EC e 1 (100,0%), 2 (50,0%) e 3 (25,0%) do ET induziram citotoxicidade. Já para o teste de exclusão do Azul de Tripán, foi verificado que apenas a amostra 1 (100,0%) do ET foi citotóxica;

➤ De forma geral, foi constatado que as taxas de viabilidade celular foram, relativamente, menores para o teste do MTT, quando comparadas com os resultados do teste do Azul de Tripán. Deste modo, é possível inferir que os danos mitocondriais foram superiores àqueles causados na membrana plasmática. Porém, para ambos os testes, foi possível evidenciar relações dose-resposta, que pode ser comprovada pelo aumento da citotoxicidade observada para as amostras mais concentradas, caracterizando uma relação de toxicidade diretamente proporcional à concentração.

➤ Os resultados do ensaio do cometa, realizado com células HepG2/C3A, evidenciam que todas as concentrações do EC e do ET induziram fragmentação do DNA. Pela avaliação do parâmetro intensidade da cauda do cometa, foi possível estabelecer uma relação dose-resposta, diretamente proporcional entre a concentração do efluente e a fragmentação do DNA, ou seja, quanto maior a concentração, mais intensos foram os danos observados. Entretanto, o EC apresentou maior potencial genotóxico e menor citotoxicidade, quando comparado ao ET, isto é, apesar do EC não causar grande comprometimento à integridade da membrana celular ou à atividade mitocondrial, este efluente ainda foi capaz de ocasionar danos severos ao material genético. Sendo assim, é possível afirmar que a combinação de xampu, condicionador e tintura capilar resulta em uma mistura complexa, que apresenta um alto potencial genotóxico para a linhagem celular estudada (HepG2/ C3A). Porém, as interações que ocorrem entre esses compostos envolvem mecanismos ainda não elucidados, que precisam ser mais investigados;

➤ O teste do MN com bloqueio de citocinese demonstrou ausência de danos para todas as concentrações e tratamentos realizados (EC e ET). Neste ensaio também foi evidenciado o potencial citotóxico para todos os tratamentos de ambos os efluentes (ET e EC), comprovado potencial este provocaram pela diminuição do Índice de Proliferação com Bloqueio de Citocinese (IPBC) e do Índice de Replicação (IR). Comparado ao ET, o EC apresentou taxas mais baixas associadas ao aumento da atividade citostática. Acredita-se que esta alta atividade

citostática possa contribuir para o aprisionamento do ciclo celular, inibindo a fixação de danos e, conseqüentemente, determinando a ausência frequências significativas de MN;

➤ Os bioensaios realizados com os organismos aquáticos demonstraram um alto potencial tóxico dos efluentes, para a biota deste ecossistema. Foram evidenciados efeitos deletérios em todos os organismos estudados: *Daphnia similis* (CE₅₀ de 0,54% para ET e 3,437% para EC); *Artemia salina* (CL₅₀ de 3,874% para ET e 8,327% para EC); e *Danio rerio* (ET: 24 hpf – CL₅₀ = 6,59%; 96 hpf – CL₅₀ = 6,59%; 144 hpf – CL₅₀ = 6,37% and EC: 24 hpf – CL₅₀ = 4,93%; 96 hpf – CL₅₀ = 3,90%; 144 hpf – CL₅₀ = 3,90%). Dentre as espécies estudadas, *D. similis* apresentou a maior sensibilidade, seguida por *A. salina* e *D. rerio*. Apesar de se determinar a variação da toxicidade, conforme o bioindicador, ainda são necessários estudos complementares para se elucidar os possíveis mecanismos de ação destes compostos sobre cada um desses organismo-teste;

➤ A análise ecotoxicológica realizada neste estudo, que englobou organismos de diferentes grupos taxonômicos, faz uma alusão aos possíveis impactos que os efluentes de salões de beleza podem promover em um ecossistema aquático com níveis tróficos distintos. Diante de todos esses resultados, pode-se concluir que o EC e o ET podem causar danos aos ecossistemas, bem como danos à saúde humana;

➤ Dessa forma, o presente estudo traz um conhecimento adicional sobre os possíveis impactos que os efluentes de salões de beleza podem promover nos ecossistemas aquáticos, terrestres e à saúde humana, cujos dados obtidos podem servir de subsídios para o estabelecimento de normas de tratamentos prévios desses efluentes, antes dos mesmos serem descartados no ambiente;

➤ O estudo traz dados que podem ser usados para a melhoria das condições ambientais e, conseqüentemente, para a manutenção da integridade dos ecossistemas. Esses dados alertam ainda sobre a necessidade de aplicação de metas de despoluição e conservação ambiental, que atendem aos propósitos da agenda 2030 da ONU;

➤ Ainda, por ameaçar a manutenção da Saúde Única, este estudo dá subsídios para a criação de políticas de proteção dos ecossistemas aquáticos, principalmente em relação aos contaminantes emergentes provenientes de cosméticos e produtos de cuidado pessoal, cujo descarte não é ainda regulamentado. Além disso, os resultados evidenciam e alertam a necessidade de mais estudos de biomonitoramento e elucidação de mecanismos de ação deste tipo de contaminação.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIHPEC. Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos: **Panorama do Setor 2021**. Disponível em:

https://abihpec.org.br/site2019/wpcontent/uploads/2021/09/Panorama_do_Setor_Atualizado_Agosto1408.pdf. Acesso em: 10 de jul. 2023.

ABIHPEC, **Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos**. Anuário 2012. Disponível em: http://www.abihpec.org.br/wp-content/uploads/2012/12/ABIHPEC_2012_internet.pdf. Acesso em: 18 de jul.2023.

ABIHPEC-SEBRAE. **Caderno de tendências: Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos 2019-2020**. Disponível em: <https://abihpec.org.br/publicacao/caderno-de-tendencias-2019-2020/>. Acesso em: 10 jul. 2023.

ABNT—Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 12713. **Ecotoxicologia Aquática—Toxicidade Aguda—Método de Ensaio Com *Daphnia* sp. (Crustacea, Cladocera)**; ABNT: Rio de Janeiro, Brasil, 2016.

ABNT—Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 16530. **Ecotoxicologia Aquática—Toxicidade Aguda—Método de Ensaio Com *Artemia* sp. (Crustacea, Brachiopoda)**; ABNT: Rio de Janeiro, Brasil, 2016.

ABNT/SEBRAE. **Guia de Implementação das Normas Técnicas para Salões de Beleza**. Rio de Janeiro, Brasil: Sebrae, p. 56, 2016.

ABNT. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS). NBR 16383. **Salão de beleza- Requisitos de boas práticas na prestação de serviços**. Disponível em: <https://www.normas.com.br/visualizar/abnt-nbr-nm/34515/nbr16383-salao-de-beleza-requisitos-de-boas-praticas-na-prestacao-de-servicos> Acesso em: 04 jul. 2023.

ACHILLES, J. V..**Cosméticos naturais sob a ótica da socialização do consumo: o consumidor de beleza diante desta tendência de mercado**. Dissertação (mestrado) em Administração Pública e de Empresas da Fundação Getulio Vargas do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, RJ. 75 p., 2019.

AHMADI, M. *et al.* Association between hair dye use and cancer in women: a systematic review and meta-analysis of case-control studies. **African Health Sciences**, v. 22, n. 2, p. 323-333, 2022.

ALESTROM, P. *et al.* Zebrafish: Housing and husbandry recommendations. **Laboratory animals**, v. 54, n. 3, p. 213-224, 2020.

AL-SABTI K.; METCALFE C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research**, v. 343, p. 121-135, 1995.

- AMARAL, A. M.; BARBÉRIO, A.; VOLTOLINI, J.C.; BARROS, L. Avaliação preliminar da citotoxicidade e genotoxicidade, da água da bacia do rio Tapanhon (SP-Brasil) através do teste *Allium* (*Allium cepa*). **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 20, n.1 e 2, p. 65-72. 2007.
- ANSELMO, C.S.; SARDELA, V.F.; SOUSA, V.P.; PEREIRA, H.M.G. Zebrafish (*Danio rerio*): A Valuable Tool for Predicting the Metabolism of Xenobiotics in Humans? **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 212, p.34-46, 2018.
- ARAGÃO, F. B. *et al.* Toxicogenetic of tebuconazole based fungicide through *Lactuca sativa* bioassays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 213, p. 111985, 2021.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.111985>.
- AVDESH, A. *et al.* Regular Care and Maintenance of a Zebrafish (*Danio rerio*) Laboratory: An Introduction. **Journal of Visualized Experiments : JoVE**, n. 69, p. e4196, 18 nov. 2012
- AYED, L.; MAHDHI, A.; CHEREF, A.; BAKHROUF, A. Decolorization and degradation of azo dye Methyl Red by an isolated *Sphingomonas paucimobilis*. **Desalination**, v. 274, p. 272-277, 2011.
- BAGUR-GONZÁLEZ, M. G. *et al.* Toxicity assessment using *Lactuca sativa* L. bioassay of the metal(loid)s As, Cu, Mn, Pb and Zn in soluble-in-water saturated soil extracts from an abandoned mining site. **Journal of Soils and Sediments**, v. 11, p. 281–289, 2011.
- BARAHONA, M. V.; SÁNCHEZ-FOTÚAN, S. Toxicity of carbamates to the brine shrimp *Artemia salina* and the effect of atropine, BW284c51, iso-OMPA and 2-PAM on carbaryl toxicity. **Environmental Pollution**, v. 104, p. 469-476, 1999.
- BEATTIE, K. A.; RESSLER, J.; WIEGAND, C.; KRAUSE, E.; CODD, G. A.; STEINBERG, C. E. W.; PFLUMACHER, S. Comparative effects and metabolism of two microcystins and nodularin in the brine shrimp *Artemia salina*. **Aquatic Toxicology**, v. 62, p. 219-226, 2003.
- BESSEGATO, G. G.; CARDOSO, J. C.; ZANONI, M. V. B. Enhanced photoelectrocatalytic degradation of an acid dye with boron-doped TiO₂ nanotube anodes. **Catalysis Today**, v. 240, p. 100–106, 2015.
- BIANCHI, J.; CABRAL-DE-MELLO, D.C.; MARIN-MORALES, M.A. Toxicogenetic effects of low concentrations of the pesticides imidacloprid and sulfentrazone individually and in combination in in vitro tests with HepG2 cells and *Salmonella typhimurium*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.120, p.174-183, 2016.
- BIANCHI, J.; ESPINDOLA, E. L. G.; MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity and mutagenicity of water samples from the Monjolinho River (Brazil) after receiving untreated effluents. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 826–833, 2011.
- BOETTCHER, M. *et al.* Comparison of in vitro and in situ genotoxicity in the Danube River by means of the comet assay and the micronucleus test. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v.700, n. 1-2, p.11-17, 2010.

- BRIANEZI, G.; DE CAMARGO, J. L. V.; MIOT, H. A. Desenvolvimento e validação de técnica quantitativa de análise de imagem para avaliação do teste do cometa corado pela prata. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, n. 4, p. 325-334, 2009.
- CALOW, P. Introduction. In: HOFFMAN, D. J.; RATTNER, B. A.; BURTON JR, G. L.; CAIRNS JR, C. **Handbook of Ecotoxicology**, London: Blackwell Scientific Publications, 2 ed, p. 1-5, 1993.
- CAMPOS, J. M. S; DAVIDE, L. C.; SOARES, G. L. G.; VICCINI, L. F. Mutagenic effects due to allelopathic action of fern (*Gleicheniaceae*) extracts. **Allelopathy Journal**, v. 22, n. 1, p. 143-152, 2008
- CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, Oxford, v. 72, p. 722-725, 2008.
- CARITÁ, R.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Comparison of the toxicogenetic potential of sewage sludges from different treatment processes focusing agricultural use. **Environmental Science and Pollution Research**, v.26, p.21475-21483, 2019.
- CARVALHO, T. U.; Cultura de Células Animais. In: BENCHIMOL, M. (Org.). **Métodos de Estudo da Célula**. Rio de Janeiro: Fundação Estadual Norte Fluminense- FENORTE/UENF., v.2, p.45-58, 1996.
- CASSAR, Steven et al. Use of zebrafish in drug discovery toxicology. **Chemical research in toxicology**, v. 33, n. 1, p. 95-118, 2019.
- CHARLES, J. *et al.* Evaluation of the phytotoxicity of polycontaminated industrial effluents using the lettuce plant (*Lactuca sativa*) as a bioindicator. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.74, p.2057-2064, 2011.
- CHAUHAN, L.; SAXENA, P.; GUPTA, S. Cytogenetic effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 42, p. 181–189, 1999.
- CHEN, J.P. *et al.* *In vitro* evaluation of growth and anabolism for C3A/HepG2 hepatoma cells with logistic equation and linear regression expression. **Transplantation Proceedings**, p. 656-657, 2001.
- CORBETT, J. F. Na historical review oft he use of dye precursors in tha formulation of commercial oxidation hair dyes. **Dyes and Pigments**, London, v. 41, n.3, p.127-136, 1999.
- COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C.M.R.; ESPINDOLA, E. L.G. A toxicidade em ambientes aquáticos: Discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 7, p.1820-1830, 2008.
- CUCHIARA, C.C.; BORGES, C.S.; BOBROWSKI, V.L. Sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador da citogenotoxicidade de cursos d'água. **Tecnologia Ciência Agropecuária**, Paraíba, v. 6, p. 33-38, 2012.

- DING, L., JING, H., QIN, B., QI, L., LI, J., WANG, T., LIU, G. Regulation of cell division and growth in roots of *Lactuca sativa* L. seedlings by the ent-kaurene diterpenoid rhabdosin B. **Journal of Chemical Ecology**, v.36, n.5, p.553-563, 2009.
- DOJCINOVIC, B. P.; ROGLIC, G. M.; OBRADOVIC, B. M.; KURAICA, M. M.; KOSTIC, M. M.; NESIC, J.; MANOJLOVIC, D. D. Decolorization of reactive textile dyes using water falling film dielectric barrier discharge. **Journal of Hazardous Materials**, v. 192, p. 763-771, Amsterdam, 2011.
- DOŁĘGOWSKA, S.; GAŁUSZKA, A.; MIGASZEWSKI, Z. M. Significance of the long-term biomonitoring studies for understanding the impact of pollutants on the environment based on a synthesis of 25-year biomonitoring in the Holy Cross Mountains, Poland. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 10413-10435, 2021.
- DORNFELD, C.B. *et al.* Caracterização Ecotoxicológica do sedimento da Represa do Lobo (Itirapina-Brotas, SP) e seus Tributários. In: ESPÍNDOLA, E.L.G., ed. **Impactos ambientais em recursos hídricos: causas e consequências**. Rima editora. p. 245-259, 2001.
- DOS REIS, G. B. *et al.* Reliability of plant root comet assay in comparison with human leukocyte comet assay for assessment environmental genotoxic agents. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 142, p. 110-116, 2017
- DUTKA, B.J. Short-Term Root Elongation Toxicity Bioassay. **Methods for Toxicological Analysis of Waters, Wastewaters and Sediments**. National Water Research Institute (NWRI), Environment Canadá, 1989.
- EBERLE, C. E. *et al.* Hair dye and chemical straightener use and breast cancer risk in a large US population of black and white women. **International journal of cancer**, v. 147, n. 2, p. 383-391, 2020.
- ELMANSOURI, A. H06 Beauty is pain: symmetries in the cosmetic practices of ancient Rome and the modern day. **British Journal of Dermatology**, v. 188, n. Supplement_4, p. ljad113. 288, 2023.
- ENGLER, S. S. Allergens of permanente hair dyes induces epidermal damage, skin barrier loss IL-1 α increase in epidermal *in vitro* model. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 112, p. 265-272, 2017.
- EOM, I. C.; RAST, C.; VEBER, AM. M.; VASSEUR, P. Ecotoxicity of a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soil. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 67, n. 2, p. 190-205, 2007.
- ESPÍNDOLA, E. L. G.; BRIGANTE, J.; DORNFELD, C. B. **Estudos ecotoxicológicos no rio Mogi-Guaçu**. In: BRIGANTE, J., ESPÍNDOLA, E. L. G. Limnologia fluvial: um estudo no rio Mogi-Guaçu. São Carlos: Rima, 2003. p. 129–148..
- FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, p. 81–95, 2000.

FISKEJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v.102, p.99-112, 1985.

FERREIRA, F. R. Corpo feminino e beleza no século XX. **Revista ALCEU**, v. 11, n. 21, p. 186-201, 2010.

FRESHNEY, R. I. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique**, 5 ed. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2005. 1170 p.

GERA, R.; MOKBEL, R.; IGOR, I.; MOKBEL, K. Does the use of hair dyes increase the risk of developing breast câncer? A meta-analysis and review of the literature. **Anticancer Research**, Athens, v. 38, n.2, p. 707-716, 2018.

GHERARDI-GOLDSTEIN, E.; et. al. **Procedimentos para utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos**. São Paulo: CETESB, 17 p. 1990

GONÇALVES, V. D.; COELHO, M. D. F. B.; CAMILI, E. C. Bioensaios em sementes de *Lactuca sativa* L. com extrato de folhas de *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc. **Revista Internacional de Ciências**, v. 06, n. 02, p. 160 - 170, jul-dez, 2016.

GONCALVES, C. L. *et al.* Exposure to a high dose of amoxicillin causes behavioral changes and oxidative stress in young zebrafish. **Metabolic Brain Disease**, v. 35, p. 1407-1416, 2020.

GONZÁLEZ, A. M.; PRESA, M.; LATORRE, M. G.; LURÁ, M. C. Detección de metabolitos fúngicos com actividad tóxica mediante bioensayo sobre *Artemia salina*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 24, p. 59-61, Barcelona, 2007.

GOODWIN, NICOLA et al. Standardized welfare terms for the zebrafish community. **Zebrafish**, v. 13, n. S1, p. S-164-S-168, 2016.

GRANT, W. F. The present status of higher plant bioassays for detection of environmental mutagens. **Mutat. Res.**, v 310, p. 175–185, 1994.

GRANT, W. F.; Chromossome aberration assays in *Allium*. A report of the U.S. environmental protection agency. Gene-Tox program. **Mutation Research**, v. 99, p. 273-291, 1982.

HALMI, M. I. E. Rapid ecotoxicological tests using bioassay systems-a review. **Journal of Biochemistry, Microbiology and Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 29-37, 2016.

HARA, R. V.; MARIN-MORALES, M. A. *In vitro* and *in vivo* investigation of the genotoxic potential of waters from rivers under the influence of a petroleum refinery (São Paulo State – Brazil). **Chemosphere**, v. 174, p.321-330, 2017.

HE, L. et al. Hair dye ingredients and potential health risks from exposure to hair dyeing. **Chemical Research in Toxicology**, v. 35, n. 6, p. 901-915, 2022.

HEDDLE, J. A.; HITE, M.; IRKHART, B.; MACGREGOR, J. T. E.; SALAMONE, M. F. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity a measure of the US environmental protection agency gene-tox program. **Mutation Research**, v. 123, p. 61–118, 1983.

HERRERO, O. *et al.* Toxicological evaluation of three contaminants of emerging concern by use of the *Allium cepa* test. **Mutation Research**, v. 743, p. 20–24, 2012.

HILL, A. J. *et al.* Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. **Toxicological sciences**, v. 86, n. 1, p. 6-19, 2005.

HOLST, C.M.; OREDSSON, S.T. Comparison of three cytotoxicity tests in the evaluation of the cytotoxicity of a spermine analogue on human breast cancer cell lines. **Toxicology in Vitro**, v.19, p.379-387, 2005.

HOREV, L. Exogenous factors in hair disorders. **Exogenous Dermatology**, v. 3, n. 5, p. 237–245, 2004.

HORZMANN, K.A.; FREEMAN, J.L. Making waves: New developments in toxicology with the zebrafish. **Toxicological Sciences**, v. 163, n. 1, p. 5-12, 2018.

HOSHINA, M. M.; MARIN-MORALES, M. A. Micronucleus and chromosome aberrations induced in onion (*Allium cepa*) by a petroleum refinery effluent and by river water that receives this effluente. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 2090–2095, 2009.

HOUK, V.S. The genotoxicity of industrial wastes and effluents – a review. **Mutation Research**, v.277, p.91-138, 1992.

HUEBER-BECKER, F.; NOHYNEK, G. J.; MEULING, W. J. A.; BENECH-KIEFFER, F.; TOUTAIN, H. Human systemic exposure to a [14C]-para-phenylenediamine- 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.

IMETRO, INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Produtos para cabelos**. 2017. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/consumidor/produtos/tintura_cabelo.asp. Acesso em: 17 jul. 2023.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER- IARC **Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Volume 99: Some Aromatic Amines, Organic Dyes, and Related Exposures**, 2010. Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol99/index.php>. Acesso em: 04 de jul. 2023.

JAGETIA, G.; ARUNA, R. Correlation of micronuclei-induction with the cell survival in HeLa cells treated with a base analogue, azidothymidine (AZT) before exposure to different doses of γ -radiation. **Toxicology letters**, v. 139, n. 1, p. 33-43, 2003.

JANSSEN, C. R.; HEIJERICK, D.G. Algal toxicity tests for environmental risk assessments of metals. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, **New York**, v. 178, p. 23-52, 2003.

JOSEPHY, P. David; ALLEN-VERCOE, Emma. Reductive metabolism of azo dyes and drugs: **Toxicological implications. Food and Chemical Toxicology**, p. 113932, 2023.

KAMER, I.; RINKEVICH, B. *In vitro* application of the comet assay for aquatic genotoxicity: considering a primary culture versus a cell line. **Toxicology in Vitro**, v.16, p. 177-184, 2002.

KANWAR, A. S. Brine shrimp a marine animal for simple and rapid biological assays. **Journal of Chinese Clinical Medicine**, v. 2, n. 4, p. 236-240. 2007.

KAWAKAMI, K.; PATTON, E.E.; ORGER, M. Calcium imaging of neuronal activity in free-swimming larval zebrafish. **Zebrafish: Methods and Protocols**, p. 333-341, 2016.

KHALILI, F. *et al.* Health risk assessment of dermal exposure to heavy metals content of chemical hair dyes. **Iranian journal of public health**, v. 48, n. 5, p. 902, 2019.

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

KIMMEL, C. B. *et al.* Stages of embryonic development of the zebrafish. **Developmental dynamics**, v. 203, n. 3, p. 253-310, 1995.

KNIE, J.L.W.; LOPES, E.W.B. **Testes ecotoxicológicos: Métodos Técnicas e Aplicações**. Florianópolis: Fatma, 2004. 289p.

KOMISSAROVA, E.V.; SAHA, S.K.; ROSSMAN, T.G. Dead or dying: the importance of time in cytotoxicity assays using arsenite as an example. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 202, p.99-107, 2005.

KUSHWAHA, S.; PANDEY, A. K.; KUSHWAHA, N. Role of Nanomaterials in Cosmeceuticals: Challenges, Development Strategies, and Future Perspective. **Letters in Applied NanoBioScience**, v. 11, p. 11, 4050–4060. 2021.

LAJMANOVICH, R.C. *et al.* Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in tadpoles of the common toad (*Rhinella arenarum*) treated with the herbicides Liberty® and glufosinate-ammonium. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v.769, p.7-12, 2014.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M.A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research**, v.682, p.71-81, 2009.

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

LIMAN, R.; AKYIL, D.; EREN, Y.; KONUK, M. Testing of the mutagenicity and genotoxicity of metolcarb by using both Ames/Salmonella and *Allium test*. **Chemosphere**, v. 80, p. 1056–1061, 2010.

LORENZON, V.; FACCIO, G. Tackling Colorants Sustainability Combining Disruptive Science and Sustainable Leadership: A Review Article. **Colorants**, v. 1, n. 4, p. 400-410, 2022.

MA, T. H.; XU, C.; MCCONNELL, H.; RABAGO, E. V.; ARREOLA, G. A. The improved Allium/Vicia root tip micronucleous assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research**, v. 334, p. 185-195, 1995.

MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO FILHO, A. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v.12, n.3, p.355-381, 2008.

MAIFADI, S.; MHLANGA, S. D.; NXUMALO, E. N.; MOTSA, M. M.; KUVAREGA, A. T. Analysis and pretreatment of beauty hair salon wastewater using a rapid granular multimedia filtration system. **Journal of Water Process Engineering**, v. 33, p. 101050, 2020.

MANAL, M. A.; EL-NAGGAR, S.; EL-AASAR, A.; KHLOOD, I. B. Bioremediation of crystal violet using air bubble bioreactor packed with *Pseudomonas aeruginosa*. **Water Research**, v. 39, p. 5045-5054, 2005.

MANZANO, B.C. *et al.* Evaluation of the genotoxicity of waters impacted by domestic and industrial effluents of a highly industrialized region of São Paulo State, Brazil, by the comet assay in HTC cells. **Environmental Science and Pollution Research**, v.22, p.1399–1407, 2015.

MARSH, JM *et al.* Gel net shampoo formulation and benefits for hair health. **International journal of cosmetic science**, v. 5, pág. 543-549, 2017.

MAZZEO, D.E.C. *et al.* Application of micronucleus test and comet assay to evaluate BTEX biodegradation. **Chemosphere**, v.90, p.1030–1036, 2013.

MAZZEO, D.E.C. *et al.* Monitoring the natural attenuation of a sewage sludge toxicity using the *Allium cepa* test. **Ecological Indicators**, v.56, p. 60–69, 2015.

MAZZEO, D.E.C.; FERNANDES, T.C.C.; MARIN-MORALES, M.A. Attesting the efficiency of monitored natural attenuation in the detoxification of sewage sludge by means of genotoxic and mutagenic Bioassays. **Chemosphere**, v.163, p.508-515, 2016.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, L. B.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. *Brine shrimp*: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MICHAEL, A. S.; THOMPSON, C. G.; ABRAMOVITZ, M. *Artemia salina* as a Test Organism for Bioassay. **Science, New Series**, v. 123, n. 3194, p. 464. 1956.

MIYAJI, C.; POERSCH, A.; RIBEIRO, L.; EIRA, A.; CÓLUS, I. Shiitake (*Lentinula edodes* (Berkeley) Pegler) extracts as a modulator of micronuclei induced in HEP-2 cells. **Toxicology in vitro**, Oxford, v. 20, pp. 1555-1559, 2006.

MONTEIRO, M.S.; SANTOS, C.; SOARES, A.M.V.M; MANN, R.M. Assessment of biomarkers of cadmium stress in lettuce. **Ecotoxicology and Environmental safety**, v.72, n.3, p. 811-818, 2009.

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

NAGEL, R. Dart: the embryo test with the zebrafish *Danio rerio* e a general model in ecotoxicology and toxicology. **Altex**, v.19, p.38-48, 2002.

NASIADKA, A.; CLARK, M.D. Zebrafish Breeding in the Laboratory Environment. **ILAR Journal**, v.53, n.2, p. 161-168, 2012.

NIETO, I. J. R.; SALAMA, A. M.; CATAÑO, J. E.; CHEGWIN, C. Determinación de la toxicidade de *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* y *Paxillus involutus* sobre *Artemia salina*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 25, p. 186-187, 2008.

NUNES, B. S.; CARVALHO, F. D.; GUILHERMINO, L. M.; STAPPEN, G. V. Use the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. **Environmental Pollution**, v. 144, p. 453-462, 2006.

NUNES, E. A. *et al.* Genotoxic assessment on river water using different biological systems. **Chemosphere**, v. 84, p. 47–53, 2011.

OECD - ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT - 208. Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). **Terrestrial Plants: Growth Test**. Guideline for Testing of Chemicals N ° 208.OECD Publications Service, Paris, 1984

OECD - ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals**, Section 2, OECD Publishing. Paris; 2013.

OLIVEIRA, R. A. G.; ZANONI, T. B.; BESSEGATO, G. G.; OLIVEIRA, D. P.; UMBUZEIRO, C. E. G. A.; VALNICE, M.; ZANONI, B. The chemistry and toxicity of hair dyes. **Química Nova**, v. 37, n. 6, p. 1037–1046, 2014. <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20140143>

OLIVI, P.; COSTA, C. R.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, L.G. A toxicidade em ambientes aquáticos: Discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n°7, p. 1820-1830, 2008.

PALÁCIO, S. M.; ESPINOZA-QUIÑONES, F. R.; MÓDENES, A. N.; OLIVEIRA, C. C.; BORBA, F. H.; SILVA JR, F. G. Toxicity assessment from electro-coagulation treated-textile 158 dye wastewaters by bioassays. **Journal of Hazardous Materials**, v. 172, p. 330-337, 2009.

PALMIERI, M.J. *et al.* Cytogenotoxic effects of Spent Pot Liner (SPL) and its main components on human leukocytes and meristematic cells of *Allium cepa*. **Water, Air & Soil Pollution**, v.227, p.1-10, 2016.

PAMPLONA-SILVA, M. T.; GONÇALVES, L. C.; MARIN-MORALES, M. A. Genetic toxicity of water contaminated by microcystins collected during a cyanobacteria bloom. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 166, p. 223–230, 2018.

PARK, R. M.; CARREÓN, T.; HANLEY, K. W. Risk assessment for o-toluidine and bladder cancer incidence. **American journal of industrial medicine**, v. 64, n. 9, p. 758-770, 2021.

PARRA, A. L.; YHEBRA, R. S.; SARDIÑAS, I. G.; BUELA, L. I. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, v. 8, n. 5, p. 395-400, 2001.

PRIAC, A.; BADOT, P. M.; CRINI, G. Treated wastewater phytotoxicity assessment using *Lactuca sativa*: focus on germination and root elongation test parameters. **Comptes rendus biologies**, v. 340, n. 3, p. 188-194, 2017.

PELEGRINI, R.T. Estudo da sensibilidade de sementes de *Eruca sativa* (rúcula) utilizando substâncias tóxicas para agricultura. XXXV **Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola (CONBEA)** – João Pessoa - PB, 2009.

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

RAKHMATOVA, Mehriniso Musinovna. Linguistic features of the concept “Beauty” in English, Uzbek and Tajik national cultures. **Theoretical & Applied Science**, v. 10, p. 764-770, 2019.

RANK, J.; JENSEN, K.; JESPERSEN, P.H. Monitoring DNA damage in indigenous blue mussels (*Mytilus edulis*) sampled in coastal sites from Denmark. **Mutation Research**, v. 585, p. 33–42, 2005.

REHMAN, S. *et al.* Health risks of synthetic hair dyes: advantages of natural hair dying agents in unani medicine. **Traditional and Integrative Medicine**, p. 37-46, 2019.

RIBEIRO, A.C.; BARBOSA, L. W.; MACENA, D. A.; GOMES, V. M.; ANTUNES, P. A. Avaliação dos teores de chumbo e amônia em tinturas capilares. **Colloquium Exactarum**, vol. 9, n. Especial, Jul–Dez, p. 75- 80, 2017.

ROGERO, S.O. *et al.* Teste *in vitro* de citotoxicidade: Estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, p. 317-320, 2003

RUPPERT, E. E.; FOX, R.S.; BARNES, R. D. **Zoologia dos invertebrados: uma abordagem funcional-evolutiva**. In: Zoologia dos invertebrados: uma abordagem funcional-evolutiva. 2005. p. 1045-1045.

SÁNCHEZ-FORTÚN; S.; BARAHONA, M. V.; Toxicity and characterization of cholinesterase-inhibition induced by diisopropyl fluorophosphate in *Artemia salina* larvae. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 775-780, 2009.

- SCANLON, M.; OSCHMANN, A. Quantificação de chumbo, cobre, ferro e arsênico em amostras de tintura de cabelo. **Proceedings of the West Virginia Academy of Science**, v. 2, 2023.
- SCHOLZ, S. *et al.* The zebrafish embryo model in environmental risk assessment - Applications beyond acute toxicity testing. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 15, n. 5, p. 394–404, 2008.
- SINGH, N. P., MCCOY, M. T., TICE, R. R., SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research** 175:184–191, 1988.
- SISTI, A.; ARYAN, N.; SADEGHI, P. What is beauty? **Aesthetic Plastic Surgery**, v. 45, n. 5, p. 2163-2176, 2021.
- SOBANSKA, M.; SCHOLZ, S.; NYMAN, A.; CESNAITIS, R.; ALONSO, S.G.; KLUVER N, *et al.* Applicability of the Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test (OECD 236) in the Regulatory Context of Registration, Evaluation, Authorisation, and Restriction of Chemicals (REACH). **Environmental Toxicology and Chemistry** 2018;37:657–670.
- SOBRERO, M.C.; RONCO, A.E. Capítulo 4.4: Protocolos de Prueba. Bioensayo de Toxicidad Aguda con Semillas de Lechuga (*Lactuca sativa*). In: **Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas. Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones**. Gabriela Castillo editora. Edición conjunta IDRC, SEMARNAT, IMTA, México. 188 pp, 2004.
- SOMMAGGIO, L.R.D. *et al.* Ecotoxicological and microbiological assessment of sewage sludge associated with sugarcane bagasse. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.147, p.550–557, 2018.
- SOUZA, S. M. A. G. U.; FORGIARINI, E.; SOUZA, A. A. U. Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP). **Journal of Hazardous Materials**, v. 147, p. 1073-1078, 2007.
- SPENCE, R. *et al.* The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biological Reviews**, v. 83, n. 1, p. 13–34, 2008.
- STAMBOLOVA, I.; SHIPOCHKA, M.; BLASKOV, V.; LOUKANOV, A.; VASSILEV, S. Sprayed nanostructured TiO₂ films for efficient photocatalytic degradation of textile azo dye. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.117, p. 19-26, 2012.
- TALON-HUGON, C. The aestheticisation of taste, a consequence of the “aestheticisation” of beauty. **The Nordic Journal of Aesthetics**, v. 26, n. 54, 2018.
- TEIXEIRA, R. O.; CAMPAROTO, M. L.; MANTOVANI, M. S.; VICENTINI, V. E. P. Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L., *in vitro* and *in vivo* assays. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, p. 551–555, 2003.

- TEIXIDÓ, E.; PIQUÉ, E.; GÓMEZ-CATALÁN, J.; LLOBET, J.M. Assessment of developmental delay in the zebrafish embryo teratogenicity assay. **Toxicology in Vitro**, v. 27, n. 1, p. 469-478, 2013.
- TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; Kobayashi, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 206–221, 2000.
- TIEGS, L. M. R.; ZAMBON, C. P.; CAMPANA, G. A.; NUNES, J. S. O risco do uso de produtos não-cosméticos: a anilina à base de ÁLCOOL. **Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente**, v. 9, p. 590-596, 2018.
- TSIMPIDAKIS, A. *et al.* Hair Dyes Sensitization and Cross-Reactions: Challenges and Solutions: A Systematic Review of Hair Dye Allergens' Prevalence. **Dermatitis: contact, atopic, occupational, drug**. 2023.
- USEPA – United States Environmental Protection Agency. **Protocols for short term toxicity screening of hazardous waste sites**. US EPA 600/3-88/029, Corvallis, 1989.
- VEIGA, L.F.; VITAL, N. **Teste de toxicidade aguda com o microcrustáceo *Artemia sp.*** In: NASCIMENTO, I.A.; SOUSA, E.C.P.M, NIPPER, M. Métodos em Ecotoxicologia Marinha. Aplicações no Brasil. Editora Artes Gráficas e Indústria Ltda., 2002.
- VIDAKOVIĆ-CIFREK, Z.; PAVLICA, M.; REGULA, I.; PAPERS, D. Cytogenetic damage in shallot (*Allium cepa*) root meristems induced by oil industry “high-density brines”. **Environ. Contam. Toxicol**, v. 43, p. 284–291, 2002
- VINEIS, P.; PIRASTU, R. Aromatic amines and cancer. **Cancer Causes & Control**, Dordrecht, v.8, n.3, p.346-355, 1997.
- VRAL, A.; FENECH, M.; THIERENS, H. The micronucleus assay as a biological dosimeter of *in vivo* ionising radiation exposure. **Mutagenesis**, v.26, p.11–17, 2011.
- WOLFRAM, L.J. Endeavors in the area of hair care – chemical aspects of hair care processes and products. **Cosmetics**, v. 30, p.1-24, 2016.
- YATSISHINA, E. B *et al.* Um estudo integrado da cobertura capilar das antigas múmias egípcias. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 262-274, 2020.
- YILDIRIM, A. *et al.* The chemistry mechanism of hair dyes. **Middle East Journal of Science**, v. 8, n. 2, p. 173-193, 2022.
- ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações. 478 p. **Rima, São Carlos, SP, Brasil**, 2006.
- ZANONI, T. B.; PEDROSA, T. N. CATARINO, C. M.; SPIEKSTRA, S. W.; OLIVEIRA, D. P.; HARTOG, G. D.; BAST, A.; HAGEMANN, G.; GIBBS, S.; BARROS, S. B. M.; MARIA-ENGLER, S. S. Allergens of permanente hair dyes induces epidermal damage, skin

barrier loss IL-1 α increase in epidermal *in vitro* model. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 112, p. 265-272, 2017.

ZHANG, J.; ZHANG, C. Sampling and sampling strategies for environmental analysis, **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, 92:4, 466-478, DOI: 10.1080/03067319.2011.581371

ZHANG, T. *et al.* Comparative genotoxicity of water processed by three drinking water treatment plants with different water treatment procedures. **Frontiers of Environmental Science & Engineering**, v. 14, p. 1-11, 2020.