

Universidade Estadual de Campinas

Instituto de Química



**"ESTUDO DA DEPOSIÇÃO DE CERAMIDAS SOBRE A FIBRA  
CAPILAR PARA O COMBATE A DANOS CUTICULARES"**

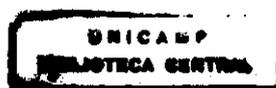
ANA LUÍSA SILVA SANT'ANNA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Profa. Dra. Inés Joekes

Orientadora

Abril de 2000



*Ao Menino Jesus de Praga, Luz do meu Caminho...*

*Aos meus queridos pais, Aloisyo e Norma.  
Somente seu imenso amor e apoio irrestrito me  
permitiram conquistar o que conquistei. Devo tudo a vocês.*

*À minha irmã Ana Cláudia, cuja coragem e perseverança fazem dela um espelho  
para mim.*



*Ao meu grande Amor Filha,  
Por me amar e me aceitar como sou,  
Por apostar em mim a todo o momento,  
Por me ajudar a ser mais forte a cada dia,  
Por me ensinar a não fazer tempestades em um copo d'água.  
E afinal, a vida não passa de um grande copo d'água.  
Amo-te.*



*“Só chegamos até aqui porque caminhamos juntos”.*

Adaptado de Albert Einstein

### Agradeço...

- à Inés, por todo o carinho e empenho a mim dispensados e por mostrar que as coisas mais simples são sempre as mais belas, sobretudo na Ciência;
- à Dona Baratinha (a nossa Dria), minha irmãzinha loira que, faça chuva, faça sol, está sempre de bem com a vida e pronta a dar uma palavra de incentivo;
- à Ná, minha amiga especial. Que você brilhe sempre e cada vez mais!
- à Carol, por me incentivar e ajudar a chegar onde eu queria no final desta jornada;
- à Carla, pela obtenção dos cortes ultrafinos, micrografias eletrônicas de transmissão e discussões sobre este trabalho;
- à Maria Alice e Flávia, pelas micrografias eletrônicas de varredura e ao Laboratório de Microscopia Eletrônica/IF-USP;
- aos colegas do laboratório: Adriano, Paula, Euler, Atilio, Antônio, Flávio, César, Vítor, Wilson, Alexandre, pela convivência diária e pelo aprendizado que tive com cada um;
- à Ercília, por demonstrar sempre boa vontade em ajudar;
- ao meu amigo Alê, pela grande amizade que criamos, pelos ensinamentos e pelos empréstimos do HP;
- à Mica e Amedéia, por me emprestarem o HP por tanto tempo;
- à Ana Marta, pelo fornecimento de amostras de ceramidas, cabelo padrão e discussões valiosas sobre cabelo;
- à Profa. Teresa Atvars e Sahori, pela ajuda e comentários durante os ensaios de cloreto de dansila;
- ao Prof. Ronaldo Aloise Pilli, pelos ensinamentos inestimáveis ao longo de minha iniciação científica;
- aos distribuidores de produtos dos Laboratórios Sérobiológicos, pela doação das ceramidas utilizadas;
- ao Henrique, por fornecer a amostra de tensoativo catiônico da Henkel;
- ao Carlinhos da Dria, pela companhia agradável que sempre é;
- à minha amiga desde o primeiro dia na Unicamp, Andréia;
- aos funcionários do IQ, sobretudo Nelson e Rose (BIQ), Bel e André (CPG), Paula e Samuel (xerox);
- à FAPESP pelo apoio financeiro;
- a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

## **Estudo da Deposição de Ceramidas Sobre a Fibra Capilar para o Combate a Danos Cuticulares**

Dissertação de Mestrado de Ana Luísa Silva Sant'Anna  
Orientadora: Profa. Dra. Inés Joeques  
Instituto de Química – UNICAMP - Cidade Universitária Zeferino Vaz  
Cx. Postal 6154 CEP13083-970 Campinas – São Paulo – Brasil

### **RESUMO**

Cabelo humano pertence a um grupo de proteínas denominadas  $\alpha$ -queratina. Uma fibra capilar contém 3 a 4 diferentes subunidades: cutícula, córtex, complexo da membrana celular (CMC) e, eventualmente, medula. As ceramidas são lipídios do CMC que asseguram a adesão entre células cuticulares e corticais. Há no mercado uma enorme quantidade de produtos contendo ceramidas, entretanto são poucos os relatos sobre a eficácia das mesmas. Portanto foram feitos ensaios para verificar se a ceramida da classe 6 reduz perdas protéicas do cabelo e melhora a eficiência do efeito de barreira das cutículas.

Foram investigados cabelos oxidados, fotooxidados e abrasados. Os seguintes estudos foram feitos: difusão de corante nas fibras capilares por duas metodologias (espectrofotometria e microscopia ótica de fluorescência), marcação dos aminoácidos da queratina com reagente específico (cloreto de dansila), quantificação de perda protéica pelo método de Lowry e microscopia eletrônica de varredura.

Utilizando-se a forma reduzida de equação de Crank obtiveram-se coeficientes aparentes de difusão de rodamina B no cabelo separadamente para cutícula e córtex. Na cutícula estes valores variaram de 0,82 a  $2,4 \times 10^{-10}$  cm<sup>2</sup>/s e no córtex obtiveram-se valores de 0,29 a  $0,49 \times 10^{-10}$  cm<sup>2</sup>/s. Os valores obtidos permitiram verificar que não havia diferenças entre amostras tratadas e não tratadas com ceramidas e que o corante penetrou nos fios por uma via intercelular. Através do método de microscopia ótica de fluorescência encontraram-se valores de 3,47 a  $4,44 \times 10^{-10}$  cm<sup>2</sup>/s que apresentam a mesma magnitude do primeiro método. Ambos os métodos forneceram valores de coeficiente aparente de difusão semelhantes àqueles encontrados na literatura para lã e nylon.

A marcação dos aminoácidos do cabelo com cloreto de dansila mostrou que uma maior quantidade de reagente se acoplou às fibras oxidadas comparado às fotooxidadas. Partindo-se de uma quantidade inicial de 3,80 moles de reagente, verificou-se que ao final de reação 3,58 a 3,68 moles haviam sido hidrolisados (95% da quantidade inicial). O fato de se ter utilizado um aparelho com baixa sensibilidade não permitiu obter dados precisos, mas a técnica é promissora para investigar alterações químicas em cabelo.

Ao longo dos tratamentos abrasivos a que as mechas de cabelo eram submetidas observou-se que, quando tratadas com ceramidas, as fibras perderam de 47 a 62% menos proteínas do que o controle. Micrografias eletrônicas de varredura mostraram que as amostras tratadas constantemente com ceramidas perderam menos material queratinoso durante a abrasão. Portanto a ceramida utilizada conferiu às fibras capilares uma maior coesão cuticular reduzindo a perda de suas proteínas constituintes.

## Effect of Ceramide-6 Against Cuticle Damage in Human Hair

Master Thesis of Ana Luísa Silva Sant'Anna

Adviser: Prof. Inés Joekes

Instituto de Química - UNICAMP - Cidade Universitária Zeferino Vaz

Cx. Postal 6154 CEP13083-970 Campinas - São Paulo - Brazil

### ABSTRACT

Human hair belongs to a protein group known as  $\alpha$ -keratin. It contains 3 or 4 different units: cuticle, cortex, cell membrane complex (CMC) and, eventually, medulla. Ceramides are lipids located in CMC that ensure adhesion between cuticle and cortical cells. There are many toilet products in the market which contain ceramides claiming that they act as protecting agents, but very few works report the efficacy of these lipids.

We studied the effect of ceramide-6 on dyed, irradiated and abraded hairs. The following studies were performed: diffusion of a dye within the fibers by two methodologies (spectrophotometry and fluorescence optical microscopy), keratin's aminoacid labeling with dansyl chloride, assessment of protein loss according to Lowry's method and scanning electron microscopy.

Using the reduced form of Crank's equation, we obtained values for the apparent diffusion coefficient of rhodamine B in hair cuticle ( $0.82$  to  $2.4 \times 10^{-10}$  cm<sup>2</sup>/s) and in hair cortex ( $0.29$  to  $0.49 \times 10^{-10}$  cm<sup>2</sup>/s). The obtained values allowed us to conclude that there were no differences between the samples treated and not treated with ceramides and also that the dye penetrated into the fibers through an intercellular route. Using the fluorescence microscopy method we found values between  $3.47$  and  $4.44 \times 10^{-10}$  cm<sup>2</sup>/s that present the same magnitude as the first method. Both methods supplied values of apparent diffusion coefficient very similar to those found in the literature for wool and nylon.

Labeling of hair's amino acids with dansyl chloride showed that a greater amount of reagents coupled to dyed fibers rather than to irradiated fibers. Starting with an amount of 3.80 mols of reagent, we noticed that at the end of the reaction 3.58 to 3.68 mols of the reagent had been hydrolysed (95% of the initial amount). Once we used an equipment with low sensitivity, we didn't obtain accurate data, still this technique is quite promising to investigate chemical alterations in human hair.

Throughout the abrading treatments to which hair tresses were submitted we observed that fibers treated with ceramides lost from 47 to 62% less proteins than the control. Scanning electron micrographs showed that the samples treated frequently with ceramides lost less keratinous matter during abrasion. Therefore the employed ceramide provided to the hair fibers a greater cuticular cohesion while reducing the loss of their constituent proteins

## **Súmula Curricular**

### **FORMAÇÃO ACADÊMICA**

Bacharel em Química – Instituto de Química – UNICAMP/1998

### **CONGRESSOS**

- \* XII Congresso Nacional de Cosmetologia (1998 – São Paulo, Brasil);
- \* IV Congresso de Household & Auto Care (2000 – São Paulo, Brasil);
- \* XIV Congresso Nacional de Cosmetologia (2000 – São Paulo, Brasil);
- \* XXI Congresso IFSCC (International Federation of the Societies of Cosmetic Chemists (2000 – Berlim, Alemanha).

### **CURSOS E ATIVIDADES PROFISSIONAIS RELEVANTES**

- \* Projeto de pesquisa “Síntese do Feromônio (R)-Hexadecanolídeo”, com apoio financeiro da FAPESP (Instituto de Química, UNICAMP, 1997);
- \* Curso “Géis, Desodorantes e Antiperspirantes: Aspectos Técnicos e Práticos para o Desenvolvimento de Formulações” (Racine Qualificação e Assessoria S/C Ltda, São Paulo, Brasil, 1999);
- \* Curso “Aspectos Técnicos para Formulação de Produtos para Pré e Pós Bronzeamento e Fotoproteção” (Racine Qualificação e Assessoria S/C Ltda, São Paulo, Brasil, 2000);
- \* Curso “Desenvolvimento e Controle de Qualidade de Produtos Domissanitários” (Racine Qualificação e Assessoria S/C Ltda, São Paulo, Brasil, 2000)

## ÍNDICE

<b>I – INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>I.1 Estrutura e Morfologia Capilar</b> .....	1
<b>I.2 Classes, Funções e Obtenção das Ceramidas</b> .....	3
<b>I.3 Difusão de Compostos para o Interior da Fibra</b> .....	4
<b>I.4 Marcação dos Aminoácidos das Fibras com DNS-Cl</b> .....	5
<b>I.5 Efeitos de Ações Abrasivas sobre a Estrutura Capilar</b> .....	6
<b>I.6 Determinação de Perda Protéica em Cabelo segundo Método de Lowry</b> .....	7
<b>I.7 Calibração multivariada</b> .....	8
<b>II – OBJETIVOS</b> .....	10
<b>III - PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	11
<b>III.1 Materiais</b> .....	11
III.1.1 Fibras Capilares .....	11
III.1.2 Ceramidas Ácido Alfa Hidroxiladas .....	11
III.1.3 Materiais Diversos .....	12
III.1.4 Reagentes .....	12
<b>III.2 Aparelhos e Equipamentos</b> .....	13
<b>III.3 Métodos</b> .....	13
III.3.1 Extração dos Lipídios Externos das Fibras .....	13
III.3.2 Preparação e Aplicação da Emulsão Catiônica de Ceramidas .....	14
III.3.3 Tratamentos Oxidativos em Fibras Capilares .....	15
III.3.4 - Tratamentos Fotooxidativos em Fibras Capilares .....	15
III.3.5 Modelos de Calibração Multivariada .....	17

III.3.5.1 Analito Rodamina B -----	17
III.3.5.2 Analito Ácido Dânsico (DNS-OH) -----	18
III.3.6 Determinação do Diâmetro dos Cabelos -----	19
III.3.7 Determinação do Coeficiente de Difusão de Rodamina B nas Fibras Capilares por Medidas Espectrofotométricas	20
III.3.8 Determinação do Coeficiente de Difusão de Rodamina B nas Fibras por Cálculo da Área Penetrada pelo Corante	22
III.3.8.1 Impregnação de Fibras com Solução Aquosa de Rodamina B ----	22
III.3.8.2 Obtenção de cortes ultrafinos -----	22
III.3.8.3 Observação no Microscópio Ótico de Fluorescência -----	22
III.3.8.4 Determinação da Área de Penetração de Rodamina nos Fios Utilizando o Software Image-Pro Plus™	23
III.3.9 Avaliação Quantitativa de Danos em Fibras Utilizando Marcador de Aminoácidos	24
III.3.9.1 Reação de Dansilação -----	24
III.3.9.2 Análise da Concentração de DNS-OH ao Fim da Reação de Dansilação	24
III.3.10 Tratamentos Abrasivos em Fibras Padrão -----	24
III.3.11 Ensaios de Coesão Cuticular das Fibras Abrasadas -----	25
III.3.11.1 Determinação de Proteína pelo Método de Lowry -----	25
III.3.11.1.1 Reagentes Utilizados -----	25
III.3.11.1.2 Construção da Curva de Calibração -----	26
III.3.11.2 Determinação do Tempo de Sonicação das Fibras -----	28
III.3.11.3 Sonicação das Fibras -----	28
III.3.11.4 Determinação de Proteína nos Sobrenadantes -----	28

III.3.12 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) -----	28
III.3.13 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) -----	28
<b>IV – RESULTADOS</b> -----	<b>30</b>
<b>IV. 1 Determinação do Coeficiente de Difusão Aparente (<math>D_{apar}</math>) de Rodamina B nas Fibras Capilares por Medidas Espectrofotométricas</b>	<b>30</b>
IV.1.1 Determinação dos Valores de Concentração Após 24 horas ( $C_{\infty}$ ) -----	30
IV.1.2 Imersão de Amostras de Cabelo em Solução de Rodamina por Três Horas	31
IV.1.3 Determinação da Quantidade de Rodamina Penetrada nas Fibras -----	32
IV.1.4 Separação da Curva da Razão entre Quantidade de Solute Sorvido ao Longo do Tempo e Quantidade Máxima de Solute Sorvido ( $Q_t/Q_{\infty}$ ) em Função da Raiz Quadrada do Tempo em Dois Segmentos de Reta	33
<b>IV.2 Determinação do Coeficiente de Difusão de Rodamina B nas Fibras Capilares por Cálculo da Área de Penetração do Corante</b>	<b>37</b>
<b>IV.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão</b> -----	<b>39</b>
<b>IV.4 Avaliação Quantitativa de Danos em Fibras utilizando Marcador de Aminoácidos</b>	<b>42</b>
IV.4.1 Espectros de Cloreto de Dansila (DNS-Cl) e Ácido Dânsico -----	42
IV.4.2 Determinação da Concentração Final de DNS-OH -----	42
<b>IV.5 Ensaio de Coesão Cuticular das Fibras Abrasadas</b> -----	<b>44</b>
<b>IV.6 Microscopia Eletrônica de Varredura</b> -----	<b>46</b>
<b>V – DISCUSSÃO</b> -----	<b>52</b>
<b>V.1 O Método Desenvolvido</b> -----	<b>52</b>
<b>V.2 O Modelo de Difusão em Cabelo</b> -----	<b>53</b>
<b>V.3 Validação do Modelo</b> -----	<b>54</b>

<b>V.4 O Mecanismo de Difusão em Cabelo</b>	<b>55</b>
<b>V.5 Os Tratamentos sobre as Fibras</b>	<b>55</b>
<b>V.6 A Fitoceramida-6 nos Ciclos Abrasivos</b>	<b>56</b>
<b>V.7 Sobre Produtos de “Hair Care” que Contêm Ceramidas</b>	<b>58</b>
<b>VI – CONCLUSÕES</b>	<b>60</b>
<b>VII – REFERÊNCIAS</b>	<b>62</b>

## I - INTRODUÇÃO

### I.1 Estrutura e Morfologia Capilar

Cabelo e lã em seu estado natural pertencem a um grupo de proteínas denominadas  $\alpha$ -queratinas. Queratinas são definidas por Lundgren e Ward<sup>1</sup> como “sistemas celulares naturais de proteínas fibrosas ligadas transversalmente pelo enxofre de resíduos cistéicos”, o que as torna altamente resistentes a ataques químicos. Tal como outras proteínas, fibras queratinosas são polipeptídeos compostos por diversos tipos de resíduos de  $\alpha$ -L-aminoácidos.

Histológica e quimicamente, as fibras queratinosas são bastante complexas devido à heterogeneidade das moléculas protéicas. Histologicamente, elas apresentam 3 componentes principais<sup>2</sup>: (a) células cuticulares (cerca de 10% da fibra) que envolvem a fibra formando uma barreira protetora contra agressões externas e tratamentos químicos e responsáveis pelas propriedades superficiais da fibra ; (b) células corticais (cerca de 88% da fibra) de formato alongado, alinhadas paralelamente à direção da fibra que são as principais responsáveis pelas propriedades mecânicas do cabelo e onde se localizam os grânulos de melaninas, pigmentos de natureza, química e formatos variáveis, responsáveis pela coloração do cabelo e por sua fotoproteção; e (c) complexo da membrana celular (cerca de 2% da fibra) que une células cuticulares e corticais adjacentes. A medula somente é encontrada em alguns tipos de fibras e consiste em um núcleo de células cheias de ar que se estende até a metade da fibra. A figura 1 apresenta um estereograma da estrutura da fibra capilar ilustrando as camadas cuticulares e o córtex.

Próximo à raiz do couro cabeludo, a camada cuticular apresenta uma espessura de 3 a 5  $\mu\text{m}$ . Esta camada constitui-se de uma série de escamas celulares com 0,2 a 0,4  $\mu\text{m}$  de espessura e, em fibras recém-formadas, a cutícula consiste em cinco a dez escamas sobrepostas. Esta sobreposição se assemelha à disposição de telhas em um telhado com as borda expostas direcionadas para a ponta da fibra<sup>3,4,5</sup>. Um esquema ilustrando os vários componentes da cutícula se encontra na figura 2.

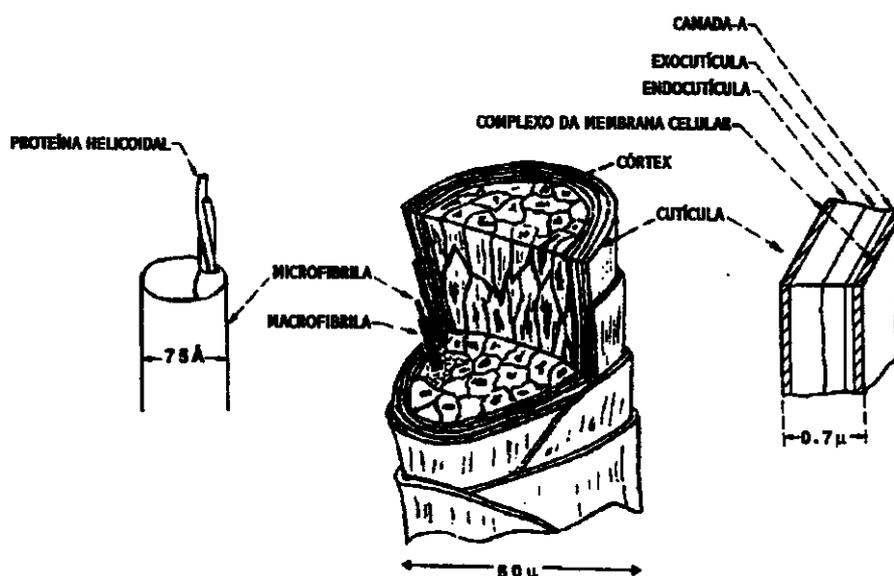


Figura 1: Estereograma da estrutura da fibra capilar ilustrando as subunidades cutícula e córtex<sup>6</sup>.

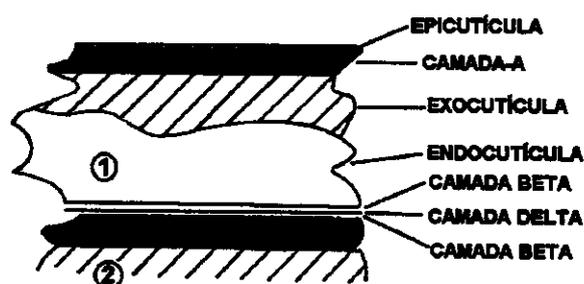


Figura 2: Diagrama esquemático dos diversos componentes das células cuticulares da fibra capilar<sup>7</sup>.

Os principais componentes da cutícula são a exocutícula e a endocutícula. Estas apresentam reatividades químicas bem distintas<sup>5</sup>. A exocutícula apresenta um alto nível de enxofre e é, portanto, altamente reticulada por pontes de dissulfeto da cistina. Já a endocutícula apresenta um baixo nível de cistina e é facilmente degradada por enzimas<sup>8</sup>.

A endocutícula juntamente com o complexo da membrana celular, material intermacrofibrilar e remanescentes nucleares são subunidades morfológicas da fibra capilar constituídas por proteínas não-queratinosas, ou seja, que possuem poucas pontes de dissulfeto devido ao baixo teor de enxofre e intumescem facilmente<sup>2</sup>.

Envolvendo cada célula cuticular há uma membrana finíssima (cerca de 25Å) denominada epicutícula muito resistente a tratamentos químicos. A camada-A que se encontra

abaixo da epicutícula e a camada interna, difícil de ser observada e localizada entre a endocutícula e o complexo da membrana celular, também apresentam alto grau de conteúdo cistéico tal como a exocutícula<sup>5</sup>.

Cada célula cuticular é separada das adjacentes pelo complexo da membrana celular<sup>5</sup> o qual possivelmente também está envolvido com as propriedades mecânicas da fibra<sup>9</sup>. Micrografias mostram que tais membranas consistem de 2 camadas membranosas lipoprotéicas (camadas-β) e entre as quais há uma camada central espessa e densa de proteínas não-queratinosas denominada cimento intercelular (camada-δ)<sup>10,11</sup>.

## L2 Classes, Funções e Obtenção das Ceramidas

Os lipídios estruturais do complexo da membrana celular associados a uma matriz proteinácea não somente asseguram a coesão entre os componentes do cabelo como também constituem uma barreira contra certos processamentos químicos e físicos<sup>12</sup>. As ceramidas, pertencentes ao grupo dos esfingolípídeos, constituem uma classe de lipídios polares estruturais presentes no complexo da membrana celular. Sua “espinha dorsal” é a esfingosina, um amino álcool de 18 carbonos (vide figura 3), que é acilada com um ácido graxo de cadeia longa<sup>13</sup>. A estrutura genérica da ceramida se encontra ilustrada na figura 4.

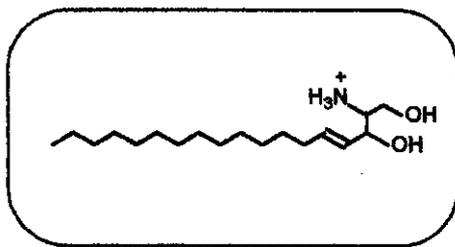


Figura 3: Estrutura da esfingosina.

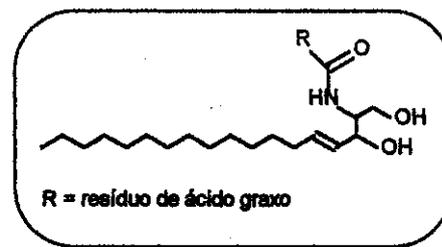


Figura 4: Estrutura genérica de ceramida.

Hussler e Kaba analisaram por CG/EM várias classes de ceramidas que podem ser isoladas das fibras capilares em sua forma livre, ou seja, não covalentemente ligadas ao complexo da membrana celular<sup>14</sup>. Estas foram identificadas como sendo majoritariamente as ceramidas das classes II e V segundo classificação de Wertz e Downing<sup>15</sup>.

Na natureza as ceramidas existem em quantidades extremamente baixas, tornando seu uso industrial difícil. Para torná-las disponíveis para uso cosmético, alguns pesquisadores sintetizaram pseudo-ceramidas que são análogas à estrutura de ceramidas das diversas classes presentes na natureza<sup>16</sup>. Uma grande companhia de matéria-prima cosmética, denominada Cosmoferm, desenvolveu uma tecnologia que permite a produção de algumas ceramidas idênticas às produzidas pelo corpo humano. Para tal, primeiramente a esfingosina, precursora das ceramidas, é produzida por células de fermento e subseqüentemente purificada. Então, um ácido graxo de origem vegetal se liga à esfingosina tanto por processos clássicos de acilação como utilizando uma enzima natural<sup>17</sup>.

### I.3 Difusão de Compostos para o Interior da Fibra

A velocidade de transporte de substâncias externas para o interior de fibras queratinosas é bastante afetada pela natureza da estrutura destas. Eventuais modificações nesta estrutura decorrentes de tratamentos físicos e/ou químicos podem ser avaliadas segundo medidas de difusão. De maneira genérica, um aumento da velocidade de difusão de corante pode ser atribuída a uma menor eficiência da função de barreira das camadas cuticulares e até mesmo alterações no córtex<sup>18</sup>.

No processo de difusão são observados três estágios distintos: 1) as moléculas de soluto são transportadas para a interface fibra/água; 2) as moléculas são constantemente adsorvidas sobre as camadas mais externas do cabelo; 3) as moléculas difundem para o interior da fibra. A difusão para o interior das fibras apresenta, pelo menos, 2 fatores controladores: a afinidade, ou seja, a diferença de potencial químico entre as moléculas em solução e as moléculas no cabelo e o número de sítios disponíveis neste<sup>19</sup>.

Há dois caminhos teóricos para a difusão para o interior da fibra<sup>20</sup> (figura 5): (1) difusão transcelular e (2) difusão intercelular. A rota transcelular envolve difusão através das células cuticulares, passando por entre proteínas com altas e baixas reticulações por pontes de dissulfeto. A difusão intercelular envolve penetração por entre as células cuticulares e através do cimento intercelular (baixa reticulação por pontes de dissulfeto). No passado, a difusão transcelular era a rota geralmente aceita devido à maior quantidade de área superficial disponível para este tipo de penetração. Acredita-se, hoje em dia, que a rota intercelular é a preferencial para a entrada da maioria das moléculas, pois o cimento intercelular é composto

por proteínas de baixo teor de enxofre que intumescem mais facilmente do que as regiões altamente reticuladas<sup>6</sup>.

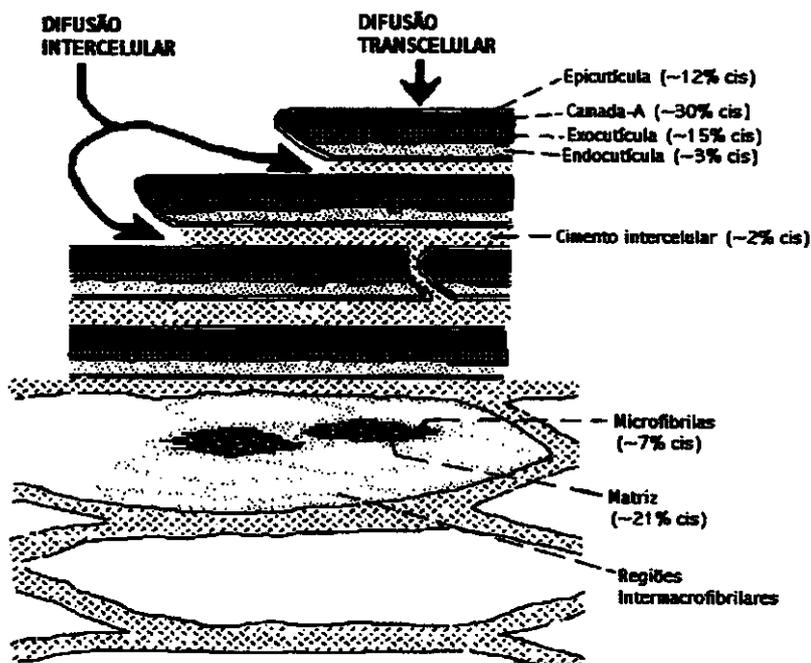


Figura 5: Esquema ilustrando difusões transcelular e intercelular<sup>6</sup>.

#### I.4 Marcação dos Aminoácidos das Fibras com DNS-Cl

Cloreto de dansila (DNS-Cl) é um marcador de aminoácidos que há tempos é utilizado como reagente fluorescente para a determinação de aminoácidos terminais de proteínas<sup>21,22</sup>.

Uma vez que as fibras capilares constituem um material proteináceo de diversas cadeias polipeptídicas, elas apresentam aminoácidos N-terminais e outros grupos capazes de reagir com DNS-Cl em determinadas condições de pH, adquirindo fluorescência sob luz ultravioleta<sup>23</sup>.

A intensidade de fluorescência é uma função da quantidade de DNS-Cl ligado ao cabelo. Qualquer modificação química que altere o número de grupos amino terminais e outros sítios reativos como lisina, arginina, grupos tióis, tirosina, histidina e cisteína (contêm

hidroxilas fenólicas, imidazol e grupos  $\epsilon$ -amino), alterará também a quantidade de DNS-Cl ligada ao cabelo e, portanto, a intensidade de fluorescência<sup>23</sup>.

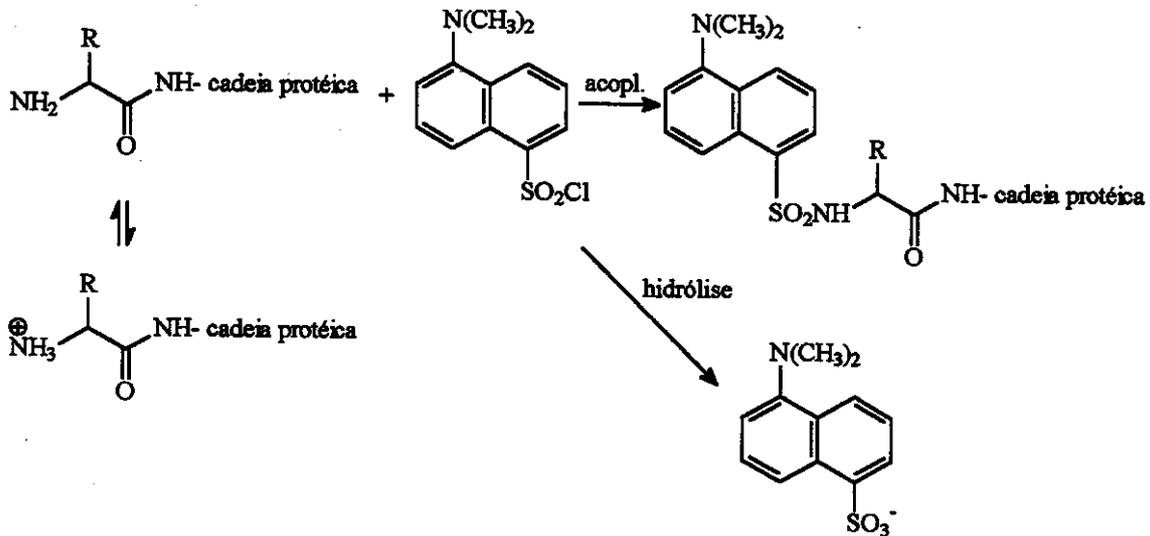


Figura 6: Dansilação de amina primária da cadeia peptídica e hidrólise do reagente.

Experimentalmente adiciona-se um grande excesso de reagente para que haja uma marcação eficiente, pois fatores estéricos fazem com que o acesso a certos grupos reativos da queratina se torne difícil. O excesso de reagente é hidrolisado ao ácido correspondente<sup>21</sup>.

### 1.5 Efeitos de Ações Abrasivas sobre a Estrutura Capilar

Abrasões cotidianas aplicadas ao cabelo podem ser descritas pelas seguintes ações: utilização de xampus, escovações e penteações a seco ou úmido, secagens com toalha e secador, dentre outras.

Xampus podem efetivamente danificar o cabelo, sobretudo a cutícula, de diferentes maneiras. Podem danificá-lo por abrasão/erosão tanto durante o processo de limpeza, quando os fios são esfregados uns contra os outros ou durante a secagem com toalha ou secador. Xampus podem lentamente dissolver ou remover lipídios estruturais e material proteínico do complexo da membrana celular das fibras, deixando-as secas e mais propensas a sofrerem mais danos<sup>6</sup>.

Okumura<sup>24</sup> afirma que, no processo de limpeza, a maior parte do dano causado às cutículas ocorre na etapa em que as fibras são esfregadas umas contra as outras na presença de detergentes. Kelly e Robinson<sup>25</sup> concluíram que a secagem dos fios com toalha também os danifica, porém é um consenso que a ação de maior efeito abrasivo sobre os fios é a penteação. Já foi demonstrado que a perda cuticular é maior quando o cabelo é submetido a uma penteação quando úmido do que quando seco<sup>24,25</sup>.

As ações abrasivas descritas tornam a cutícula suscetível a mais erosões e a um “levantamento” devido à dissolução de componentes não queratinosos, o que aumenta a velocidade de difusão de substâncias para o seu interior e acarreta eventualmente mais danos devido a penetração destas<sup>6</sup>. A perda ou a fragmentação gradual das camadas cuticulares resultam na formação de pontas duplas<sup>26</sup>.

Observando-se as regiões da fibra próximas à raiz e à ponta por microscopia eletrônica de transmissão, aparecem “buracos” nas seções transversais, que apresentavam maiores dimensões nas proximidades das pontas. Tais buracos foram atribuídos a danos causados por lavagens com xampus através da remoção de componentes das regiões não queratinosas do cabelo, deixando as regiões intercelulares mais suscetíveis à ruptura<sup>10</sup>.

#### **I.6 Determinação de Perda Protéica em Cabelo segundo Método de Lowry**

O método descrito por Lowry *et al.* em 1951<sup>27</sup> é, sem dúvida alguma, o mais utilizado para a determinação de proteínas em análises bioquímicas em virtude de suas simplicidade, precisão e sensibilidade. Como consequência desta popularidade, o método tem sido submetido a extensivas avaliações ao longo dos anos<sup>28</sup> e a diversas modificações da versão original<sup>29</sup>. É consideravelmente mais sensível que a reação de Biureto (100 vezes), o método de absorção em 280 nm (10 vezes) e o método turbidimétrico.

A principal desvantagem é a falta de especificidade, embora tal problema seja de mesma magnitude em todos os métodos de quantificação protéica. Muitas substâncias agem como interferentes, tal como lipídios e detergentes, ambos presentes nas alíquotas estudadas (ceramidas/tensoativo catiônico), porém a adição de dodecil sulfato de sódio permitiu a solubilização dos mesmos reduzindo a interferência<sup>28,29,30</sup>. Os padrões indicados para a calibração são soluções aquosas de albumina de soro bovino (ASB) na forma pura e cristalizada. Infelizmente, por ser um procedimento empregado em uma grande variedade de

situações experimentais, não fornece a mesma resposta com diferentes proteínas<sup>29</sup>. Outras desvantagens incluem velocidades de reação relativamente lentas, instabilidade de alguns reagentes e não linearidade da curva de calibração com ASB<sup>28</sup>.

O princípio do método de Lowry é baseado na redução do ácido misto fosfomolibdico-tungstico, o chamado reagente de Folin Ciocalteu. Este ácido misto consiste nas seguintes espécies químicas:  $3\text{H}_2\text{O} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot 13\text{WO}_3 \cdot 5\text{MoO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  e  $3\text{H}_2\text{O} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot 14\text{WO}_3 \cdot 4\text{MoO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ . A redução destas espécies, onde a proteína desempenha o papel de agente redutor, envolve a perda de 1, 2 ou 3 átomos de oxigênio do tungstato e/ou molibdato, produzindo uma ou mais espécies reduzidas que apresentam uma coloração azul característica ( $\lambda_{\text{max}}$  750nm)<sup>28</sup>. O reagente de Folin é mais rapidamente reduzido pelos resíduos dos aminoácidos aromáticos tirosina e triptofano e, em menor grau, por cistina e cisteína e mais lentamente reduzido pelos quelatos de cobre (metal adicionado à proteína para facilitar a transferência de elétrons) da cadeia peptídica ou das cadeias laterais polares<sup>29</sup>. Como a intensidade de cor varia com diferentes proteínas devido aos variados teores de tirosina, triptofano, cisteína e cistina e pelo fato de ter-se utilizado ASB como padrão para a calibração e não as proteínas do cabelo, as determinações de perda de proteína consistiram em valores relativos e não absolutos<sup>31</sup>.

### **I.7 Calibração multivariada**

Uma das características mais interessantes dos modernos instrumentos é o número das variáveis que podem ser medidas em uma única amostra. Um exemplo notável é a intensidade de absorção em mil ou mais comprimentos de onda em um espectro. De posse de tal quantidade de dados, a necessidade de ferramentas novas e mais sofisticadas para tratá-los e extrair informações relevantes cresceu rapidamente, dando origem à Quimiometria, área destinada à análise de dados químicos de natureza multivariada<sup>32</sup>.

Para a construção de modelos de calibração multivariada é necessário a preparação de diversas soluções-padrão de diferentes concentrações conhecidas do analito de interesse. Ao se trabalhar com dados de espectrofotometria UV-Vis e a fim de se obter um modelo linear, as soluções-padrão devem apresentar concentrações dentro da faixa de linearidade da lei de Beer.

De uma maneira genérica, um método de calibração multivariada, que no presente caso foi PLS (Partial Least-Squares ou Mínimos Quadrados Parciais)<sup>33,34</sup>, utiliza toda a informação espectral estabelecendo constantes de proporcionalidade individuais entre concentração e

intensidade de absorção. O software MATLAB™ foi escolhido por oferecer um ambiente computacional amigável e de alto nível, especialmente na área de álgebra linear.

O processo geral de calibração<sup>35,36</sup> consiste em duas etapas: Modelagem, que estabelece uma relação matemática entre o conjunto de espectros das soluções-padrão e suas concentrações e a Validação, que otimiza a relação no sentido de uma melhor descrição do analito de interesse. Uma vez concluída a calibração, o sistema (espectrofotômetro UV-Vis + modelo matemático), está apto para ser utilizado em previsão de outras amostras.

Durante o processo de modelagem, as variáveis, no caso as intensidades de absorção de cada espectro, sofrem um pré-processamento. Os mais utilizados consistem em centrar na média ou autoescalar os dados<sup>32</sup>. No caso de calibração de dados espectroscópicos, recomenda-se centrar os dados na média. Calcula-se a média das intensidades para cada comprimento de onda e subtrai-se cada intensidade do respectivo valor médio.

Para construir o modelo, também é necessário determinar o número de componentes principais a serem utilizadas. A função destas é descrever os pontos usando o menor número possível de eixos. A primeira componente principal tem sempre uma direção tal que descreve o máximo espalhamento das amostras.

Uma vez construído o modelo, faz-se a validação com novas soluções-padrão ou com algumas daquelas utilizadas para construir o modelo. Este faz uma previsão da concentração destas soluções e compara com seus valores reais. Os erros assim obtidos fornecem uma noção sobre a qualidade do modelo.

## II - OBJETIVOS

Há atualmente uma grande quantidade de produtos cosméticos capilares contendo ceramidas sendo comercializados. Entretanto são muito poucos os relatos científicos sobre a eficácia destes lipídios sobre as fibras capilares. Sabe-se que as ceramidas das classes I a VI participam eficientemente na coesão celular e na manutenção do efeito de barreira do extrato córneo da pele<sup>14</sup>, porém não foi demonstrado se as ceramidas podem proporcionar estes mesmos efeitos ao cabelo, uma estrutura altamente queratinizada.

Por esses motivos, propôs-se como objetivo deste trabalho utilizar uma classe de ceramidas para verificar seu efeito sobre fibras capilares antes e após tratamentos oxidativos, fotooxidativos (condições extremas) e abrasivos. Para tanto, pretendeu-se desenvolver um método que permitisse avaliar se a aplicação de ceramidas acarreta melhorias no efeito de barreira das cutículas, ou seja, uma redução na velocidade de penetração de substâncias externas no cabelo. Visou-se também verificar se uma reposição constante de ceramidas no cabelo reduz a quantidade de material protéico perdido durante a abrasão, melhorando assim, a coesão cuticular.

### III - PARTE EXPERIMENTAL

#### III.1 Materiais

##### III.1.1 Fibras Capilares

Em todo o trabalho foi utilizado cabelo padrão de cor castanha escura. Trata-se de um cabelo cujas propriedades podem ser tomadas como universalmente representativas. Este tipo de cabelo é internacionalmente conhecido como de origem caucasiana, jamais submetido a qualquer processamento químico (descoloração, permanente, alisamento ou tingimento) e mantido sob cuidados especiais. Os fios, oriundos de um mesmo couro cabeludo, foram fornecidos por Natura Cosméticos S.A. e comercializados por De Meo Brothers Inc. A mecha apresentava um comprimento de 25cm.

##### III.1.2 Ceramidas Ácido Alfa Hidroxiladas

Um complexo de ceramidas vegetais, sob nome comercial Sphingoceryl® VEG-8712, foi cedido por Natura Cosméticos S.A. e fabricado por Laboratoires Sérobiologiques S.A. Sua composição, segundo a nomenclatura internacional de ingredientes cosméticos (INCI), é Octildodecanol, Trilaurin e Extrato de Semente de Girassol<sup>37</sup>. O produto apresentava uma consistência pastosa e uniforme e sua viscosidade decaía bastante com o aumento da temperatura.

Segundo as especificações do fabricante, Sphingoceryl® VEG-8712 contém um princípio ativo lipídico de composição e função análogas aos lipídios epidérmicos. Esta fitoceramida é extraída e purificada a partir de uma espécie de girassol (*Helianthus annuus*) proveniente do Peru e incorporada em um excipiente de origem vegetal denominado  $\beta$ -sitosterol glicosilado<sup>37</sup>.

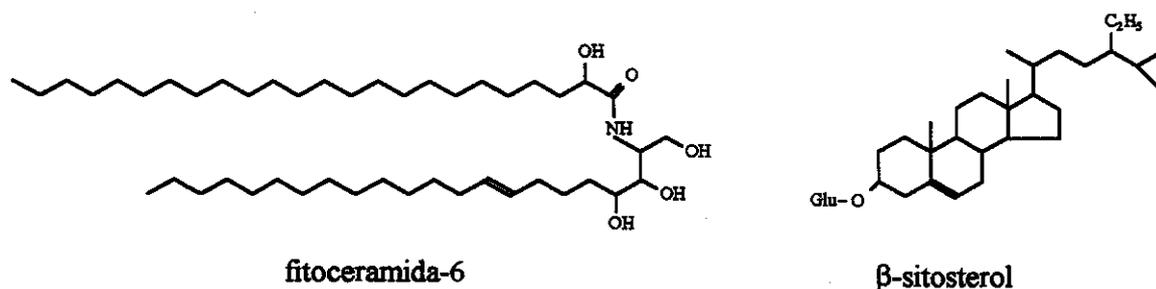


Figura 7: Estrutura química dos componentes de Sphingoceryl® VEG-8712: fitoceramida-6 (ativo) e β-sitosterol glicosilado (excipiente).

As especificações do fabricante<sup>37</sup> fornecem as seguintes informações de Sphingoceryl® VEG-8712:

- 1) Quantidade de fitoceramida-6 no produto: 1% (m/m);
- 2) Quantidade de fosfolípidios: 11% (m/m);
- 2) Características organolépticas: produto opaco, de coloração bege, ligeiro odor característico e consistência pastosa;
- 3) Dosagem de uso do produto em formulações: 1 a 3% (m/m);
- 4) Índice de refração: 1,458 – 1,468;
- 5) Microbiologia: 100 CFU/grama (não patogênicas).

**Observação:** Na seção de Métodos, quando se faz menção a ceramidas refere-se na realidade ao complexo Sphingoceryl® VEG-8712.

### III.1.3 Materiais Diversos

Várias vidrarias; Lâmpada de vapor de mercúrio - Sylvania 125W; Suportes de madeira de 10x10cm e 10x5cm; Extrator “thimble” ; Indicadores universais de pH; Filme Kodak PX125 - asa 125; Pente de polietileno; Toalhas felpudas; Pipetas automáticas 1-5mL e 0,1-1mL; Tubos de viton®; Cubeta de fluxo de quartzo *suprasil* com caminho ótico de 0,10cm; Cubeta de quartzo de volume reduzido com caminho ótico de 1,0cm; Navalha de vidro; Moldes de inclusão; Luvas de látex.

### III.1.4 Reagentes

Éter etílico p.a. (Merck, Nuclear); Acetona p.a. (Merck, Nuclear); Diclorometano (Nuclear); 1,4-Dioxano (Aldrich); Água oxigenada 20 volumes; Água deionizada, obtida em um sistema Millipore MilliQ plus, com condutividade nominal de 1.82μS/cm; Hidróxido de

amônio conc. (Vetec); Persulfato de potássio (Merck); Cloreto de cetil trimetil amônio - CTAC (Henkel - Cospa); Rodamina B (Riedel-de Hæen); Bicarbonato de sódio (Vetec); Cloreto de dansila (Sigma); Lauril sulfato de sódio - LSS (Merck); Gás nitrogênio (Air Liquide); Resina Spurr (Aldrich); Tetróxido de ósmio (Aldrich); Tampão cacodilato (Aldrich); Etanol absoluto (Aldrich); Óxido de propileno (Aldrich); Acetato de uranila (Aldrich); Citrato de chumbo (Aldrich); Albumina de Soro Bovino cristalizada (Sigma Aldrich); Sulfato de cobre pentaidratado (Cinética Química); Tartarato de sódio e potássio (Ecibra); Carbonato de sódio anidro (Merck); Pastilhas de NaOH (Nuclear); Reagente de Folin Ciocalteu (Química Especializada).

### III.2 Aparelhos e Equipamentos

- Medidor de Tamanho de Partícula Brookhaven Instruments ZetaPlus;
- Espectrofotômetro UV-Vis HP8452A / diode array;
- Ultramicrotomo Sorvall Porte – Blum, modelo MT2-B;
- Microscópio Óptico de Fluorescência Zeiss Jenalumar;
- Fotomultiplicadora SPEX 500;
- Bomba peristáltica Smatec®;
- Micrômetro Mitutoyo;
- Ultra-som Thornton GA240 (25KHz / 240W);
- Centrifugador Fanem Excelsea Baby;
- Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL JSM 840A operando a 25 KV;
- Microscópio Eletrônico de Transmissão Philips CM 200 operando a 200KV.

### III.3 Métodos

#### III.3.1 Extração dos Lipídios Externos das Fibras

Uma massa de cabelo variando de 0,8 a 2,2 g teve seus lipídios externos extraídos em extrator Soxhlet com 250mL de éter etílico por 8 horas<sup>38</sup>. Após a extração, as fibras foram secas ao ar livre, à temperatura ambiente, estocadas em placas de Petri ou em sacos plásticos com fechamento hermético e mantidas em dessecador com sílica-gel.

Esta extração tinha por objetivo remover o sebo natural da superfície do cabelo e outras impurezas ou resíduos.

### III.3.2 Preparação e Aplicação da Emulsão Catiônica de Ceramidas

Formulou-se uma emulsão catiônica de aproximadamente 10 g contendo 2% (m/m) de ceramida e 2% (m/m) do surfactante catiônico cloreto de cetil trimetil amônio. Os dois componentes foram pesados em um recipiente e aquecidos suavemente em banho-maria até a temperatura de 60°C, quando ocorreu a fusão da mistura. A esta mistura foram adicionadas lentamente pequenas porções de água mantendo-se a agitação. Deixou-se a emulsão resfriar à temperatura ambiente. Para cada grama de fibra utilizaram-se 7,5 mL de emulsão. O cabelo foi totalmente imerso na emulsão, à temperatura ambiente, durante 10 minutos (um tempo superior a este não teria aplicação prática). Em seguida, as fibras foram enxaguadas por 1 minuto sob água corrente e posteriormente com água deionizada<sup>3</sup>.

O diâmetro médio das partículas da emulsão foi medido por técnica de espectroscopia de correlação de fótons, utilizando o aparelho Brookhaven Instruments ZetaPlus. O valor obtido foi 248 nm. Este equipamento utiliza um laser de estado sólido e sistema Peltier para controle de temperatura. As determinações foram feitas em triplicatas a um ângulo fixo de 90°. As amostras foram acondicionadas em cubetas de acrílico a 25°C e usou-se um tempo de contagem de 3 minutos para cada medida.

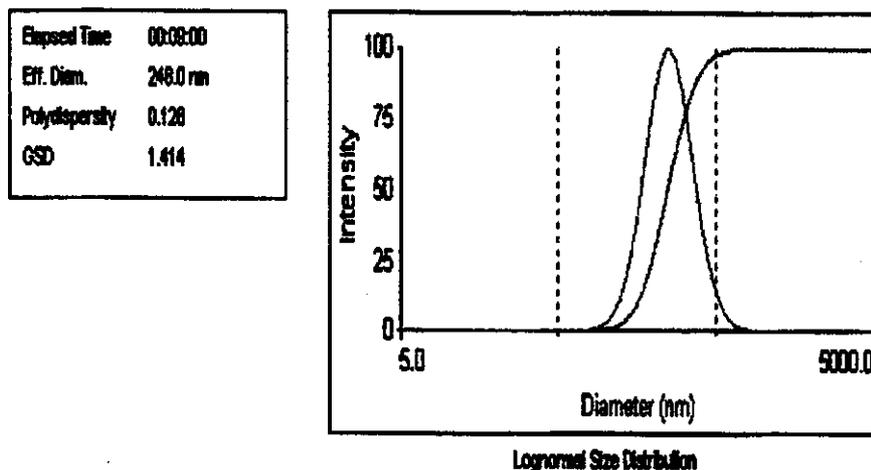


Figura 8: Medidas de tamanho médio de partículas da emulsão de ceramidas. Leituras feitas em triplicata.

### III.3.3 Tratamentos Oxidativos em Fibras Capilares

Na preparação da solução descolorante utilizou-se  $H_2O_2$  20 vol (6% m/v) como agente oxidante primário e adicionou-se hidróxido de amônio concentrado gota a gota até que a solução apresentasse pH 10-10,5. Em seguida foi adicionado persulfato de potássio, um agente oxidante secundário<sup>39,40</sup>, numa massa equivalente a 10% da massa de água oxigenada utilizada. Para cada grama de cabelo utilizaram-se 60mL de solução descolorante<sup>41</sup>. O tempo de descoloração foi de 30 minutos a 32°C. Após este tempo, a amostra foi enxaguada sob água corrente por 1 minuto e imersa em 2L de água deionizada por uma noite a fim de se extrair pigmentos e outras substâncias que se tornaram solúveis devido ao processo de descoloração. A ocorrência da reação de degradação da melanina (oxidação) requer condições drásticas, como altas temperaturas. Entretanto, por se tratar de cabelo, um material que precisa ser processado à temperatura ambiente, este fato foi compensado por um alto valor de pH para material biológico<sup>42</sup>.

Houve três tipos de amostras que passaram por este processamento: 1) *Oxi.antes*: aplicou-se a emulsão de ceramidas anteriormente à descoloração; 2) *Oxi.depois*: aplicou-se a emulsão de ceramidas posteriormente à descoloração; 3) *Oxi.controle*: não foi tratada com ceramidas.

### III.3.4 Tratamentos Fotooxidativos em Fibras Capilares

Os fios, com um comprimento de cerca de 10cm e sem se distinguir ponta e raiz, foram pendurados em suportes de madeira vazados utilizando-se tiras de fita dupla-face em ambas as extremidades<sup>43</sup>. Os suportes foram posicionados a uma distância que variava de 12 a 14cm da fonte de irradiação, dentro de uma caixa de madeira, no interior da capela com exaustão para liberar o  $O_3$  formado. Apenas uma das faces do suporte permanecia voltada para a fonte. A fonte de luz ultravioleta foi uma lâmpada de vapor de mercúrio da qual se retirou a camisa externa. O esquema do sistema montado encontra-se na figura 9. O espectro de emissão da fonte de irradiação utilizada está ilustrado na figura 10, sendo que emissão mais importante se encontra a 370nm.

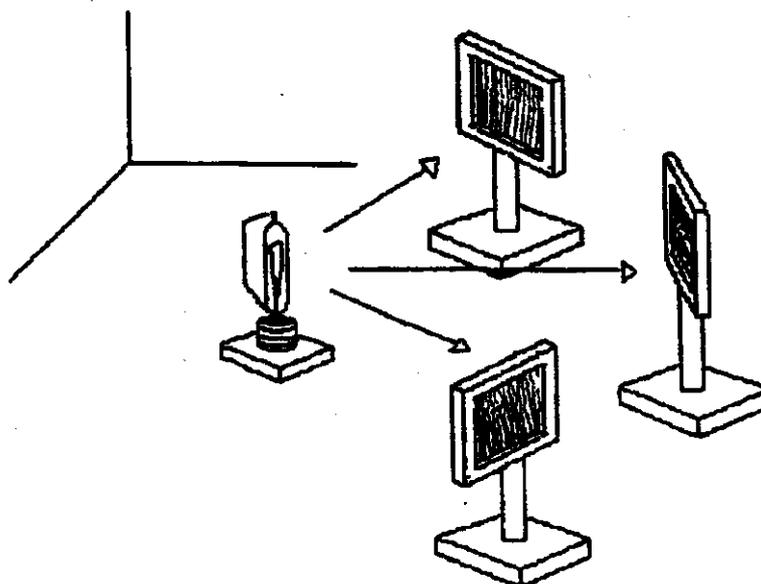


Figura 9: Esquema do sistema de fibras capilares expostas à radiação UV de uma lâmpada de mercúrio sem a camisa externa por 72 horas.

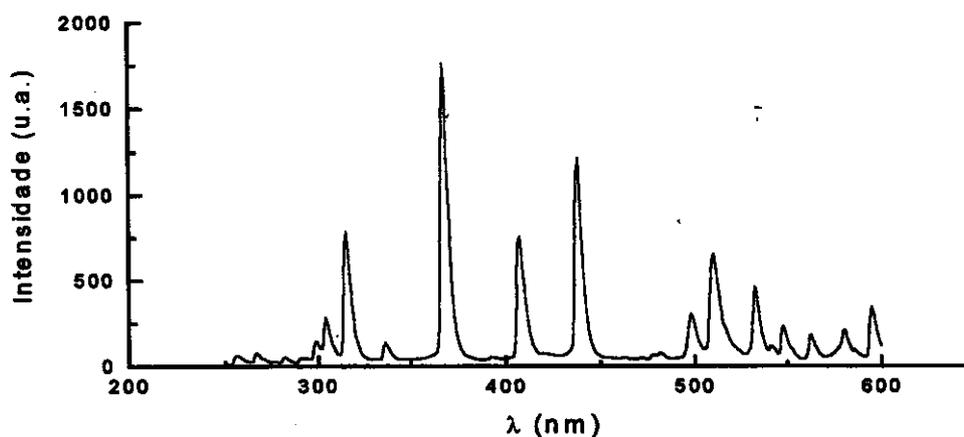


Figura10: Espectro de emissão da lâmpada de vapor de mercúrio Sylvania - 125W sem a camisa externa

O espectro de emissão foi obtido fazendo-se passar um feixe de radiação por uma fotomultiplicadora acoplada a um monocromador. Este procedimento foi feito com o auxílio de Sahori Yamaki.

As amostras foram irradiadas por 72 horas ininterruptas. A dificuldade de reprodução do experimento consistiu no fato de que havia fios sobrepostos e, por conseguinte, foram expostos a diferentes quantidades de radiação UV. O fato de que as amostras não foram giradas ao redor da lâmpada implicou em diferentes níveis de degradação de um e outro lado

da fibra. Não foi medida a temperatura do ambiente em que se encontravam as fibras (degradação térmica).

Houve três tipos de amostras que passaram por este processamento: 1) Fotoxi.antes: aplicou-se a emulsão de ceramidas anteriormente à fotooxidação; 2) Fotoxi.depois: aplicou-se a emulsão de ceramidas posteriormente à fotooxidação; 3) Fotoxi.controle: não foi tratada com ceramidas.

### III.3.5 Modelos de Calibração Multivariada

#### III.3.5.1 Analito Rodamina B

Foram preparadas soluções aquosas de rodamina B com as seguintes concentrações:

- |  |  |  |
|--|--|--|
| (1) $10,4 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ | (4) $5,22 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ | (7) $1,25 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ |
| (2) $8,35 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ | (5) $3,13 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ |  |
| (3) $6,26 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ | (6) $2,09 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ |  |

Destas amostras foram obtidos espectros de 190 a 1100nm, porém somente a faixa espectral de 190 a 610nm foi utilizada para a construção do modelo de calibração<sup>33,34,35,36</sup>.

Os dados foram centrados na média (procedimento mais correto para medidas espectrofotométricas), utilizaram-se 2 componentes principais e utilizou-se a rotina PLS<sup>32</sup>.

Para a validação<sup>35,36</sup> do modelo utilizaram-se as soluções (1), (3), (6), (7) e uma nova solução de concentração  $1,67 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$  (8).

Os erros de previsão para as amostras acima foram respectivamente -0,9%, 0,8%, -3,2%, -2,8% e 0,7%.

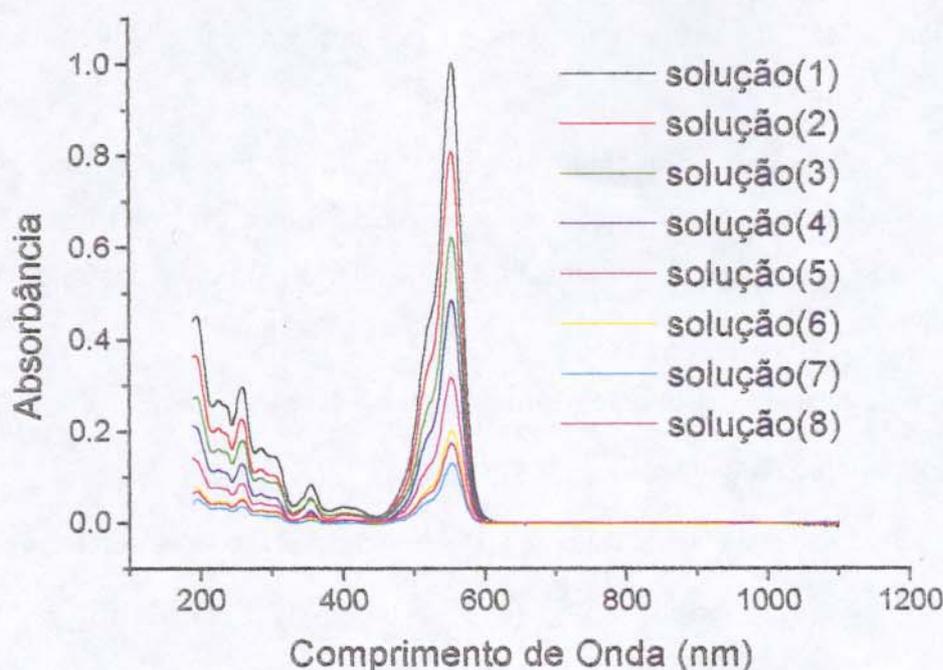


Figura 11: Espectros de UV-Vis das soluções de rodamina utilizadas na calibração e validação. Absorção máxima em 554nm.

### III.3.5.2 Analito Ácido Dânsico (DNS-OH)

Uma massa de 0,0087g de cloreto de dansila foi dissolvida em 1 mL de 1,4-dioxano. Adicionou-se 1,5mL de solução 0,1M de  $\text{NaHCO}_3$ . Manteve-se sob agitação a 37°C em um banho. Após 1 hora adicionou-se mais 1,5mL de solução 0,1M de  $\text{NaHCO}_3$ . Ao fim de 2 horas de reação, a hidrólise foi completa: a solução tornou-se incolor e sob luz solar apresentou uma leve coloração azul esverdeada correspondente à fluorescência do ácido sulfônico produzido.

A partir da solução-mãe de DNS-OH ( $8,20 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ), foram preparadas por diluição, algumas soluções de DNS-OH em água/dioxano (1:1) com as seguintes concentrações:

- (1)  $2,72 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  (4)  $1,36 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  (7)  $7,70 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$   
 (2)  $2,34 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  (5)  $1,06 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$   
 (3)  $1,65 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  (6)  $9,33 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$

Destas amostras foram obtidos espectros de 190 a 820 nm, porém somente a faixa espectral de 270 a 402 nm foi utilizada para a construção do modelo de calibração<sup>33,34,35,36</sup>.

Os dados foram centrados na média, utilizou-se 1 componente principal e a rotina utilizada foi PLS<sup>32</sup>.

Para a validação<sup>35,36</sup> da amostra utilizaram-se as soluções (2), (3), (4) e (5).

Os erros de previsão para as amostras acima foram respectivamente -2,2%; -0,55%; -0,41% e 0,36%.

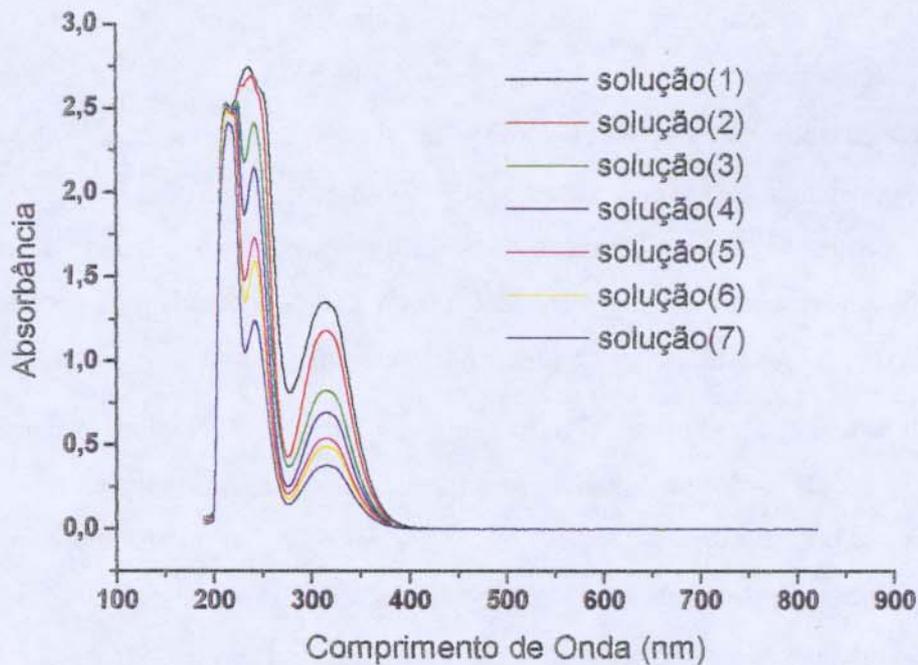


Figura 12: Espectros de UV-Vis das soluções de DNS-OH utilizadas na calibração e validação. Máximo de absorção característico do ácido em 314 nm.

### III.3.6 Determinação do Diâmetro dos Cabelos

Para cada amostra de cabelo estudada foram feitas medidas de diâmetro de 50 fios, a seco, com uso de um micrômetro. Destas 50 medidas obteve-se o valor médio do diâmetro<sup>43</sup>. Os valores obtidos foram estatisticamente indistinguíveis para todas as amostras. Como tratava-se de amostras provenientes de um mesmo couro cabeludo, supõe-se, sem utilizar argumentos estatísticos, que os tratamentos a que foram submetidas não alteraram seu diâmetro, cerca de 60 $\mu$ m.

### III.3.7 Determinação do Coeficiente de Difusão de Rodamina B nas Fibras Capilares por Medidas Espectrofotométricas

Uma massa de 0,1000g de fibras medindo  $5\pm 1$ cm foi colocada em um balão de fundo redondo de 10mL. Preparou-se então uma solução aquosa de rodamina com concentração de 0,0500 mg/L ( $1,04\times 10^{-4}$  mol.L<sup>-1</sup>) e pH 4,1.

O sistema montado para a realização do experimento está ilustrado na figura 13. Adicionaram-se 5mL de solução de rodamina às fibras. O balão contendo o cabelo permaneceu imerso em um banho termostatzado a  $50\pm 1^\circ\text{C}$ . Utilizando-se uma bomba peristáltica com vazão 0,13 L/h e tubos de viton®, amostras da solução do meio de difusão foram constantemente conduzidas do balão onde ocorria o fenômeno para a cubeta de fluxo de 0,1cm dentro do espectrofotômetro e desta novamente para o balão. Durante 3 horas foram obtidos automaticamente espectros UV-Vis da solução de rodamina do meio de difusão de 60 em 60 segundos, totalizando um total de 180 espectros.

Como após 3 horas a difusão ainda não havia sido completa, cada amostra de fibras foi deixada por 24 horas em solução de rodamina nas mesmas condições experimentais. Após 20 e 24 horas obtiveram-se espectros de UV-Vis das soluções que forneceram, segundo o modelo de calibração, um mesmo valor de concentração ( $C_\infty$ ) fundamental para o cálculo dos valores de quantidade de sorção máxima do soluto pelo cabelo ( $Q_\infty$ ).

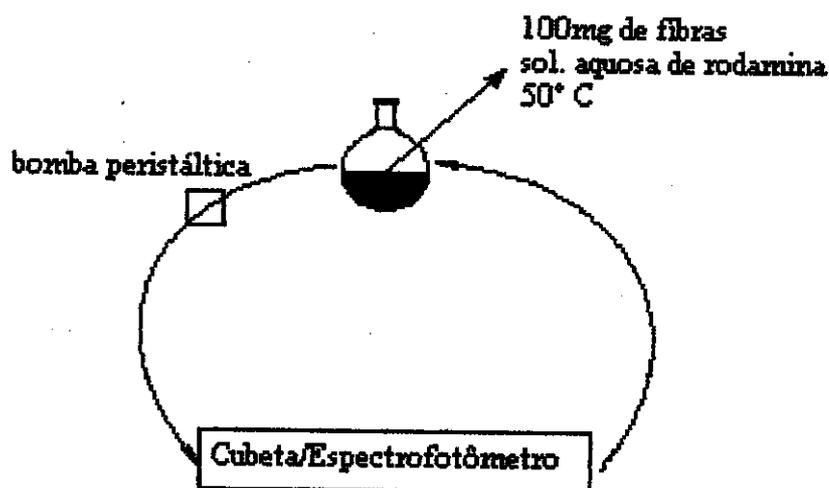


Figura 13: Esquema genérico do sistema montado para determinação do coeficiente aparente de difusão de rodamina B em fibras capilares por dados de espectrofotometria UV-Vis.

A equação-chave deste estudo, derivada da lei de Fick por Crank, descreve o processo de difusão de uma solução de volume limitado em um cilindro de comprimento infinito (equação 1)<sup>44</sup>.

$$\frac{Q_t}{Q_\infty} = 2 \left[ \frac{2}{\pi^{1/2}} \left( \frac{Dt}{r^2} \right)^{1/2} - \dots \right] \quad [1]$$

onde  $Q_t$  = quantidade (em moles) de soluto sorvido no tempo (t),  $Q_\infty$  = capacidade de sorção máxima do soluto pelo cabelo (em moles) e  $r$  = raio da fibra.

A tabela I apresenta os cálculos necessários para determinar  $Q_t$  e  $Q_\infty$ .

Tabela I: Cálculos para a determinação dos valores de  $Q_t$  e  $Q_\infty$  em cada cinética de difusão

Grandeza	Unidade	Eq. de obtenção
$Q_t$	mol	$(C_o - C_t) \times 5,00 \times 10^{-3} L$
$Q_\infty$	mol	$(C_o - C_\infty) \times 5,00 \times 10^{-3} L$

$C_o$  = concentração inicial da solução;  $C_t$  = concentração da solução no tempo t;  $C_\infty$  = concentração da solução após 20h (patamar);  $5,00 \times 10^{-3} L$  = volume da solução.

Os coeficientes aparentes de difusão de rodamina em um cilindro (cabelo) são calculados a partir da inclinação ( $\alpha$ ) da curva  $Q_t/Q_\infty \times \sqrt{t}$  conhecendo-se o raio das fibras (equação 2).

$$\alpha = \left[ \frac{4}{\pi^{1/2} r} \right] D^{1/2} \quad [2]$$

Com esta metodologia foram determinados coeficientes aparentes de difusão de rodamina na cutícula e no córtex, dividindo as curvas  $Q_t/Q_\infty$  em dois segmentos de reta.

### **III.3.8 Determinação do Coeficiente de Difusão de Rodamina B nas Fibras por Cálculo da Área Penetrada pelo Corante**

#### **III.3.8.1 Impregnação de Fibras com Solução Aquosa de Rodamina B**

Uma massa de 0,0200 g de fibras medindo  $3\pm 1$  cm foi colocada em um balão de fundo redondo de 10 mL. Preparou-se então uma solução aquosa de rodamina com concentração de 0,500 mg/mL ( $1,04\times 10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup>). Adicionaram-se 2 mL de solução de rodamina à amostra. O balão permaneceu imerso em um banho termostaticado a  $50\pm 1$  °C por 30 minutos. Finalmente as fibras foram enxaguadas com água deionizada e com diclorometano para remover corantes fracamente adsorvidos na superfície. Foram secas sob atmosfera de nitrogênio<sup>45</sup>.

#### **III.3.8.2 Obtenção de cortes ultrafinos**

As amostras foram levadas para o laboratório de microscopia eletrônica do Instituto de Física da USP e cortes transversais semifinos foram feitos por Carla Scanavez como segue.

O material foi cortado em um comprimento de cerca de 1 cm. Foi fixado em 1% de OsO<sub>4</sub> e diluído em tampão cacodilato pH 6,0 durante 2 horas após as quais foi lavado por 3 vezes com o tampão. O material foi desidratado em etanol com concentrações crescentes (50, 70, 80, 95 e 100%) por 2 horas. Foram 3 trocas de etanol absoluto por 15 minutos cada. Fez-se uma lavagem em etanol absoluto/óxido de propileno (1:1) por 5 minutos e em seguida em óxido de propileno puro por 5 minutos. O material foi infiltrado em mistura de óxido de propileno e resina Spurr (1:1) durante 1 noite à temperatura de 25 °C. Em seguida foi passado por uma troca somente com resina Spurr durante 1 hora a 25 °C<sup>46</sup>.

Os fios foram transferidos para os moldes de inclusão e levados à estufa durante 24 horas a 70 °C para polimerização completa. Os blocos foram cortados no ultramicrotomo com navalhas de vidro numa espessura de cerca de 300 nm. Os cortes foram recolhidos em lâminas de vidro.

#### **III.3.8.3 Observação no Microscópio Ótico de Fluorescência**

Os cortes sobre a lâmina de vidro foram observados e fotografados pelo microscópio ótico de fluorescência. Utilizou-se luz incidente proveniente de uma lâmpada de mercúrio e um filtro que eliminava comprimentos de onda inferiores a 276 nm. Foi feita previamente uma calibração utilizando uma regra graduada para definir o aumento fornecido pelo aparelho.

Empregou-se uma objetiva com aumento de 50 vezes, obtendo-se assim, em conjunto com a ocular, um aumento total de 315 vezes no negativo. Para uma imagem melhor definida, utilizou-se filme preto e branco e com baixo valor de asa. A ampliação dos negativos para os positivos foi de 4,2 vezes.

Cortes de fios imersos em solução de rodamina por 24 horas foram examinados no microscópio e observou-se que o corante havia penetrado em toda a seção transversal do fio, inclusive na medula.

#### **III.3.8.4 Determinação da Área de Penetração de Rodamina nos Fios Utilizando o Software Image-Pro Plus™**

A determinação da área de penetração de rodamina fornece resultados mais precisos quando se utiliza um software específico para esta finalidade do que por medidas fotodensitométricas clássicas, onde são necessárias amostras imersas na solução do corante a vários intervalos de tempo para uma só determinação, além de alguns tratamentos matemáticos que ainda teriam que ser investigados.

As micrografias dos cortes das fibras O-controle imersas em rodamina apresentavam uma ampliação de 1320 vezes com relação às dimensões reais dos mesmos. Utilizando-se o software Image-Pro Plus™ ajustaram-se fatores como contraste e limiar de resposta (*threshold*). O contraste da imagem da seção transversal do corte foi maximizado fazendo com que a porção mais escura da imagem se tornasse preta e a porção mais clara se tornasse branca. O limiar de resposta é um valor usado para separar a cor cinza em dois valores. Valores de cinza inferiores ao limiar são tomados como zero e valores de cinza maiores ou iguais a este são tomados como 255. A imagem do corte passa, deste modo, a conter apenas as cores branca e preta, sendo que toda a área branca corresponde à área de penetração do corante. Variando-se os valores do limiar de resposta para tornar mais preciso o cálculo da área, foram calculados, para cada corte, três valores de área dos quais foi obtida uma média. Tais valores de área foram divididos por  $1320^2$  para fornecer a área real de penetração do corante nos fios. Dividindo-se estes novos valores pelo intervalo de tempo durante o qual o cabelo ficou imerso na solução de corante (1800s) obtiveram-se os coeficientes de difusão de rodamina nas fibras oxidadas.

### III.3.9 Avaliação Quantitativa de Danos em Fibras Utilizando Marcador de Aminoácidos

#### III.3.9.1 Reação de Dansilação

Para dansilar, 25mg de fibras com cerca de 5cm foram colocadas em um erlenmeyer contendo 1mL de solução 0,1M de  $\text{NaHCO}_3$ . Adicionou-se em seguida 1mL de solução (10mg/mL -  $1,86 \times 10^{-2} \text{mol.L}^{-1}$ ) de cloreto de dansila em 1,4-dioxano (solvente que não absorve na região do ultravioleta). O conteúdo do erlenmeyer foi bem misturado, vedado com rolha e incubado no escuro a  $37^\circ\text{C}$ , em repouso, por 6 horas<sup>23</sup>. A mistura reacional apresentava pH 9,5, segundo análise visual de papel universal indicador de pH.

#### III.3.9.2 Análise da Concentração de DNS-OH ao Fim da Reação de Dansilação

Ao fim da reação de marcação dos aminoácidos do cabelo, havia no meio reacional as fibras dansiladas e uma solução de ácido dânsico (DNS-OH) referente ao excesso de reagente que foi hidrolisado. Retirou-se, de cada amostra, uma alíquota de 500 $\mu\text{L}$  desta solução e diluiu-se com 5mL de solvente água/dioxano (1:1). Obtiveram-se espectros UV-Vis. As amostras foram enxaguadas com acetona, observadas em uma câmara de UV e estocadas no escuro.

Conhecendo-se a concentração inicial de DNS-Cl e a concentração final de DNS-OH, o qual é decorrente do excesso de reagente, estabeleceu-se a relação descrita na equação 3.

$$n_0(\text{DNS-Cl}) = n(\text{DNS-fibra}) + n_f(\text{DNS-OH}) \quad [3]$$

$n_0(\text{DNS-Cl})$ : nº de moles iniciais de DNS-Cl

$n(\text{DNS-fibra})$ : nº de moles de reagente que se liga às fibras

$n_f(\text{DNS-OH})$ : nº de moles finais de DNS-OH

#### III.3.10 Tratamentos Abrasivos em Fibras Padrão

Mechas de cabelo padrão extraído com  $\text{Et}_2\text{O}$  com uma massa inicial de 1,000 grama sofreram 10 ciclos sucessivos de tratamentos abrasivos. Cada ciclo apresentou a seguinte seqüência no caso do controle<sup>47</sup>:

- 1) As fibras foram molhadas sob água corrente;
- 2) Aplicou-se uma solução aquosa de LSS 10% (m/m). Para 1g de cabelo foi utilizado 0,5 mL de solução;

- 3) Esfregou-se o cabelo entre os dedos por 1 minuto fazendo gerar espuma;
- 4) As fibras foram enxaguadas sob água corrente por 1 minuto;
- 5) As fibras foram penteadas por 100 vezes com pente de polietileno;
- 6) Enxáguou-se o cabelo com H<sub>2</sub>O deionizada;
- 7) As fibras foram secas utilizando toalha felpuda e ao ar livre;
- 8) Quando seco o cabelo foi novamente penteado por 100 vezes.

Para as fibras tratadas com ceramidas, a imersão destas na emulsão era realizada ao final da etapa nº 6, após enxágue com H<sub>2</sub>O deionizada, segundo a descrição no tópico III.3.2. Ao final do enxague, prosseguia-se na etapa nº 7. A emulsão era aplicada em todos os 10 ciclos abrasivos.

Tanto para as mechas controle como para aquelas tratadas com ceramidas, a cada dois ciclos, ou seja, nos ciclos nº 2, 4, 6, 8 e 10, foram retirados 150 mg de fibras para a realização dos ensaios de coesão cuticular, que serão descritos no tópico III.3.11.

OBS.: A amostra descrita como Abr.depois, utilizada para ensaios de determinação de coeficiente aparente de difusão de rodamina B no cabelo, corresponde a uma amostra submetida as 10 ciclos abrasivos, mas cuja aplicação de ceramidas somente foi feita ao final do último ciclo.

### **III.3.11 Ensaios de Coesão Cuticular das Fibras Abrasadas**

#### **III.3.11.1 Determinação de Proteína pelo Método de Lowry**

##### **III.3.11.1.1 Reagentes Utilizados**

- ❖ Reagente cobre-tartarato-carbonato (CTC): solução 0,1% (m/v) CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 0,2% (m/v) tartarato de sódio e potássio, 10% (m/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. O Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> foi dissolvido em cerca de metade do volume final da solução e adicionado lentamente à solução de sulfato de cobre – tartarato (também dissolvidos em metade do volume final) mantendo-se agitação. Este reagente se mantém estável por um longo período a ~10°C, porém temperaturas próximas de 0°C ocasionam cristalização do carbonato.
- ❖ Solução de lauril sulfato de sódio (LSS) 5% (m/v);
- ❖ Solução de NaOH 0,8M;

❖ Reagente de Folin Ciocalteu 2N (pag. 8).

Misturando-se 1 parte de CTC com 2 partes de LSS 5% e 1 parte de NaOH 0,8M obteve-se o Reagente A, que se mantém estável por 2 a 3 semanas à temperatura ambiente. A diluição de 1 parte do reagente Folin Ciocalteu 2N com 5 partes de água destilada forneceu o Reagente B, o qual é estável durante vários meses à temperatura ambiente e quando armazenado em um frasco fosco<sup>29</sup>.

### III.3.11.1.2 Construção da Curva de Calibração

Para que pudessem ser determinadas as quantidades de proteína liberada pelas fibras abrasadas (tratadas e não tratadas com ceramidas) no ultra-som, foi necessária a construção de uma curva de calibração com soluções padrão de albumina de soro bovino (ASB) em meio aquoso. Fez-se uma solução-mãe com concentração de 1,00 mg/mL e a partir de diluições desta fizeram-se as demais com as seguintes concentrações: 10 µg/mL, 15 µg/mL, 20 µg/mL, 25 µg/mL, 30 µg/mL, 40 µg/mL, 50 µg/mL, 60 µg/mL.

Para cada padrão retirou-se uma alíquota de 0,400 mL, a qual foi colocada em um tubo de ensaio. Adicionou-se então 0,400 mL do Reagente A e deixou-se em repouso à temperatura ambiente por 10 minutos. Decorrido este tempo adicionou-se 0,200 mL do reagente B, o qual foi imediatamente misturado para evitar ao máximo a sua decomposição em meio básico. Após 30 minutos obteve-se um espectro UV-Vis, onde o comprimento de onda de interesse era 750 nm, o qual corresponde à forma reduzida do ácido misto de que é composto o reagente de Folin Ciocalteu, sendo a proteína seu agente redutor<sup>29</sup>. As medidas foram feitas em triplicatas.

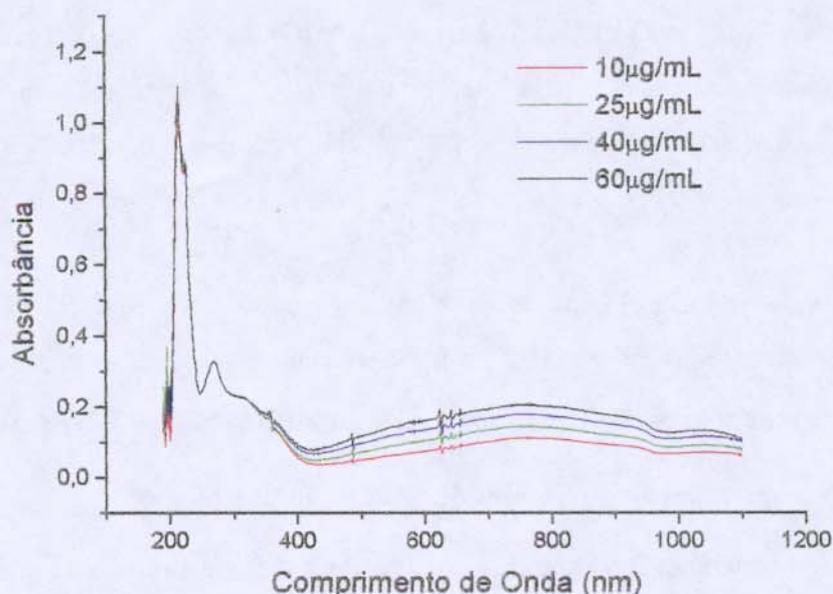


Figura 14: Alguns espectros das misturas dos tubos de ensaio contendo ASB após o tempo de incubação.

Com os valores de absorbância em 750 nm para cada solução padrão, pôde-se construir a curva de calibração, que se encontra na figura 15.

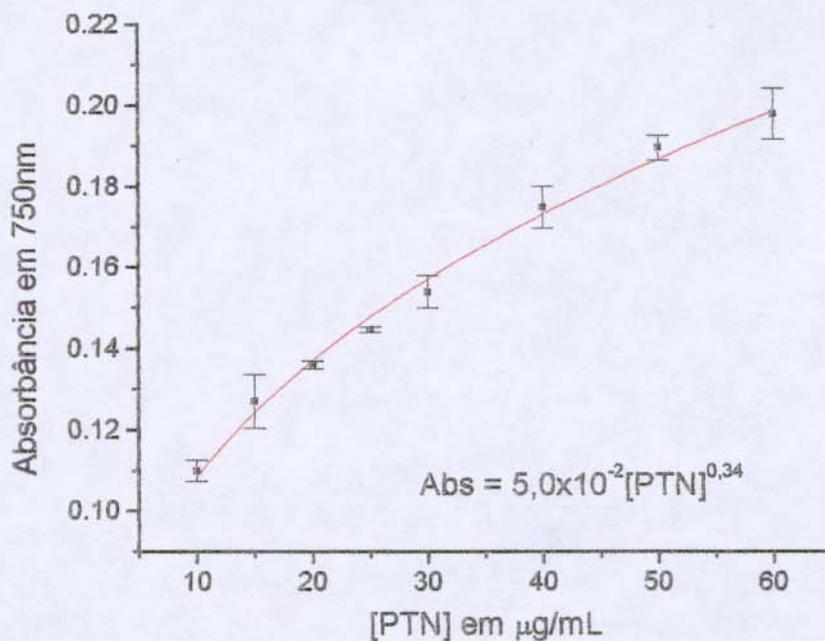


Figura 15: Valores de absorbância em 750nm das soluções padrão em função de suas concentrações. A equação corresponde à curva de ajuste dos pontos. [PTN] = concentração de proteína.

Observa-se do gráfico da figura que a curva de calibração não apresenta uma relação linear, tal como afirmado pela literatura<sup>27,28,29,30,48,49</sup>. A relação que melhor descreve o conjunto de dados obtidos é uma função conhecida como alométrica, da seguinte forma:

$$Y = aX^b \quad [4],$$

onde  $Y$  = absorbância em 750nm,  $X$  = concentração de proteína [PTN],  $a$  e  $b$  são constantes com valores respectivos de  $5 \times 10^{-2}$  e 0,34. Portanto, pode-se determinar a concentração de proteína de uma solução desconhecida pela seguinte relação:  $[PTN] = (Abs/5 \times 10^{-2})^{1/0,34}$

### III.3.11.2 Determinação do Tempo de Sonicação das Fibras

A um erlenmeyer contendo 150 mg de cabelo padrão extraído com  $Et_2O$  (~5cm de comprimento), adicionou-se 1,5mL de  $H_2O$  destilada. A amostra foi submetida ao ultra-som por 60 minutos, sendo que após 20, 30, 40 e 60 minutos foram retiradas alíquotas do sobrenadante a fim de estabelecer o tempo necessário para a liberação máxima de proteína. Para isto utilizou-se o método de determinação de proteína já descrito.

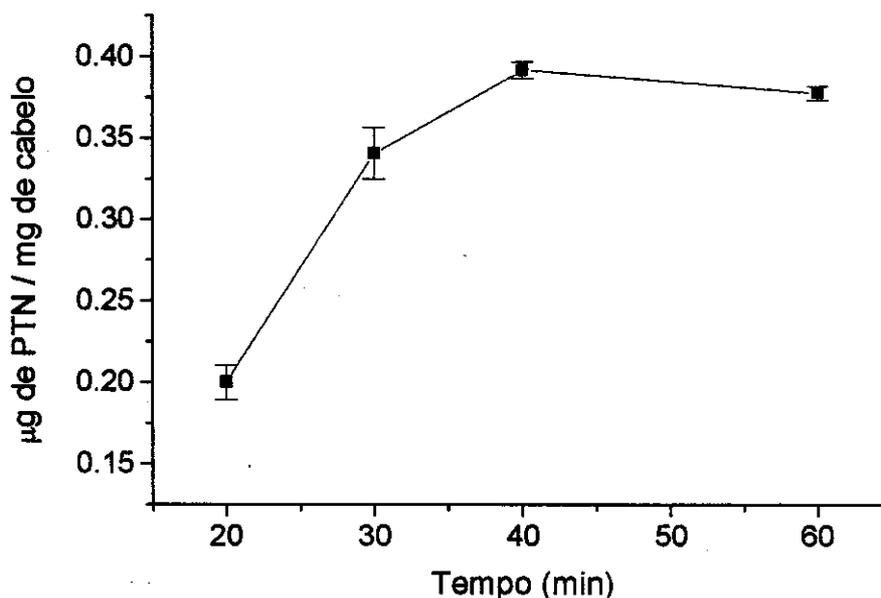


Figura 16: Massa de proteína liberada por massa de cabelo em função do tempo de permanência no ultra-som. Experimento único. Os desvios correspondem a triplicatas de medida de uma mesma alíquota.

De acordo com a figura 16, a quantidade de proteína liberada pelo cabelo aumenta ao longo do tempo. Após 40 minutos de ultra-som há a liberação máxima de proteína pelas fibras. Nota-se que há um ligeiro aumento da temperatura da água do aparelho. Ficou assim

estipulado que este seria o intervalo de tempo a ser utilizado em todos os ensaios de coesão cuticular.

### **III.3.11.3 Sonicação das Fibras**

Em um erlenmeyer de 10mL foram colocados 150mg de fibras abrasadas. Em seguida adicionou-se 1,2mL de água destilada. O erlenmeyer foi então colocado dentro do aparelho de ultra-som que permaneceu ligado por 40 minutos ininterruptos. Decorrido este tempo, o sobrenadante, que se mostrava turvo e continha uma suspensão muito fina de material cuticular<sup>50</sup>, foi recolhido e colocado em tubo de ensaio para centrifugação por 15 minutos. A velocidade de centrifugação foi de 4000 rpm.

### **III.3.11.4 Determinação de Proteína nos Sobrenadantes**

De cada tubo de ensaio submetido à centrifugação retiraram-se, em triplicata, alíquotas de 0,2 mL que foram colocadas em tubos de ensaio. Adicionou-se 0,2 mL do Reagente A e deixou-se em repouso à temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 0,1mL do Reagente B, o qual foi rapidamente misturado. A amostra permaneceu em repouso por 30 minutos ao final dos quais obteve-se um espectro de UV-Vis<sup>29</sup>.

### **III.3.12 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

As amostras de cabelo foram coladas em suporte específico para MEV utilizando fita adesiva de cobre. Os fios foram fixados na posição horizontal com auxílio de pinças, sem qualquer contato com a região a ser observada. As amostras foram recobertas com um filme de ouro (~4Å) pelo processo de pulverização anódica (*sputtering*) em um aparelho Edwards 150S. Foram utilizados recursos de inclinação do porta amostra. Todo este procedimento foi realizado por Maria Alice Martins e Flávia Cassiola.

### **III.3.13 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)**

Após a obtenção de cortes ultrafinos como descrito no item III.3.9.2, porém com espessura de cerca de 150 nm, os cortes foram recolhidos em uma tela de cobre (malha de 200 mesh) e submetidos a uma pós-coloração com uma solução aquosa de acetato de uranila 2% (m/v) por 15 minutos. Em seguida foram enxaguados com água destilada. Os cortes sofreram tratamento com uma solução aquosa de citrato de chumbo 1% (m/v) por 8 minutos, seguido de enxágüe com água destilada. Foram secos à temperatura ambiente. Todo este procedimento foi realizado por Carla Scanavez.

## IV. RESULTADOS

### IV. 1 Determinação do Coeficiente de Difusão Aparente ( $D_{apar}$ ) de Rodamina B nas Fibras Capilares por Medidas Espectrofotométricas

Estas determinações foram feitas com o objetivo de verificar a eficiência da função de barreira das camadas cuticulares nas amostras de cabelo estudadas, tratadas e não tratadas com ceramidas.

#### IV.1.1 Determinação dos Valores de Concentração Após 24 horas ( $C_{\infty}$ )

Pretendia-se com estes experimentos obter os valores finais de concentração da solução aquosa de rodamina B após 24 horas de imersão das fibras, pois são estes valores que permitem o cálculo da quantidade de sorção máxima do soluto pelo cabelo ( $Q_{\infty}$ ). Seguem na tabela os valores de  $C_{\infty}$  para todas as amostras.

Tabela II: Valores de concentração da solução de rodamina após 24h de imersão das fibras. Massa de cabelo de 0,1000g em 5mL de solução de rodamina com concentração inicial de  $1,04 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ . Sistema mantido a  $50 \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Experimentos únicos.

Tipo de Fibra	$C_{\infty}$ ( $10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ )
Padrão*	3,78
Padrão extraído**	3,14
Oxi.controle	2,71
Oxi.antes	3,30
Oxi.depois	3,18
Fotoxi.controle	3,84
Fotoxi.antes	3,92
Fotoxi.depois	4,37
Abr.controle	3,49
Abr.depois	3,82

\* Cabelo padrão como recebido

\*\* Cabelo padrão extraído com  $\text{Et}_2\text{O}$

A tabela II mostra que ao se atingir o patamar do fenômeno de difusão ( $C_{\infty}$ ), as concentrações dos meios reacionais decaíram cerca de 58 a 74% do valor inicial de concentração ( $C_0$ ).

#### IV.1.2 Imersão de Amostras de Cabelo em Solução de Rodamina por Três Horas

Estes experimentos visavam acompanhar a difusão de rodamina no cabelo para posterior determinação do coeficiente aparente de difusão ( $D_{apar}$ ).

A figura 17 apresenta alguns espectros obtidos durante o acompanhamento da cinética de difusão do corante na amostra Oxi.controle.

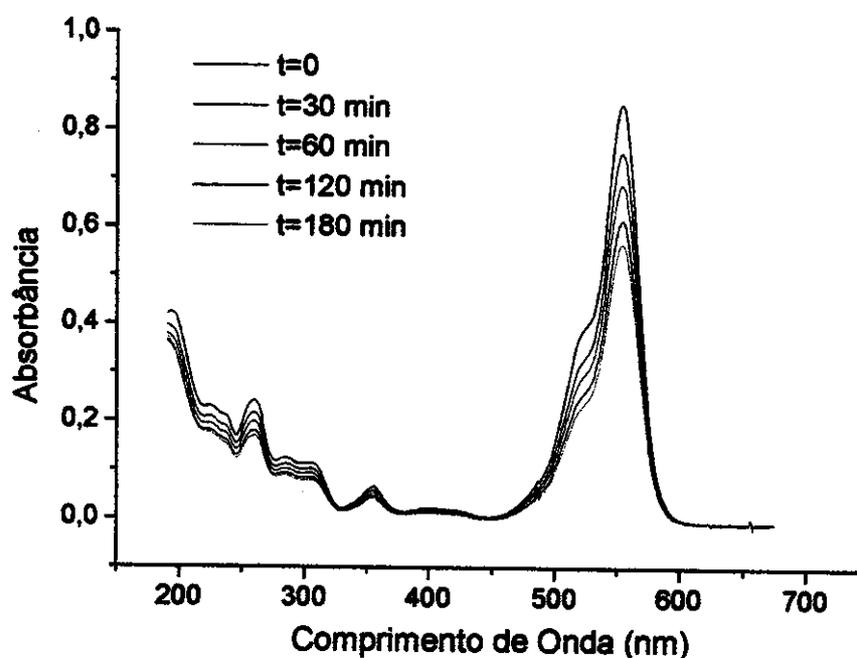


Figura 17: Exemplos de espectros da solução de rodamina contendo amostra Oxi.controle. Massa de cabelo de 0,1000g em 5mL de solução de rodamina com concentração inicial de  $1,04 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ . Sistema mantido a  $50 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Observa-se um decaimento da intensidade de absorbância em função do tempo. Em todas as cinéticas de difusão de rodamina nas amostras estudadas obtiveram-se espectros semelhantes. Os espectros de rodamina se apresentaram tal qual o esperado<sup>51</sup>, sem quaisquer eventuais substâncias interferentes provenientes do cabelo.

#### IV.1.3 Determinação da Quantidade de Rodamina Penetrada nas Fibras

Utilizando o modelo de calibração multivariada descrito no item III.3.6.1, para cada espectro obtido calculou-se uma concentração para a solução de rodamina. A figura 18 mostra estes valores de concentração em relação ao tempo.

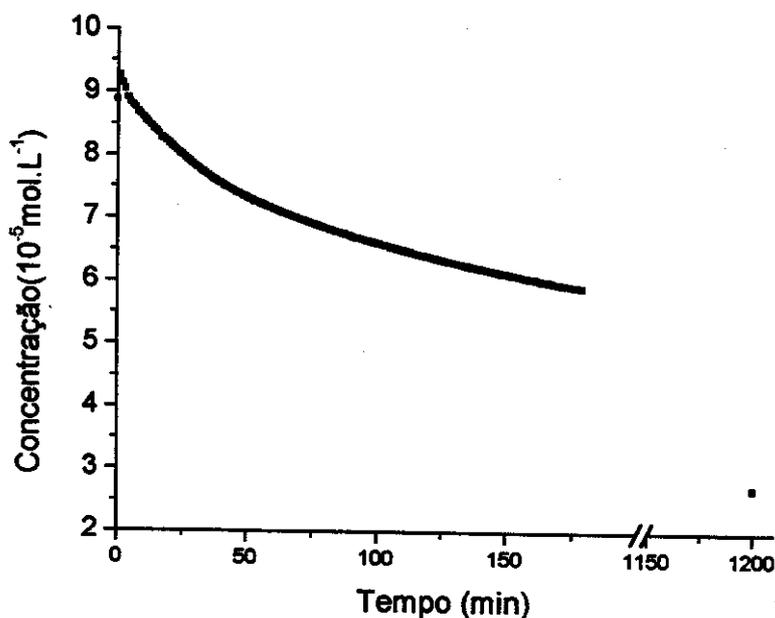


Figura 18: Exemplo de curva de concentração de rodamina vs tempo da amostra Oxi.controle. Massa de cabelo de 0,1000g em 5mL de solução de rodamina com concentração inicial de  $1,04 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ . Sistema mantido a  $50 \pm 1^\circ \text{C}$ .

Observa-se que a concentração da solução de rodamina B decai com o passar do tempo, indicando sua interação com a fibra. Para cada uma das oito amostras estudadas há três gráficos semelhantes ao da figura 18 (experimentos em triplicata).

A figura 19 mostra os valores da razão  $Q_t/Q_\infty$  (vide tabela I) em função de  $t^{1/2}$  para a cinética de difusão do corante na amostra Oxi.controle, incluindo o ponto de 24 horas de difusão, quando já se atinge um patamar.

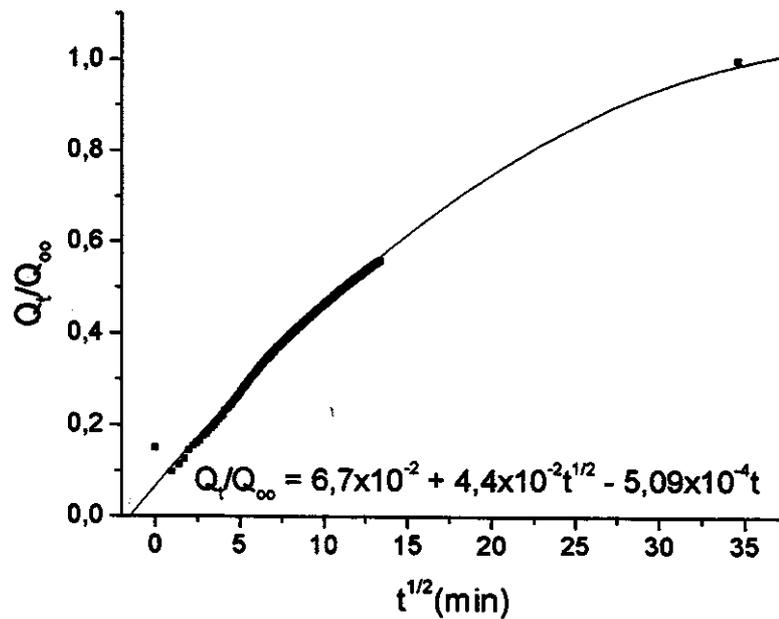


Figura 19: Exemplo de curva da razão entre quantidade de soluto sorvido ao longo do tempo e quantidade máxima de soluto sorvido ( $Q_t/Q_\infty$ ) em função da raiz quadrada do tempo para a amostra Oxi.controle. Massa de cabelo de 0,1000g em 5mL de solução de rodamina com concentração inicial de  $1,04 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ . Sistema mantido a  $50 \pm 1^\circ\text{C}$ .

A partir da figura 19 verifica-se que o valor da razão  $Q_t/Q_\infty$  aumenta com o passar do tempo, ou seja, o valor de  $Q_t$  se aproxima do valor de  $Q_\infty$ .

#### IV.1.4 Separação da Curva da Razão entre Quantidade de Solute Sorvido ao Longo do Tempo e Quantidade Máxima de Solute Sorvido ( $Q_t/Q_\infty$ ) em Função da Raiz Quadrada do Tempo em Dois Segmentos de Reta

Como a difusão ocorre em duas regiões química e morfológicamente distintas, esperava-se obter uma curva com dois perfis diferentes, atribuídos primeiramente à difusão na cutícula e posteriormente no córtex. O objetivo deste procedimento foi, portanto, obter valores de  $D_{\text{apar}}$  na cutícula e  $D_{\text{apar}}$  no córtex.

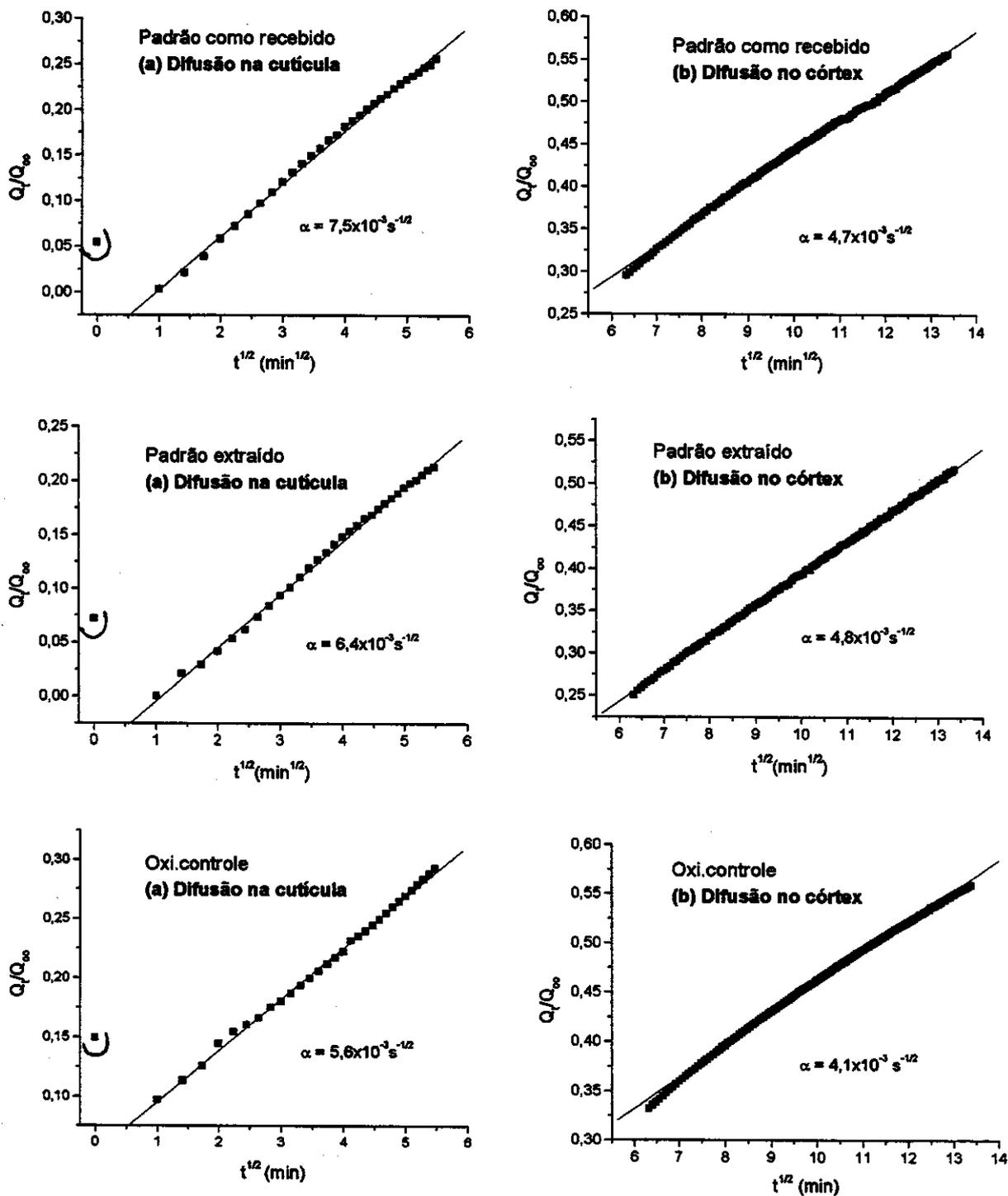


Figura 20: Exemplos de curvas da razão entre quantidade de soluto sorvido no tempo  $t$  por quantidade máxima de soluto sorvido ( $Q_t/Q_\infty$ ) em função da raiz quadrada do tempo relativas à difusão de rodamina na cutícula (a) e no córtex (b). Massa de cabelo de 0,1000g em 5mL de solução de rodamina com concentração inicial de  $1,04 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ . Sistema mantido a  $50 \pm 1^\circ\text{C}$ .

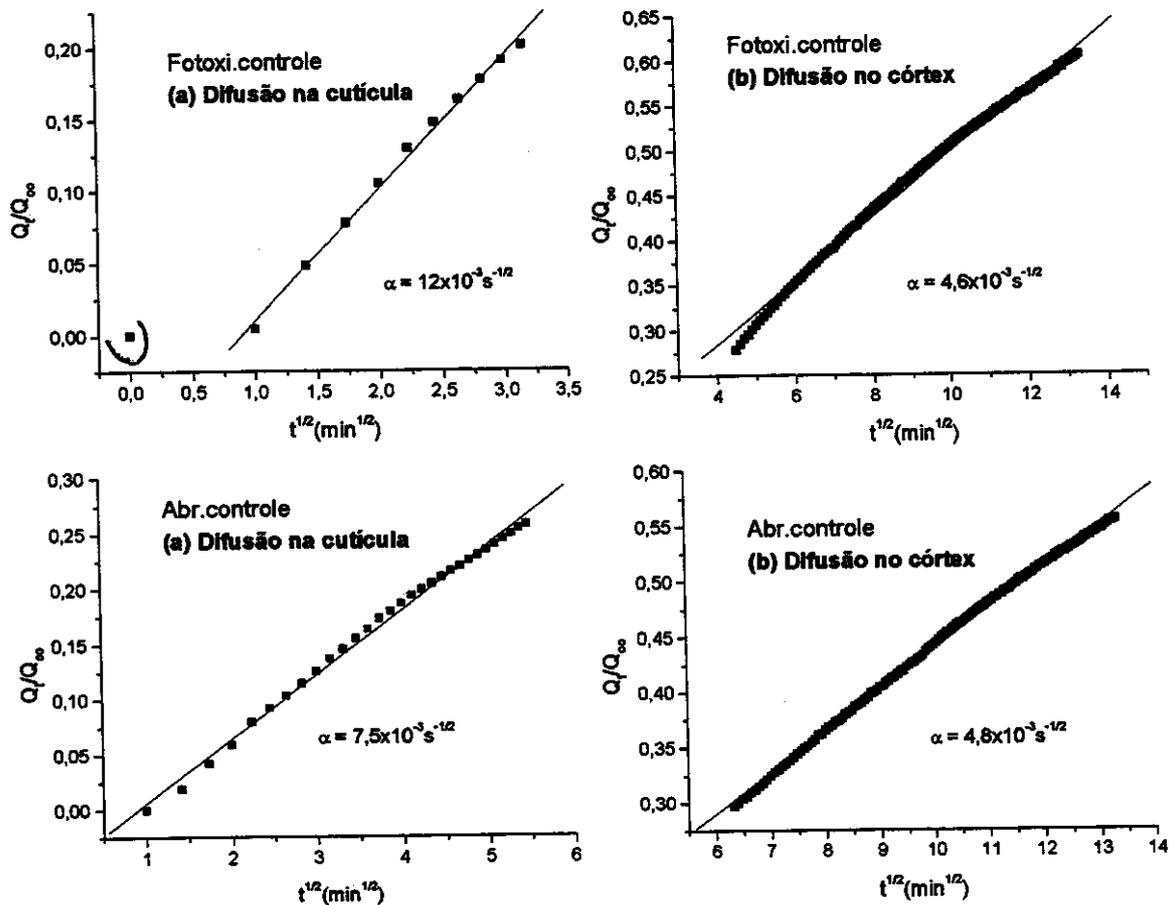


Figura 21: Outros exemplos de curvas da razão entre quantidade de soluto sorvido no tempo  $t$  por quantidade máxima de soluto sorvido ( $Q_t/Q_\infty$ ) em função da raiz quadrada do tempo relativas à difusão de rodamina na cutícula (a) e no córtex (b). Massa de cabelo de 0,1000g em 5mL de solução de rodamina com concentração inicial de  $1,04 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ . Sistema mantido a  $50 \pm 1^\circ \text{C}$ .

O fim da difusão na cutícula e início da difusão no córtex foram determinados arbitrariamente, ou seja, por uma observação visual da curva, dividindo-a em regiões que fornecessem dados os mais lineares possíveis, ou seja, coeficientes de correlação mais próximos de 1.

Observa-se dos gráficos das figuras 20 e 21 que os segmentos de reta relativos à difusão na cutícula apresentam um valor de inclinação ( $\alpha$ ) maior do que aquele referente ao córtex. A tabela III apresenta os valores de  $\alpha$  médio para todas as amostras.

Tabela III: Valores de coeficiente angular dos segmentos de reta da razão entre quantidade de soluto sorvido no tempo  $t$  por quantidade máxima de soluto sorvido ( $Q/Q_{\infty}$ ) em função da raiz quadrada do tempo relativos às difusões na cutícula e córtex. Massa de cabelo de 0,1000g em 5mL de solução de rodamina com concentração inicial de  $1,04 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ . Sistema mantido a  $50 \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Experimentos em triplicata.

Amostra	$\alpha$ cutíc( $10^{-3} \text{ s}^{-1/2}$ )	$t_1$ (min)*	$\alpha$ córtex( $10^{-3} \text{ s}^{-1/2}$ )	$t_2$ (min)**	Raio ( $\mu\text{m}$ )
Padrão	$6,9 \pm 0,5$	30	$5,0 \pm 0,6$	40	$31 \pm 4$
Padrão extr.	$7,0 \pm 0,6$	30	$4,9 \pm 0,4$	40	$32 \pm 5$
Oxi. controle	$6,2 \pm 0,8$	30	$4,3 \pm 0,2$	40	$33 \pm 6$
Oxi. antes	$7,2 \pm 0,7$	30	$4,7 \pm 0,3$	40	$30 \pm 4$
Oxi. depois	$7,0 \pm 1,5$	30	$4,6 \pm 0,2$	40	$30 \pm 4$
Fotoxi. controle	$11,0 \pm 1,9$	10	$4,2 \pm 0,4$	20	$30 \pm 4$
Fotoxi. antes	$10,9 \pm 1,6$	10	$4,0 \pm 0,3$	20	$30 \pm 2$
Fotoxi. depois	$11,1 \pm 1,1$	10	$4,2 \pm 0,4$	20	$31 \pm 4$
Abr. controle	$6,5 \pm 1,0$	30	$4,3 \pm 0,4$	40	$32 \pm 4$
Abr. depois	$6,9 \pm 1,0$	30	$4,8 \pm 0,1$	40	$31 \pm 5$

\*  $t_1$ =fim da difusão na cutícula

\*\* $t_2$ =início da difusão no córtex

Embora nas amostras fotooxidadas seja bastante provável que não haja mais cutícula, porém talvez uma membrana, ou aminoácidos degradados, ou até mesmo uma região de córtex degradado, mantivemos na tabela III a designação de "cutícula" a região penetrada pela rodamina ao final de 10 minutos de imersão.

A tabela IV apresenta todos os valores de coeficiente aparente de difusão ( $D_{\text{apar}}$ ) obtidos segundo a equação 2.

Tabela IV: Valores de coeficiente aparente de difusão de rodamina na cutícula e córtex. Massa de cabelo de 0,1000g em 5mL de solução de rodamina com concentração inicial de  $1,04 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ . Sistema mantido a  $50 \pm 1^\circ\text{C}$ . Experimentos em triplicata.

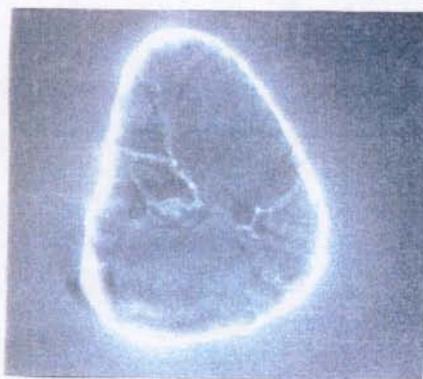
Amostra	$D_{\text{apar}} \text{ cutic.}$ ( $10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$ )	$D_{\text{apar}} \text{ córtex.}$ ( $10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$ )
Padrão	$0,90 \pm 0,13$	$0,48 \pm 0,11$
Padrão extr.	$0,98 \pm 0,16$	$0,49 \pm 0,07$
Oxi.controle	$0,82 \pm 0,22$	$0,41 \pm 0,05$
Oxi.antes	$0,93 \pm 0,18$	$0,40 \pm 0,05$
Oxi.depois	$1,0 \pm 0,4$	$0,42 \pm 0,03$
Fotoxi.controle	$2,2 \pm 0,7$	$0,31 \pm 0,06$
Fotoxi.antes	$2,0 \pm 0,8$	$0,29 \pm 0,05$
Fotoxi.depois	$2,4 \pm 0,5$	$0,33 \pm 0,06$
Abr.controle	$0,87 \pm 0,25$	$0,38 \pm 0,07$
Abr.depois	$0,91 \pm 0,26$	$0,43 \pm 0,01$

Observa-se da tabela IV que, para uma mesma amostra, os valores médios de coeficiente aparente de difusão são diferentes para cutícula e córtex. Para o primeiro eles são maiores e para a segunda são menores. As amostras fotooxidadas são as que apresentam maiores valores de  $D_{\text{apar}}$  na cutícula.

#### IV.2 Determinação do Coeficiente de Difusão de Rodamina B nas Fibras Capilares por Cálculo da Área de Penetração do Corante

Esta determinação foi feita com o objetivo de verificar se a partir de uma escala micro e por análise direta sobre a fibra, obteriam-se valores de coeficiente de difusão de rodamina nas fibras próximos àqueles obtidos no item IV.1.3.

Seguem na figura 22 cortes transversais de diferentes fios Oxi-controle impregnados com rodamina. Foi excluída a possibilidade de se ter a presença de multicamadas do corante, uma vez que os cortes foram lavados e enxaguados várias vezes.



corte a



corte b



corte c



corte d



corte e

Figura 22: Micrografias ópticas de fluorescência de diferentes cortes transversais da amostra Oxi.controle. Aumento de 1190x. Massa de cabelo de 0,0200g em 2mL de solução de rodamina com concentração inicial de  $1,04 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ . Sistema mantido a  $50 \pm 1^\circ \text{C}$  por 30 minutos.

Os cortes da figura 22 mostram sombreados brancos que correspondem à fluorescência emitida pela rodamina impregnada nas fibras e, portanto, às áreas de penetração de corante. Após 30 minutos o corante penetrou apenas na área mais externa da seção transversal dos fios Oxi.controle.

A tabela V apresenta os valores de áreas penetradas e de coeficientes de difusão obtidos dividindo-se os valores de área por 1800s.

Tabela V: Valores de coeficiente de difusão de rodamina B em fios Oxi.controle. Massa de cabelo de 0,0200g em 2mL de solução de rodamina com concentração inicial de  $1,04 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ . Sistema mantido a  $50 \pm 1^\circ\text{C}$  por 30 minutos. Cálculo de área realizado pelo software Image-Pro Plus™.

Corte	Área média ( $10^{-7} \text{ cm}^2$ )	D médio ( $10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$ )
a	$6,5 \pm 0,8$	$3,6 \pm 0,5$
b	$6,2 \pm 0,4$	$3,5 \pm 0,2$
c	$8,0 \pm 0,4$	$4,4 \pm 0,2$
d	$6,2 \pm 0,7$	$3,4 \pm 0,4$
e	$6,4 \pm 0,4$	$3,6 \pm 0,2$

De acordo com a tabela acima, verifica-se que os valores de D médio de fios Oxi.controle apresentam uma ordem de grandeza de  $10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$ , o que está em concordância com os valores de D obtidos por dados de espectrofotometria.

### IV.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão

A obtenção de micrografias eletrônicas de transmissão visava verificar a estrutura de fios oxidados através da observação da seção transversal destes. As figuras 23 e 24 apresentam micrografias de um mesmo fio oxidado obtidas a partir de diferentes disposições deste.



Figura 23: Micrografia eletrônica de transmissão da seção transversal de um fio Oxi.control. Oxidação realizada com uma mistura de  $\text{H}_2\text{O}_2$  20 volumes, persulfato de potássio e  $\text{NH}_4\text{OH}$  em contato com as fibras por 30 minutos a  $32^\circ\text{C}$ . Aumento de 60000x.



Figura 24: Micrografia eletrônica de transmissão de um outro local da seção transversal do fio Oxi.controle. Oxidação realizada com uma mistura de  $H_2O_2$  20 volumes, persulfato de potássio e  $NH_4OH$  em contato com as fibras por 30 minutos a  $32^\circ C$  Aumento de 45000x.

As micrografias das figuras 23 e 24 mostram que mediante tratamentos com  $H_2O_2$  os fios sofreram uma drástica perda de camadas cuticulares. Na figura 23 há apenas 2 cutículas, sendo que a mais externa já apresenta uma tendência a se “destacar” do sistema. Na figura 24 não é observada nenhuma cutícula, apenas o córtex exposto.

#### IV.4 Avaliação Quantitativa de Danos em Fibras utilizando Marcador de Aminoácidos

Esta metodologia tinha por objetivo determinar a quantidade de DNS-Cl que reage com as fibras como medida de degradação dos aminoácidos das amostras oxidadas, fotooxidadas e abrasadas tratadas e não tratadas com ceramidas.

##### IV.4.1 Espectros de Cloreto de Dansila (DNS-Cl) e Ácido Dânsico (DNS-OH)

A obtenção de espectros do cloreto de dansila e do respectivo ácido foi feita com o intuito de verificar se estes compostos apresentam diferenças espectrais que permitam distingui-los.

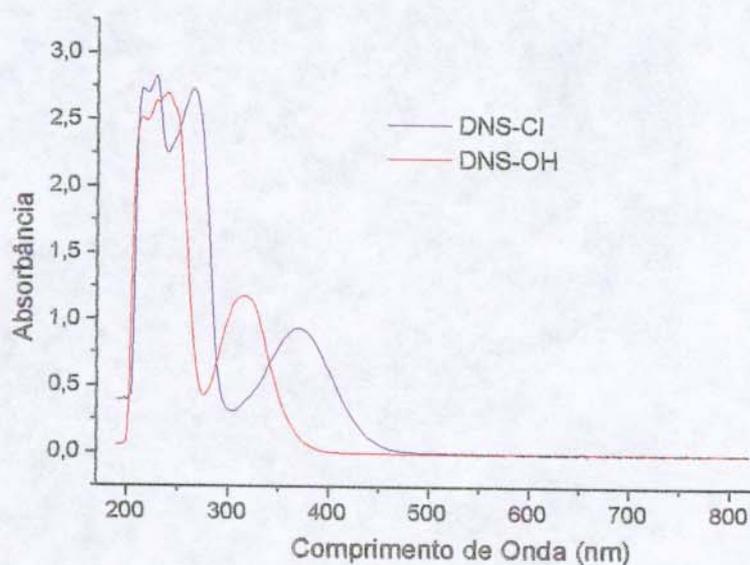


Figura 25: Espectro de UV-Vis de amostras de DNS-Cl puro dissolvido em 1,4-dioxano (a) e DNS-OH puro dissolvido em 1,4-dioxano (b).

Os espectros de DNS-Cl e DNS-OH apresentam seus máximos característicos em 370 e 314 nm respectivamente, o que permite que sejam distinguidos.

##### IV.4.2 Determinação da Concentração Final de DNS-OH

Por este método visava-se determinar a quantidade de DNS-Cl ligada à fibra a partir da concentração final de DNS-OH formado.

A figura 26 mostra o espectro UV-Vis de uma alíquota diluída do meio reacional após 6 horas de reação de dansilação.

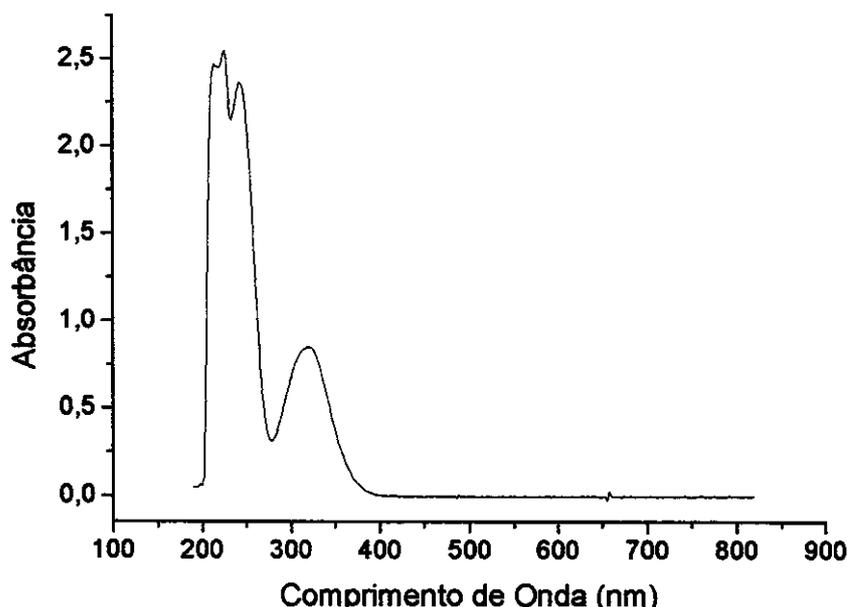


Figura 26: Espectro UV-Vis de uma alíquota diluída do meio reacional da amostra Oxi.controle. Massa de 0,0250g de cabelo em 1mL de solução 0,1M de  $\text{NaHCO}_3$  e 1mL de solução de cloreto de dansila em 1,4-dioxano com concentração inicial de  $1,86 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ .

Observa-se, segundo o espectro da figura 26 que, após 6 horas de reação de dansilação, somente há ácido dânsico no meio reacional. Espectros semelhantes foram obtidos para cada replicata das reações de dansilação das amostras Oxi.controle e Fotoxi.controle.

Utilizando-se o modelo de calibração descrito no item III.3.6.2 calculou-se, a partir dos espectros de cada amostra, as concentrações de ácido dânsico no meio reacional. Estes valores de concentração se encontram na tabela VI.

Tabela VI: Concentrações finais de ácido dânsico (DNS-OH). Massa de 0,0250g de cabelo em 1mL de solução 0,1M de  $\text{NaHCO}_3$  e 1mL de solução de cloreto de dansila em 1,4-dioxano com concentração inicial de  $1,86 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ . Experimentos em triplicata.

Controle	[DNS-OH]( $10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ )
Oxi	$17,9 \pm 0,3$
Fotoxi	$18,4 \pm 0,4$

De acordo com a equação da seção III.3.9.2 e utilizando os dados da tabela acima, determinaram-se as quantidades de reagente acoplado às fibras como mostra a tabela VII.

Tabela VII: Quantidades finais de ácido no meio reacional e de reagente acoplado às fibras. Massa de 0,0250g de cabelo em 1mL de solução 0,1M de  $\text{NaHCO}_3$  e 1mL de solução de cloreto de dansila em 1,4-dioxano com concentração inicial de  $1,86 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ . Experimentos em triplicata.

Controle	$n_0\text{DNS-Cl}$ ( $10^{-5}$ moles)	$n_f\text{DNS-OH}$ ( $10^{-5}$ moles)	$n\text{DNS-fibra}$ ( $10^{-5}$ moles)
Oxi	3,80	$3,58 \pm 0,06$	$0,22 \pm 0,06$
Fotoxi	3,80	$3,68 \pm 0,08$	$0,12 \pm 0,08$

Observa-se da tabela VII que o valor médio da quantidade de reagente acoplado às fibras Oxi. controle é maior do que aquele relativo às fibras Fotoxi. controle. Entretanto, devido aos desvios relativos a cada medida que fazem com que os intervalos se sobreponham, esta afirmação não é estatisticamente válida. Os espectros de UV-Vis foram obtidos em um aparelho de espectrofotometria pertencente ao Instituto de Química da Unicamp. Este equipamento apresentou, por sucessivas vezes, problemas de estabilidade e sensibilidade. Portanto, é possível que ao se utilizar um aparelho em melhores condições de funcionamento obtenham-se dados mais precisos.

#### IV.5 Ensaio de Coesão Cuticular das Fibras Abrasadas

Estes ensaios tinham como objetivo verificar se a aplicação da emulsão de ceramidas ao longo dos ciclos abrasivos aos quais as mechas eram submetidas tornava as cutículas mais resistentes à abrasão e, portanto, menos propensas a perderem suas proteínas constituintes quando sonicadas.

A figura 27 apresenta os espectros de alguns dos sobrenadantes de amostras abrasadas controle após reagirem com as soluções de Lowry.

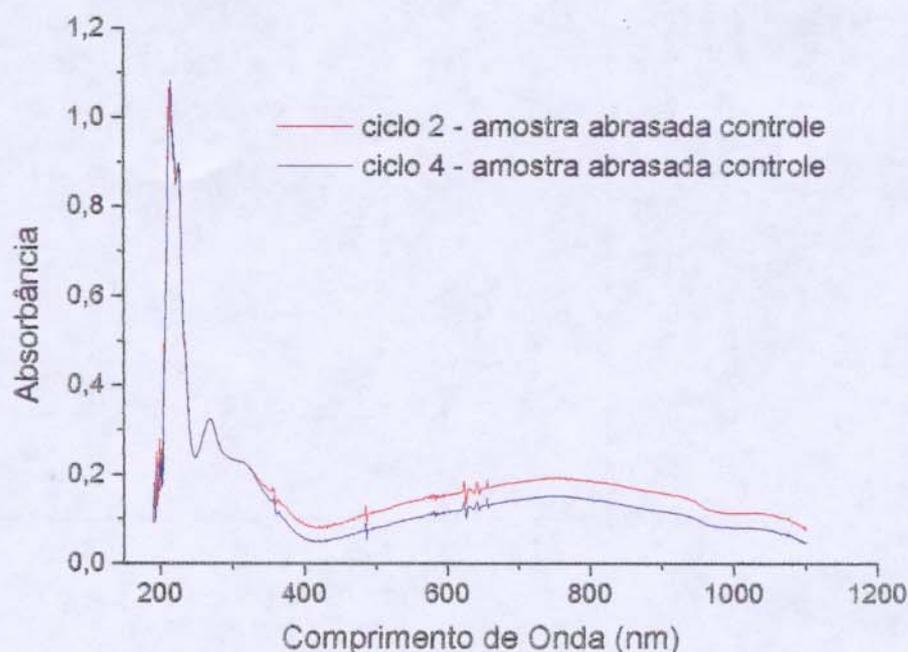


Figura 27: Espectros UV-Vis de sobrenadantes tratados com reagentes de Lowry de amostras abrasadas controle. Massa de 0,1500g de cabelo em 1,2mL de água destilada sonicada por 40 minutos. Sobrenadante centrifugado por 15 minutos a 4000 rpm.

Da figura 27 nota-se que os espectros obtidos apresentam, assim como as soluções de ASB, o máximo de absorbância em 750 nm característico do reagente de Folin Ciocalteu reduzido. Já se pode observar que à medida que aumenta o número de abrasões às quais o cabelo é submetido, a intensidade de absorbância dos espectros dos sobrenadantes diminui.

As diferenças entre as mechas abrasadas tratadas e não tratadas (controle) com ceramidas são melhor visualizadas através de um gráfico de quantidade de proteína liberada por ultra-som em função do número de ciclos abrasivos.

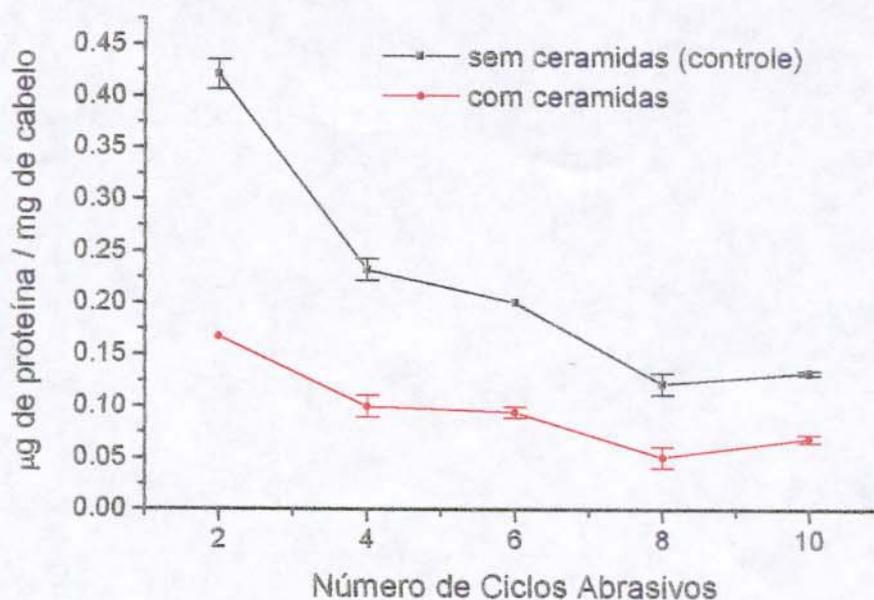


Figura 28: Razão entre massa de proteína liberada e massa de cabelo em função do número de ciclos abrasivos. A cada dois ciclos abrasivos retirou-se uma massa de 0,1500g de cabelo da mecha, o qual foi imerso em 1,2mL de água destilada e sonificado por 40 minutos. O sobrenadante foi centrifugado por 15 minutos a 4000 rpm e tratado com os reagentes de Lowry. Em seguida foram obtidos os espectros UV-Vis para determinação da massa de proteína liberada.

Através da figura 28 observa-se que à medida que aumenta o nº de ciclos abrasivos sofridos pelas mechas, diminui a quantidade de proteína liberada pelas fibras. As mechas tratadas constantemente com a emulsão de ceramidas “perdem” menos proteínas quando submetidas à energia ultrassônica do que o controle. Para os ciclos 2, 4, 6, 8 e 10 observa-se, respectivamente, uma quantidade de proteína liberada 62%, 58%, 54%, 59% e 47% em média menor nas amostras tratadas com ceramidas.

#### IV.6 Microscopia Eletrônica de Varredura

A obtenção de micrografias eletrônicas de varredura visava verificar como se encontrava a superfície dos fios abrasados através da observação das células cuticulares. As micrografias a seguir são representativas das diferenças observadas.

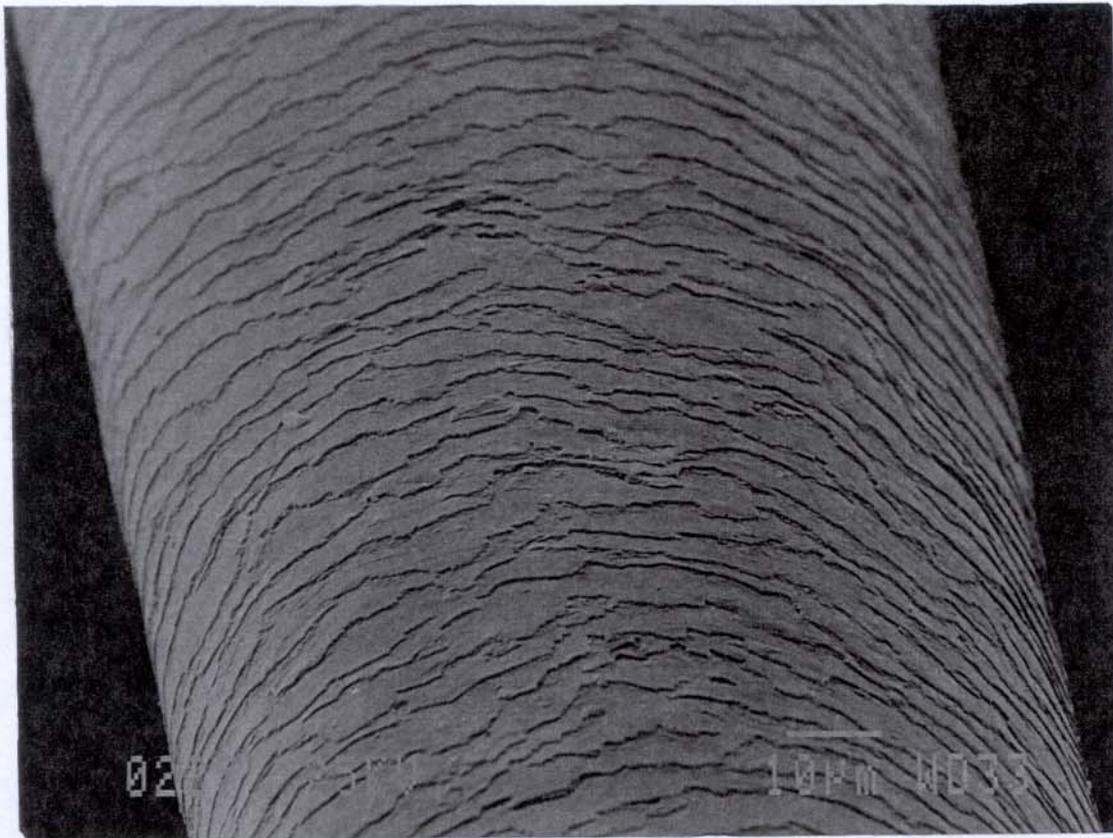


Figura 29: Micrografia eletrônica de varredura de um fio de cabelo padrão sem abrasão.

O fio de cabelo padrão apenas extraído com  $\text{Et}_2\text{O}$  apresenta, tal como ilustrado na figura acima, células cuticulares praticamente intactas e de contorno regular.

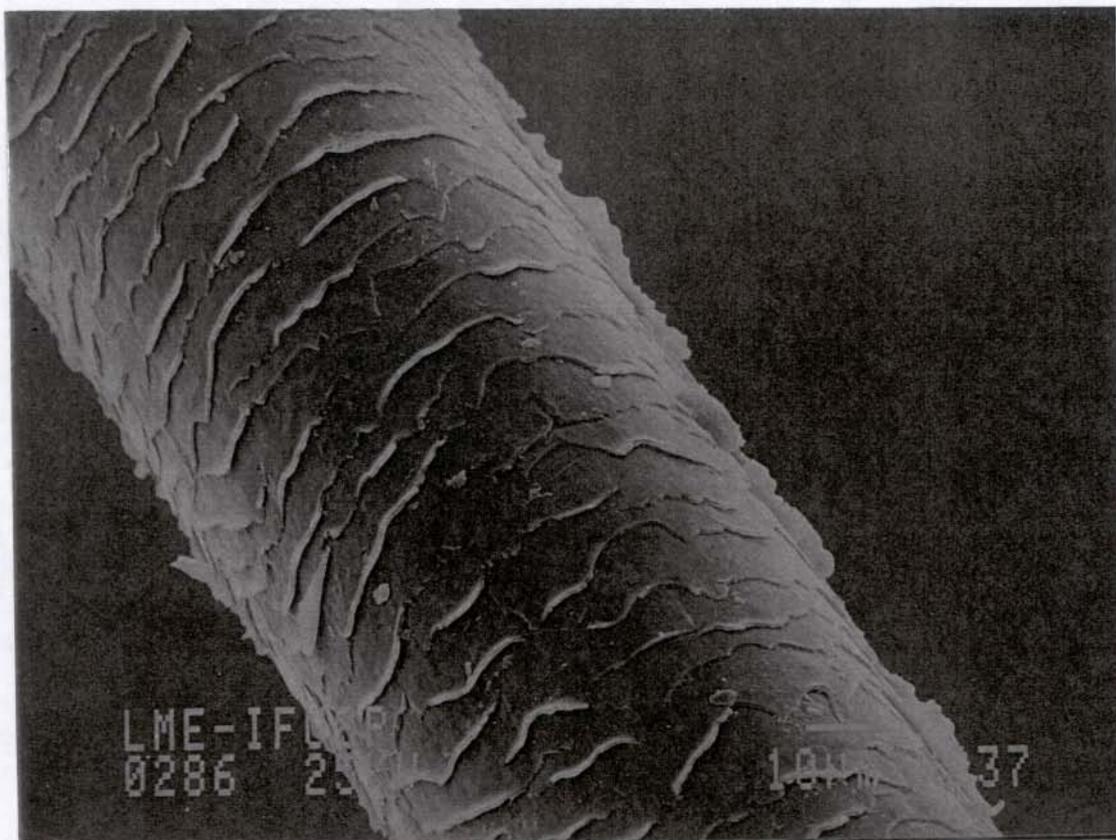


Figura 30A: Micrografia eletrônica de varredura de um fio de cabelo padrão submetido a 10 ciclos abrasivos e tratado com ceramidas.

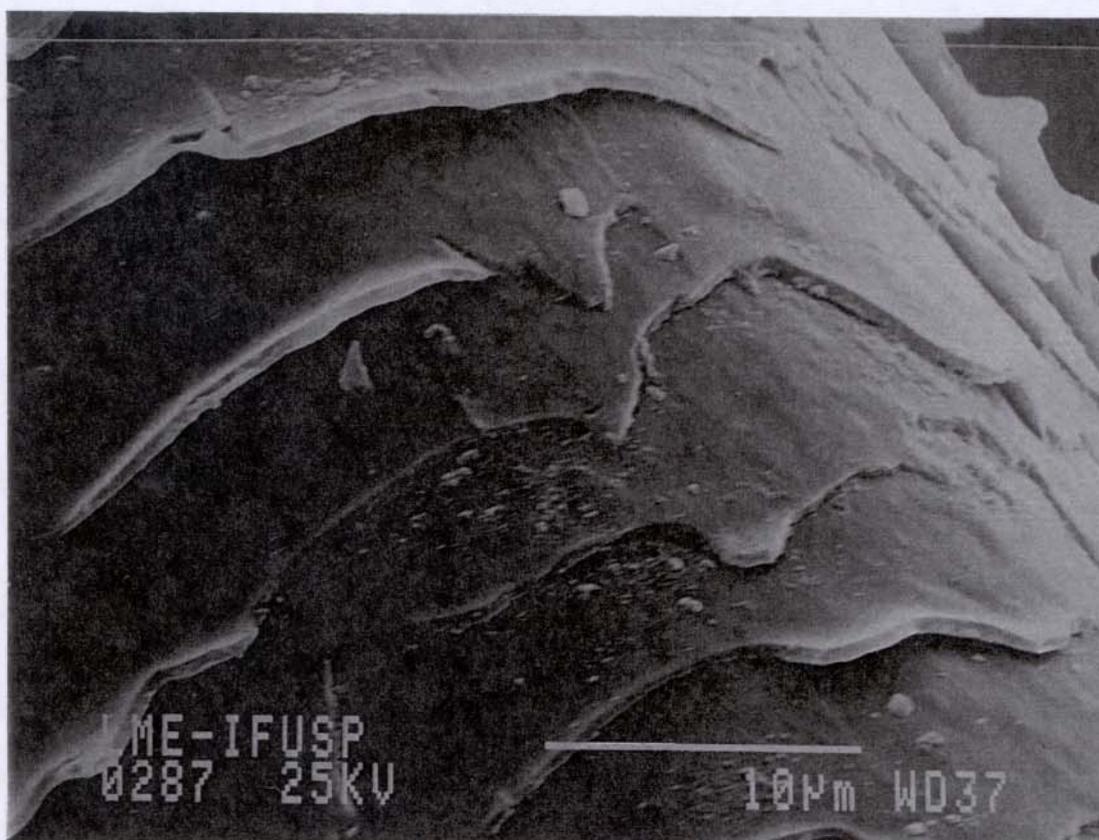


Figura 30B: Ampliação de uma região da micrografia da figura 30A.

Observa-se das figuras 30A e 30B que, após sucessivos ciclos abrasivos com aplicação de cerâmicas, as fibras apresentam um contorno cuticular mais irregular, porém não aparentam ter sofrido grandes perdas de material queratinoso. Algumas escamas apresentam um contorno esbranquiçado em suas extremidades que pode ser atribuído ao depósito de cerâmicas, ocasionando um contraste distinto com relação ao restante do fio.

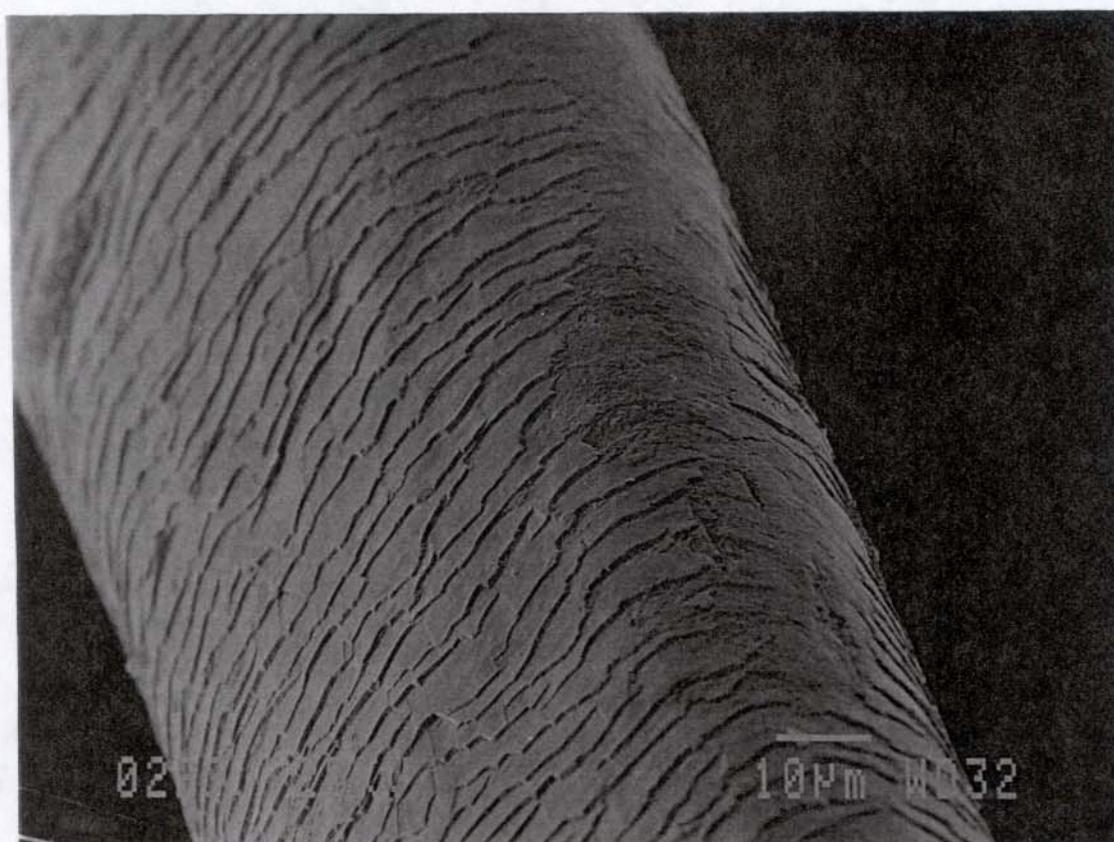


Figura 31A: Micrografia eletrônica de varredura de um fio de cabelo padrão submetido a 10 ciclos abrasivos não tratado com cerâmicas.

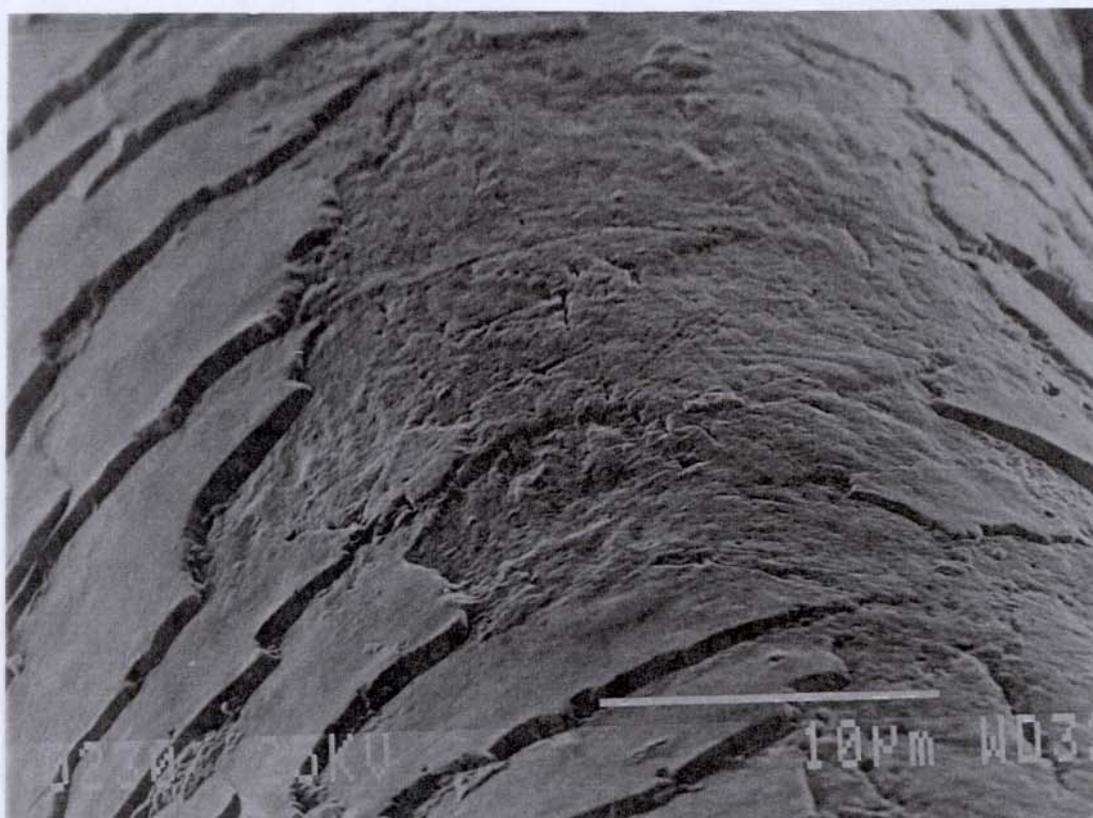


Figura 31B: Ampliação de uma região da micrografia da figura 22A.

Observa-se das figuras 31A e 31B que tratamentos abrasivos onde não há aplicação de cerâmicas promovem a remoção de grande quantidade de material cuticular. A região rugosa exposta devido à perda de material é, possivelmente, a endocutícula.

## V. DISCUSSÃO

### V.1 O Método Desenvolvido

O método desenvolvido para a determinação do coeficiente aparente de difusão de corantes em cabelo é inédito na literatura. Há poucos trabalhos em que estes coeficientes são determinados, e os autores utilizam técnicas mais trabalhosas e menos precisas. A maioria dos estudos de difusão é feita em lã, de estrutura e composição bastante semelhantes ao cabelo. Em geral, os procedimentos consistem, tal como neste trabalho, em acompanhar a depleção do soluto em solução. Para tal, a intervalos de tempo definidos, retira-se manualmente uma alíquota de solução de imersão da lã, dilui-se e lê-se a absorvância em um único comprimento de onda. Dois trabalhos encontrados medem a quantidade de soluto sorvido diretamente na fibra<sup>19,52</sup>. Em um dos trabalhos utiliza-se nylon 66, e periodicamente remove-se da solução de imersão que contém o corante uma amostra de nylon, a qual é enxaguada com água e seca a 105°C por 30 minutos. Em seguida, dissolve-se a mesma em o-clorofenol para posterior leitura de densidade ótica em espectrofotômetro<sup>52</sup>. O método de Holmes<sup>19</sup> para a determinação de coeficiente de difusão de corante em cabelo, obtendo-se diretamente da fibra a quantidade de soluto sorvido, encontra-se descrito mais adiante.

O método utilizado neste trabalho permite que a concentração da solução de corante em que as fibras estão imersas seja periodicamente analisada através de um sistema de fluxo ininterrupto. O procedimento de Holmes<sup>19</sup>, que também determinou coeficientes de difusão de alguns compostos no cabelo, consiste em manter as fibras imersas na solução de corante e, em intervalos sucessivos, removê-las e enxaguá-las com água fria. Entretanto, este procedimento, assim como o de Davis e Taylor para nylon<sup>52</sup>, não impede que a difusão continue a ocorrer após o intervalo de tempo estabelecido, o que induz à obtenção de valores de coeficiente de difusão incertos. No método de Holmes<sup>19</sup>, após o enxágue com água fria, o corante sorvido pela fibra é extraído utilizando solvente água-piridina ou dimetilformamida. Embora estes sistemas de solvente possam solubilizar os corantes utilizados por Holmes, dentre eles preto de alizarina e fenol, não se pode afirmar, e é até mesmo difícil de imaginar, que sejam capazes de dessorvê-los por completo.

Os resultados deste trabalho permitem, através de um grande número de dados de espectrofotometria (pode-se obter uma ou mais medidas por minuto), afirmar estatisticamente que o processo de difusão de rodamina B em todas as amostras estudadas ocorre mais

rapidamente na cutícula do que no córtex. Em contrapartida, o método de Holmes<sup>19</sup> dificilmente permitiria que se obtivesse mais do que uma única medida em cinco minutos, uma vez que o procedimento não é automatizado.

O coeficiente de difusão de rodamina na amostra Oxi.controle foi determinado por uma outra metodologia que forneceu valores da mesma ordem de grandeza. Esta segunda determinação por cálculo da área penetrada pelo corante forneceu um valor de coeficiente de difusão cerca de duas a três vezes maior do que aquele obtido por medidas espectrofotométricas. O fato de se ter assumido que o rendimento quântico do fenômeno de fluorescência equivaleu a 1 pode ter contribuído para que se obtivesse um maior valor de coeficiente de difusão. Além disso, a solução de imersão de rodamina dos fios Oxi.controle apresentava uma concentração dez vezes superior àquela utilizada na determinação por medidas espectrofotométricas, o que pode também ser um dos fatores que acarretaram um valor de coeficiente de difusão maior quando encontrado pelo método de cálculo da área.

## V.2 O Modelo de Difusão em Cabelo

No processo de difusão da rodamina B para o interior da fibra de cabelo, as moléculas de corante passam por seus dois principais componentes: cutícula e posteriormente córtex. Sabe-se que estas duas regiões são química e morfológicamente distintas. Portanto, a rodamina deve ter coeficientes de difusão diferentes em uma e outra região.

As curvas de razão entre quantidade de soluto sorvido no tempo  $t$  ( $Q_t$ ) e quantidade de soluto sorvido até se atingir o equilíbrio ( $Q_\infty$ ) em função da raiz quadrada do tempo ( $t^{1/2}$ ) apresentam, segundo uma análise visual, duas regiões: uma relativa aos primeiros minutos e outra subsequente. A equação utilizada, descrita por Crank<sup>44</sup>, apresenta mais termos que, no entanto, foram negligenciados. Esta equação com todos os termos é capaz de ajustar qualquer curva de difusão em um cilindro, como o cabelo. Entretanto, observa-se nitidamente que a curva obtida é formada por dois segmentos de reta, que pode ser descrita pela forma reduzida da equação de Crank. Assim, atribuiu-se o primeiro segmento de reta à difusão na cutícula e o segundo à difusão no córtex. Com estas considerações, a etapa lenta do processo corresponde à penetração da rodamina no córtex. Caso a etapa lenta ocorresse na cutícula, não seria possível obter qualquer resultado relativo à difusão no córtex, pois não haveria duas retas.

### V.3 Validação do Modelo

Para validar o modelo, verificando se este apresenta sentido físico, alguns cálculos e aproximações foram feitos.

A equação de Einstein-Smoluchowski<sup>53</sup> faz uma ligação entre os detalhes microscópicos das moléculas em movimento com os parâmetros macroscópicos do processo de difusão, que no nosso caso é o coeficiente aparente de difusão ( $D_{\text{apar}}$ ). Conhecendo-se o caminho livre médio percorrido pelas moléculas de rodamina ( $\lambda$ ) ao longo da camada cuticular e utilizando-se o valor de  $D_{\text{apar}}$  pode-se encontrar o tempo  $\tau$  necessário para o corante percorrer este caminho. O valor de  $\lambda$  corresponde à espessura da camada cuticular, que é de cerca de  $5\mu\text{m}$ . Em seguida encontra-se a forma da Equação de Einstein-Smoluchowski.

$$D = \frac{\lambda^2}{2\tau} \quad [5]$$

Obtiveram-se valores de  $\tau$  para as amostras padrão extraído, Oxi.controle, Fotoxi.controle e Abr.controle, os quais se encontram na tabela abaixo.

Tabela VIII: Valores de  $\tau$  (tempo necessário para as moléculas de rodamina percorrerem a camada cuticular) obtidos a partir dos valores de  $D_{\text{apar}}$  cut na tabela x e do valor de literatura da espessura da camada cuticular ( $\sim 5\mu\text{m}$ )

Amostra	$\tau$ (min)
Padrão extraído	21
Oxi.controle	25
Fotoxi.controle	9
Abr.controle	24

Os valores de  $\tau$  fornecidos pela tabela VIII mostram que os tempos necessários para que as moléculas de rodamina atravessassem a camada cuticular condizem com os intervalos de tempo visualmente determinados para separar as curvas  $Q_t/Q_\infty \times t^{1/2}$  em dois segmentos de

reta (vide tabela III). Isto valida o modelo desenvolvido que permite que se obtenham dados relativos à difusão na cutícula e no córtex separadamente, algo inédito na literatura.

#### V.4 O Mecanismo de Difusão em Cabelo

Segundo a literatura, a cutícula quando íntegra (sem processamentos físicos ou químicos) possui uma densidade de reticulações de resíduos cistéicos maior do que toda a fibra<sup>54</sup> e, portanto, deveria apresentar uma maior resistência à penetração de substâncias externas caso esta ocorresse por uma via transcelular. O córtex, com um teor inferior de resíduos cistéicos, deveria neste caso apresentar um maior coeficiente aparente de difusão. Entretanto, os experimentos com cabelo padrão mostram que há de fato uma penetração mais rápida na cutícula do que no córtex, indicando que no caso da rodamina B trata-se de uma *difusão intercelular* e não *transcelular* como se acreditava ser a rota preferencial no passado. Provavelmente fatores como tamanho da molécula difusora e solvente utilizado contribuíram para a ocorrência desta rota. Talvez moléculas menores difundem em amostras onde a exocutícula e a camada-A (maior reticulação por pontes de dissulfeto da fibra<sup>6,55,56</sup>) estejam extensivamente danificadas preferam a rota transcelular porque, neste caso, há menores impedimento estérico e resistência oferecida.

A magnitude dos valores de coeficiente aparente de difusão de rodamina ( $10^{-10}$  cm<sup>2</sup>/s) no cabelo se encontra dentro do esperado pela literatura. Utilizando cabelo branco, também conhecido por cã, sem qualquer processamento físico ou químico, Holmes<sup>19</sup> determinou a 25°C os coeficientes de difusão de preto de alizarina como sendo de  $9,0 \times 10^{-12}$  cm<sup>2</sup>/s. Para ácido para-sulfônico azobenzeno, 4-amino-2-nitrofenol e fenol, o mesmo autor encontrou nas mesmas condições, respectivamente, valores de  $2,6 \times 10^{-10}$  cm<sup>2</sup>/s,  $4,8 \times 10^{-10}$  cm<sup>2</sup>/s,  $3,2 \times 10^{-10}$  cm<sup>2</sup>/s. Estudos de difusão em lã fornecem valores semelhantes. A 25°C, Alexander e Hudson<sup>57</sup> encontraram um valor de  $0,7 \times 10^{-11}$  cm<sup>2</sup>/s para a difusão de alaranjado II em lã e, a 35°C, o coeficiente de difusão encontrado para o mesmo corante foi de  $1,4 \times 10^{-11}$  cm<sup>2</sup>/s. King<sup>58</sup> encontrou um valor da ordem de  $10^{-9}$  cm<sup>2</sup>/s para o coeficiente de difusão de vapor d'água em lã a 25°C.

#### V.5 Os Tratamentos sobre as Fibras

As amostras de cabelos fotooxidados por 72 horas foram aquelas onde houve uma maior velocidade de difusão de rodamina, ou seja, uma menor resistência à penetração de

substâncias externas. O tratamento com a emulsão de ceramidas não teve nenhum efeito preventivo ou restaurador sobre as fibras expostas à radiação UV. No processo fotooxidativo há a destruição de diversos aminoácidos como cistina, metionina, fenilalanina, triptofano, histidina, prolina e das pontes de dissulfeto<sup>6,59</sup> e o tempo de irradiação foi alto o bastante para que não se observasse qualquer proteção conferida pelo filme de ceramidas que evitasse a degradação dos aminoácidos. As ceramidas podem, inclusive, ter sido fotodegradadas.

A oxidação com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 30 minutos a 32°C e pH=10,5 também se mostrou um procedimento drástico o suficiente para que não se observasse qualquer efeito das ceramidas utilizadas. Provavelmente as condições de oxidação proporcionaram efeitos mais danosos do que duas aplicações de tintura comercial contendo descolorante, pois estas apresentam em geral um tempo de ação de 15 minutos e são feitas à temperatura ambiente. Há no mercado tinturas descolorantes que contêm ceramidas em sua formulação, porém não se sabe a qual das seis famílias estas pertencem. É possível que na primeira aplicação as ceramidas exerçam alguma função protetora, uma vez que condições como tempo de ação e temperatura são mais brandas do que nos experimentos deste trabalho. Porém, acredita-se que quando de uma segunda aplicação sobre fios já descoloridos as ceramidas já não apresentem qualquer ação preventiva contra a oxidação. De acordo com as micrografias eletrônicas de transmissão de fios oxidados, após 30 minutos em contato com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grande parte do material cuticular sobre o qual as ceramidas atuam já foi removido.

Não foram observadas diferenças entre as amostras Abr.controle e Abr.depois através da determinação do coeficiente aparente de difusão da rodamina. As amostras Abr.depois somente foram imersas na emulsão de ceramidas ao final do último ciclo abrasivo. De acordo com as micrografias eletrônicas de varredura das figuras observa-se que ao se submeter as fibras a 10 ciclos abrasivos há a remoção de diversas células cuticulares. A aplicação de ceramidas não pode restituí-las, o que faz com que os valores de  $D_{app}$  sejam indistintos para as amostras Abr.controle e Abr.depois. Estes lipídios podem, no máximo, aumentar a coesão entre as cutículas remanescentes reduzindo posteriores danos.

#### **V.6 A Fitoceramida-6 nos Ciclos Abrasivos**

De acordo com a literatura, ao se submeterem fibras de cabelo a uma vigorosa agitação mecânica ocorre a separação de material cuticular da haste<sup>60</sup>. Estudos de Swift e Brown<sup>60</sup> por microscopia eletrônica de varredura mostram que os resíduos cuticulares são “destacados” de

cada fio através de uma clivagem ao longo do complexo da membrana celular (CMC), liberando sobretudo a exocutícula e a camada-A. Em menor grau, as camadas cuticulares são também clivadas através da endocutícula<sup>60,61</sup>. Tanto o CMC quanto a endocutícula são subunidades com baixo teor de cistina e que, portanto, intumescem facilmente na presença de água.

Com a constatação neste trabalho de que uma molécula grande como a rodamina B (479 daltons) penetra na fibra por uma rota intercelular, ou seja, através do CMC, é bastante provável que a fitoceramida-6 utilizada (737 daltons), maior do que a rodamina B, também siga a mesma rota. Ao se imergir o cabelo na emulsão destes lipídios, parte das moléculas se aloja no CMC e parte continua a difundir para o interior da fibra.

Provavelmente durante a exposição do cabelo ao ultra-som, alguns fatores como fluxo turbulento de água sobre as fibras e atrito intenso<sup>61</sup> foram suficientes para abstrair as camadas cuticulares a partir do CMC intumescido que, devido às abrasões e dissolução de seus lipídios com lavagens, tornou-se mais suscetível à clivagem. A observação de que a liberação de proteína por ultra-som, que corresponde às cutículas abstraídas, é sempre menor para a mecha tratada com ceramidas do que para o controle é um indicativo de que estas “enriquecem” o CMC, tornando-o mais resistente aos fatores que induzem a clivagem da cutícula nesta região. Deste modo, atribuiu-se aos lipídios utilizados um efeito de melhoria das propriedades coesivas das células cuticulares. Braida *et al*<sup>3</sup>, dos laboratórios de pesquisa fundamental da L'Oréal, já haviam verificado visualmente que cabelos tratados com ceramidas da classe 2 ao serem submetidos em água a ultra-som liberavam menor quantidade de precipitado depois de centrifugar o sobrenadante.

Por outro lado, a verificação de que há uma tendência a diminuir a quantidade de proteína liberada por ultra-som à medida que aumenta o número de ciclos abrasivos certamente não significa que as cutículas estão mais resistentes, até mesmo porque a mecha controle também libera menos proteína com o aumento dos ciclos abrasivos. Provavelmente as abrasões/erosões que removem progressivamente camadas cuticulares fazem com que haja uma disponibilidade cada vez menor destas para serem abstraídas por ultra-som.

Embora o que se observa na figura 28 seja a maior coesão cuticular frente a ultra-som em cabelos tratados com as ceramidas utilizadas, pode-se inferir que também durante abrasões como penteações, lavagens com tensoativo e secagens com toalha perde-se menos material

queratinoso quando o cabelo é frequentemente submetido à reposição de ceramida de seus complexos da membrana celular.

### V.7 Sobre Produtos de “Hair Care” que Contêm Ceramidas

Xampus e condicionadores que contêm ceramidas<sup>62,63</sup> semelhantes à estudada (classe 6) não têm capacidade de restaurar cutículas, mas sim de prevenir que sofram posteriores danos, estejam elas íntegras ou não. Certamente as ceramidas pertencentes às outras classes também não apresentam nenhum efeito regenerativo sobre a cutícula, haja visto que trata-se de um material sem nenhuma atividade celular.

Uma das maiores dificuldades na comunicação entre investigadores científicos em “hair care” e consumidores é a falta de definições precisas sobre os efeitos que podem ser propiciados ao cabelo pelos produtos à venda.

A L’Oréal, fabricante do xampu e condicionador Elsève Nutri-Ceramida, alega no rótulo de seus produtos que a Ceramida-R®, cuja classe a que pertence é desconhecida, fortalece os cabelos e preenche “microfissuras” presentes nas fibras. Nesta afirmação há algumas definições a serem discutidas:

- 1- De acordo com a definição do dicionário Aurélio da Língua Portuguesa, fortalecer significa tornar vigoroso ou consistente. É, portanto, algo pouco provável de ser proporcionado e até mesmo avaliado para qualquer princípio ativo sobre a fibra capilar. O fabricante provavelmente designa como “fortalecimento” a menor incidência de quebra dos fios quando submetidos a uma determinada tensão. A L’Oréal afirma que esta redução é de 40%. Deve-se considerar dois pontos:

A) Ainda que as ceramidas possam penetrar no córtex<sup>64</sup> após longo tempo de contato com o cabelo, não se pode esperar que no curto tempo de contato que consiste a lavagem ou condicionamento das fibras haja penetração das ceramidas no córtex.

B) De acordo com vários trabalhos, as propriedades mecânicas se relacionam apenas com o córtex e não com a cutícula. Wolfram e Lindemann<sup>65</sup> sugeriram, por outro lado, que a cutícula efetivamente contribui para as propriedades mecânicas, sobretudo em cabelos finos. Já Scott<sup>66</sup> forneceu argumentos para a hipótese de que não há envolvimento da cutícula nestas propriedades, uma vez que demonstrou que os ensaios de tensão em cabelos abrasados e não abrasados são idênticos. Robbins e

Crawford<sup>67</sup> forneceram mais provas de que o córtex é o único responsável pelas propriedades mecânicas mostrando que uma severa degradação na cutícula não pode ser detectada por ensaios mecânicos.

Caso a hipótese de Wolfram e Lindemann seja válida, o “fortalecimento” proposto pela L’Oréal consiste numa maior resistência das cutículas à tensão, ocasionando um menor percentual de quebra na escovação. Por outro lado, se Scott, Robbins e Crawford e tantos outros cientistas que atribuem ao córtex as propriedades mecânicas das fibras capilares estiverem corretos, não se pode esperar qualquer efeito de redução de quebra do cabelo durante a escovação, devido ao que foi dito no item A.

O que efetivamente pode ser atribuído à Ceramida-R<sup>®</sup>, caso esta seja semelhante à fitoceramida-6 estudada, é o fato das cutículas se tornarem mais resistentes à clivagem e, portanto, a ações abrasivas diárias.

2- O termo microfissuras é bastante impreciso. Talvez o fabricante se reporte ao espaço que surge entre duas cutículas quando “levantadas” devido a abrasões. Tais microfissuras podem ser também buracos presentes na endocutícula devido à exposição solar ou abrasões, incluindo lavagens com xampus. Estes “buracos” têm sido extensivamente estudados em nosso grupo de pesquisa.

É possível que as ceramidas se alojem e diminuam as irregularidades superficiais responsáveis pela perda de brilho. Entretanto, outros princípios ativos como silicone também podem ser capazes de preencher estes espaços, sobretudo se as microfissuras forem os espaços entre cutículas “levantadas”, além do que apresentam um menor custo. Entretanto, estudos de Scanavez<sup>46</sup> mostram que não são todos os silicones capazes de preencher os “buracos” da endocutícula, além do que é necessário um grande tempo de contato para que isto venha a ocorrer. Portanto, não se sabe tampouco se a Ceramida-R<sup>®</sup> presente nos xampus e condicionadores Elsève poderia, em um curto tempo relativo à aplicação do produto, preencher as microfissuras caso estas sejam os buracos mencionados. Ademais, os produtos Elsève contêm dimeticona em sua formulação que pode ser a responsável pela maior intensidade de brilho conferido ao cabelo em vez da Ceramida-R<sup>®</sup>. Talvez ambos os ingredientes tenham efeitos sinérgicos que proporcionam maior lustre ao cabelo.

## VI - CONCLUSÕES

Os ensaios de coesão cuticular mostraram que a emulsão de ceramidas utilizada reduziu as perdas protéicas em fibras abrasadas quando submetidas ao ultra-som. As perdas foram de 62 a 47% menores com relação ao controle.

As micrografias eletrônicas de varredura revelaram que quando as fibras são submetidas a abrasões constantes (penteações, lavagens com tensoativos aniônicos, fricções com toalha para secagem) há a remoção de inúmeras células cuticulares, deixando o córtex exposto. Um tratamento constante com as ceramidas utilizadas reduz a perda excessiva de material queratinoso, ainda que não se possa evitar que as cutículas passem a ter um contorno mais irregular devido à abrasão.

A constatação de que, após se atingir a capacidade máxima de sorção de corante pela fibra (equilíbrio), a concentração da solução decaiu em até 74% de seu valor inicial indicou que esta não se tratava de um “banho infinito”, e sim de uma solução com concentração variável. Portanto, a equação adequada foi a descrita por Crank.

A curva de razão entre quantidade de soluto sorvido no tempo  $t$  ( $Q_t$ ) e quantidade de soluto sorvido até se atingir o equilíbrio ( $Q_\infty$ ) em função da raiz quadrada do tempo ( $t^{1/2}$ ) é formada por dois segmentos de reta de inclinações diferentes. O segmento relativo aos primeiros minutos de difusão é atribuído à cutícula e aquele relativo aos demais minutos refere-se ao córtex.

Observou-se que o processo de difusão de rodamina B no cabelo é mais rápido na cutícula do que no córtex. Como a cutícula é a subunidade que apresenta maior densidade de reticulações por pontes de dissulfeto, esperava-se uma difusão mais lenta caso a rota fosse transcelular. Por conseguinte, trata-se, neste caso, de um processo intercelular.

Os tratamentos a que as fibras capilares foram submetidas, exceto a fotooxidação, não pareceram afetar a natureza do córtex, uma vez que os valores de coeficiente aparente de difusão de rodamina B nesta subunidade permaneceram inalterados.

Não se detectaram diferenças entre as amostras tratadas e não tratadas com

ceramidas através de medidas de coeficiente aparente de difusão de rodamina B no cabelo.

Os valores de coeficiente aparente de difusão de rodamina B na cutícula de cabelos fotooxidados por 72 horas foram os mais altos observados. O tempo de exposição à radiação UV ocasionou alterações excessivamente drásticas, como degradação da cutícula, de modo que não se observaram os efeitos das ceramidas.

As micrografias eletrônicas de transmissão mostraram que as amostras oxidadas têm suas células cuticulares quase completamente removidas, logo não são observados quaisquer efeitos das ceramidas sobre o cabelo.

O método de Lowry modificado (com adição de LSS à mistura reacional) mostrou-se bastante sensível e prático para quantificar as proteínas liberadas pelo cabelo em ultra-som.

O método desenvolvido para determinação de coeficiente aparente de difusão de corantes em cabelo por medidas de espectrofotometria mostrou-se bastante eficiente, mais preciso e menos trabalhoso do que os já descritos em literatura.

Ambos os métodos desenvolvidos para a determinação do coeficiente de difusão de rodamina B no cabelo forneceram valores da mesma ordem de grandeza ( $10^{-10}$  cm<sup>2</sup>/s), que são bastante semelhantes a valores encontrados para lã e nylon.

## VII - REFERÊNCIAS

- <sup>1</sup> Ludgren, H.P.; Ward, W.H. em Borasky "Ultrastructure of Protein Fibers", 1963, 39, Academic Press, New York.
- <sup>2</sup> Röper, K.; Föhles, J.; Peters, D.; Zahn, H.; "Morphological Composition of the Cuticle from Chemically Treated Wool – Part 1"; *Textile Res. J.*, 1984, 54, 139.
- <sup>3</sup> Braida, D.; Dubief, C.; Lang, G.; Hallegot, P.; "Ceramide – A New Approach to Hair Protection and Conditioning"; *Cosm. & Toil.*, 1994, 109, 49.
- <sup>4</sup> Tolgyesi, E.; "Weathering of Hair"; *Cosm. & Toil.*, 1983, 98, 29.
- <sup>5</sup> Swift, J. A.; Bews, B.; "The Chemistry of Human Hair Cuticle - I: A New Method for the Physical Isolation of Cuticle"; *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 1974, 25, 13.
- <sup>6</sup> Robbins, C.R. em "Chemical and Physical Behavior of Human Hair"; Springer-Verlag, New York, 1994, cap 1,5.
- <sup>7</sup> Leon, N. H.; "Structural Aspects of Keratin Fibers"; *J. Soc. Cosmet. Chem.* 1972, 23, 427.
- <sup>8</sup> Wall, R.A. Hunter, L. D.; "Normal Adult Hair – Structure and Properties"; *Cosm. & Perfum.*, 1974, 89, 31.
- <sup>9</sup> Kaplin, I.J.; Schwan, A.; Zahn, H.; "Effects of Cosmetic Treatments on the Ultrastructure of Hair"; *Cosm. & Toil.*, 1982, 97, 22.
- <sup>10</sup> Gould, G. J.; Sneath, P. L.; "Electron Microscopy – Image Analysis: Quantification of Ultrastructural Changes in Hair Fiber Cross Sections as a Result of Cosmetic Treatment"; *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 1985, 36, 53.
- <sup>11</sup> Bradbury, J. H.; Leeder, J. D.; "The Cell Membrane Complex of Wool"; *Applied Polymer Symposium*, 1971, nº 18, 227.

- 
- <sup>12</sup> Hoting, E.; Zimmermann, M; "Photochemical Alterations in Human Hair. Part III: Investigations of Internal Lipids", *J. Soc. Cosmet.Chem.*, **1996**, *47*, 201.
- <sup>13</sup> Voet, D.; Voet, J. G. em "Biochemistry"; John Wiley & Sons, Inc., New York, 1995, cap.23.
- <sup>14</sup> Hussler, G.; Kaba, G ; " Isolation and Identification of Human Hair Ceramides" ; *Int. J. Cosmetic. Sci*, **1995**, *17*, 197.
- <sup>15</sup> Wertz P. W.; Downing, D. T.; "Ceramides of Pig Epidermis: Structure Determination"; *J. Lipid Res.*, **1983**, *24*, 759.
- <sup>16</sup> Iwai, H.; Fukasawa, J.; Suzuki, T.; "Successful Incorporation of Pseudo-Ceramides into Emulsions at Effective Concentrations"; *J. Colloid Interface Sci*, **1997**, *189*, 288.
- <sup>17</sup> Lambers, H.; Keuning, W.; te Velde, A.; van der Wilden, W; "Human Skin-Identical Ceramides" Brochura da Cosmoferm – Gist-brocades.
- <sup>18</sup> Tate, M.L.; Kamath, Y.K.; Ruetsch, S.B./ Weigmann, H.D.; "Quantification and Prevention of Hair Damage"; *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **1993**, *441*, 347.
- <sup>19</sup> Holmes, A.W.; "Diffusion Processes in Human Hair"; *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **1964**, *15*, 595.
- <sup>20</sup> Leeder, J.D.; Rippon, J.A.; "Some Observations on the Dyeing of Wool from Aqueous Formic Acid"; *J. Soc. Dyers Col.*,**1983**, *64*, 99.
- <sup>21</sup> Seiler, N; "Use of the Dansyl Reaction in Biochemical Analysis"; *Methods of Biochemical Analysis*, David Glick, **1970**, *18*, 259.
- <sup>22</sup> Winter, G.; "Manual Sequencing by the Dansyl-Edman Reaction" em *Practical Protein Chemistry – A Handbook*, A. Darbre, **1986**, p.367.

- 
- <sup>23</sup> Sandhu, S.S.; Robbins, C.R.; "A Sensitive Fluorescence Technique Using Dansyl Chloride to Assess Hair Damage", *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 1989, 40, 287.
- <sup>24</sup> Okumura, T.; *4th International Hair Science Symposium*, Syburg, 1984.
- <sup>25</sup> Kelly, S.C.; Robinson, V.N.E.; "The Effect of Grooming on the Hair Cuticle"; *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 1982, 33, 203.
- <sup>26</sup> Kambe, T., *et al.*; *Proc. 6th International Hair Science Symposium*, Luneberg, 1988.
- <sup>27</sup> Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J.; "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent"; *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 265.
- <sup>28</sup> Peterson, G. L.; "Review of the Folin Phenol Protein Quantitation Method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall"; *Anal. Biochem.*, 1979, 100, 201.
- <sup>29</sup> Peterson, G. L.; "Determination of Total Protein"; *Methods in Enzymology*, 1983, 91, 95.
- <sup>30</sup> Peterson, G. L.; "A Simplification of the Protein Assay Method of Lowry *et al.* Which is more Generally Applicable"; *Anal. Biochem.*, 1977, 83, 346.
- <sup>31</sup> Beltran, M. C. em "Manual de Técnicas para el Estudio de las Membranas Biológicas", Tese de Doutorado, IB-UNICAMP, 1987, p.15.
- <sup>32</sup> Vandeginste, B.G.M.; "Chemometrics – General Introduction and Historical Development"; *Top. Curr. Chem.*, 1987, 141, 1.
- <sup>33</sup> Geladi, P.; Kowalski, B.R.; "Partial Least-Squares Regression: A Tutorial"; *Anal. Chim. Acta*, 1986, 185, 1.

- <sup>34</sup> Beebe, K.R.; Kowalski, B.R.; "An Introduction to Multivariate Calibration and Analysis"; *Analytical Chemistry*, 1987, 59, 1007A.
- <sup>35</sup> Martens, H.; Naes, T. em "Multivariate Calibration"; John Wiley and Sons, New York, 1989.
- <sup>36</sup> Haaland, D.M.; Thomas, E.V.; "Partial Least-Squares Methods for Spectral Analysis. 1. Relation to Other Quantitative Calibration Methods and the Extraction of Qualitative Information"; *Anal. Chem.*, 1988, 60, 1193.
- <sup>37</sup> Data Sheet dos Laboratórios Sérobiologiques; "Complexo de Ceramidas Ácido Alfa Hidroxiladas nativas, vegetais, para cosmetologia".
- <sup>38</sup> Curry, K.V.; Golding, S.; "Hair Lipids – I. The extraction of fatty materials from hair clippings"; *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 1971, 22, 681.
- <sup>39</sup> Robbins, C.R.; "Chemical Aspects of Bleaching Human Hair"; *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 1971, 22, 339.
- <sup>40</sup> Cook, M.; "Modern Hair Bleaches"; *Drug Cosmet. Ind.*, 1966, 99, 47, 154.
- <sup>41</sup> Hutter, J. M.; Clarke, M.T.; Just, E.K.; Lichtin, J.L.; Sakr, A.; "Colloid Titration: A Method to Quantify the Adsorption of Cationic Polymer by Bleached Hair"; *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 1991, 42, 87.
- <sup>42</sup> Wolfram, L.J.; Hall, K.; Hui, I.; "The Mechanism of Hair Bleaching"; *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 1970, 21, 875-900.
- <sup>43</sup> Tucci, A.M.; "Propriedades Físico-Químicas de Cabelo: Desenvolvimento de Método de Avaliação de Alterações Estruturais Induzidas por Irradiação"; Tese de Mestrado, IQ-UNICAMP, 1989, p.71.

- 
- <sup>44</sup> Crank, J. em "The Mathematics of Diffusion", Clarendon Press, Oxford, 1967, cap.1,12.
- <sup>45</sup> Potsch, L.; Moeller, M.R.; "On Pathways for Small Molecules Into and Out of Human Hair Fibers"; *J. Forensic Sci.*, 1996, 41, 121.
- <sup>46</sup> Scanavez, C.; Joekes, I.; Silveira, M.; "Electron Microscopy of Human Hair"; *Proc. XVII Congress of the Brazilian Society for Microscopy and Microanalysis and X Congress of the Brazilian Society for Cell Biology*, 1999, 8, 581.
- <sup>47</sup> Sandhu, S. S.; Ramachandran, R.; Robbins, C. R.; "A Simple and Sensitive Method Using Protein Loss Measurements to Evaluate Damage to Human Hair During Combing"; *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 1995, 46, 39.
- <sup>48</sup> Bates, W. K.; McAllister, D. F.; "Some Methods for Nonlinear Regression Using Desk-Top Calculators with an Application to the Lowry Protein Method"; *Anal. Biochem.*, 1974, 59, 190.
- <sup>49</sup> Stauffer, C. E.; "A Linear Standard Curve for the Folin Lowry Determination of Protein"; *Anal. Biochem.*, 1975, 69, 646.
- <sup>50</sup> Sandhu, S. S.; Robbins, C. R.; "A Simple and Sensitive Technique, Based on Protein Loss Measurements, to Assess Surface Damage to Human Hair"; *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 1993, 44, 163.
- <sup>51</sup> Braun, A.M.; Maurette, M.T.; Oliveros, E. em "Photochemical Technology" ; John Wiley and Sons, West Sussex, 1991, p.92.
- <sup>52</sup> Davis, G. T.; Taylor, H.S.; "Diffusion Kinetics of Orange-II in Nylon 66"; *Text. Res. J.*, 1965, 35, 405.
- <sup>53</sup> Atkins, P. W. em "Physical Chemistry"; Oxford University Press, Oxford, 1994, cap.24.

- 
- <sup>54</sup> Bradbury, J. H.; Chapman, G. V.; Hambly, A. N.; King, N. L. R.; "Separation of Chemically Unmodified Histological Components of Keratin Fibers and Analysis of Cuticles"; *Nature*, 1966, 210, 1333.
- <sup>55</sup> Swift, J. A.; Bews, B.; "The Chemistry of Human Hair Cuticle – II: The Isolation and Amino Acid Analysis of the Cell Membranes and A-Layer"; *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 1974, 25, 355.
- <sup>56</sup> Swift, J.A.; "Chemical Composition of Various Morphological Components Isolated from Human Hair Cuticle"; *Cosm. & Toil.*, 1976, 91, 46.
- <sup>57</sup> Alexander, P.; Hudson, R. F.; "The Kinetics of Wool Dyeing – Part I: Simple Acid Dyes"; *Text. Res. J.*, 1950, 20, 481.
- <sup>58</sup> King, G.; "Sorptions of Vapors by Keratin and Wool"; *Trans. Faraday Soc.*, 1945, 41, 479.
- <sup>59</sup> Pande, C. M.; Jachowicz, Janusz; "Hair Photodamage – Measurement and Prevention"; *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 1993, 44, 109.
- <sup>60</sup> Swift, J. A.; Brown, A. C.; "The Critical Determination of Fine Changes in the Surface Architecture of Human Hair Due to Cosmetic Treatment"; *J. Soc. Cosmet. Chem.* 1972, 23, 695.
- <sup>61</sup> Swift, J. A.; Bews, B.; "The Chemistry of Human Hair Cuticle - I: A New Method for the Physical Isolation of Cuticle"; *J. Soc. Cosmet. Chem.* 1974, 25, 13.
- <sup>62</sup> Philippe, M.; Luppi, B.; Semeria, D.; "Ceramide Compounds, Process for their Preparation and Use"; *US Patent 6,039,963 (2000)*.
- <sup>63</sup> Saint-Leger, D.; Kaba, G.; Hussler, G.; "Cosmetic Composition Comprising a Combination of Ceramides and Use Thereof"; *US Patent 5,939,077 (1999)*.

<sup>64</sup> Comunicação pessoal de Ana Marta Tucci.

<sup>65</sup> Wolfram, L. J.; Lindemann, M.; "Some Observations on the Hair Cuticle"; *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 1971, 22, 839.

<sup>66</sup> Comunicação pessoal de Scott, G. V. a Robbins, C.R.

<sup>67</sup> Robbins, C. R.; Crawford, R.; "Cuticle Damage and the Tensile Properties of Human Hair"; *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 1991, 42, 59.

\*\*\*