

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

PEDRO AUGUSTO LAURINDO IGREJA MARRAFA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO GÁS OZÔNIO EM FIBRA CAPILAR
HUMANA: UM ESTUDO PRELIMINAR *IN VITRO***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**MESTRADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU**

São José dos Campos, Fevereiro/2022

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

PEDRO AUGUSTO LAURINDO IGREJA MARRAFA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO GÁS OZÔNIO EM FIBRA CAPILAR
HUMANA: UM ESTUDO PRELIMINAR *IN VITRO***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Stricto Sensu em Engenharia Biomédica – Mestrado, da
Universidade Anhembi Morumbi, como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica

Orientador Prof. Dr. Carlos José de Lima

Co-orientadora: Profa. Dra. Adriana Barrinha Fernandes
Moretti

São José dos Campos, Fevereiro/2022

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

PEDRO AUGUSTO LAURINDO IGREJA MARRAFA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO GÁS OZÔNIO EM FIBRA CAPILAR
HUMANA: UM ESTUDO PRELIMINAR *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Stricto Sensu em Engenharia Biomédica – Mestrado, da
Universidade Anhembi Morumbi, como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica
aprovada pela seguinte Banca Examinadora:

Prof. Dr. Carlos José de Lima

Orientador

Mestrado em Engenharia Biomédica

Universidade Anhembi Morumbi

Prof. Dra. Adriana Barrinha Fernandes Moretti

Universidade Anhembi Morumbi

Prof. Dra. Tulia de Souza Botelho

Faculdade Santo Antonio

São José dos Campos, Fevereiro/2022

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do
trabalho sem autorização da Universidade, do autor e do orientador.

PEDRO AUGUSTO LAURINDO IGREJA MARRAFA

Graduado tecnólogo em Estética, Mestrando em Engenharia Biomédica pela Universidade Anhembi Morumbi.

Ficha Catalográfica

Laurindo Igreja Marrafa, Pedro Augusto

Avaliação dos efeitos do gás ozônio em fibra capilar humana: um estudo preliminar *in vitro* / *Pedro Augusto Laurindo Igreja Marrafa* – 2022

69 f. : il.; 30 cm.

Orientador: Carlos José de Lima

Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Universidade Anhembi Morumbi, São José dos Campos, 2022.

Bibliografia: f. 59-66

1. Engenharia Biomédica. 2. Gás Ozônio. 3. Cabelo Humano. 4. Microscopia Eletrônica de Varredura. 5. Espectroscopia de Infravermelho.

CDD 610.28

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho primeiramente a meus orixás e guias, que estão sempre ao meu lado me ajudando nesta jornada.

Dedico também a pessoas muito importantes em minha vida, minhas mães, Aleteia e Fabiana, que me deram uma família linda e construíram uma base forte, ao meu namorado Hulair, que é meu porto seguro em São José dos Campos, e tem sempre a maior paciência e carinho nos momentos que mais preciso, a família que a vida me permitiu escolher, em especial “Malonna” e “Panda”, por terem me acolhido e pelo apoio em todas as horas.

AGRADECIMENTOS

Em especial, agradeço aos professores, Prof. Dr. Carlos José de Lima e Profa. Dra. Adriana Barrinha Fernandes Moretti pela orientação, além de todos os ensinamentos, disponibilidade, confiança e amizade.

Agradeço aos colegas Túlia de Souza Botelho Almeida e Henrique Carvalho pelo suporte nos laboratórios do CITÉ e pelo comprometimento durante os ensaios e testes realizados neste estudo.

Gostaria de expressar minha enorme gratidão a minha prima Bianca Kawata, pelo apoio mesmo quando ela tinha o próprio doutorado para cumprir, principalmente no uso do MEV.

Agradeço aos meus colegas: Ana Carolina Brisola, Maycon Carvalho, Aline Garrido, Ana Cristina, Fernando, Leila Poggetto, Verônica e todos os demais colegas de curso, que foram fundamentais com seu apoio ao longo dessa caminhada.

Agradeço também ao coordenador Prof. Dr. Renato Amaro Zângaro pela organização do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica.

Minha gratidão a todos os professores pelo sólido conhecimento e experiências compartilhadas, que engrandecem e enriquecem o PPG em Engenharia Biomédica, em especial ao Prof. Dr. Landulfo Silveira Júnior, pelo suporte no processamento de espectros infravermelho.

Não posso deixar de agradecer à Nidia Macedo que, desde o início, sempre demonstrou sua simpatia, atenção, eficiência e agilidade em responder e atender às dúvidas e solicitações.

Por fim, agradeço à CAPES pela bolsa de Mestrado, uma vez que o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), e ao Laboratório de Plasmas e Processos do Instituto Tecnológico de Aeronáutica por proporcionar as análises no equipamento de Espectroscopia de Infravermelho.

RESUMO

Dentre as pesquisas na área da saúde aquelas que envolvem ozônio tem demonstrado grande potencial de aplicabilidade, contudo em relação ao cabelo ainda há poucos estudos que apontam a segurança do uso do gás ozônio, principalmente em contato com a haste capilar. O objetivo deste trabalho é caracterizar possíveis alterações físico-químicas que possam surgir em fios de cabelo submetidos ao gás ozônio. A análise das amostras de cabelo ozonizadas envolveu Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para análise física e Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) com Refletância Total Atenuada (ATR) para análise de alterações químicas. Através da técnica de MEV foi possível identificar alterações do relevo do folículo capilar, enquanto por meio de FTIR-ATR, foram visualizadas degradações de picos característicos do espectro infravermelho de cabelo, com maior alteração identificadas nos picos 2920, 2851, 1633, 1449, 1235, 1075 e 1043 cm^{-1} , relacionados também a região da cutícula, sendo referentes principalmente ao complexo de membrana celular (CMC) e a conformação folha β . Por meio deste trabalho foi possível identificar a ação do gás ozônio em cabelo humano, que indica potencial de ação oxidativa da cutícula capilar.

Palavras-chave: Engenharia Biomédica. Gás Ozônio. Cabelo Humano. Microscopia Eletrônica de Varredura. Espectroscopia de Infravermelho.

EVALUATION OF THE EFFECTS OF OZONE GAS ON HUMAN HAIR FIBER: A PRELIMINARY IN VITRO STUDY

ABSTRACT

Among research in the health area, those involving ozone has shown great potential for applicability, however in relation to hair there are still few studies that indicate the safety of the use of ozone gas, especially in contact with the hair shaft. The objective of this work is to characterize possible physical-chemical changes that may arise in hair strands submitted to ozone gas. The analysis of ozonized hair samples involved Scanning Electron Microscopy (SEM) for physical analysis and Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) with Total Attenuated Total Reflection (ATR). Through the SEM technique, it was possible to observe aspect changes in the hair follicle, while through FTIR-ATR, degradations of peaks that are characteristic of the infrared spectrum of hair were visualized, with greater alteration identified in peaks 2920, 2851, 1633, 1449, 1235, 1075 and 1043 cm^{-1} , also related to the cuticle region, mainly referring to the cell membrane complex (CMC) and the β -sheet conformation. Through this work it was possible to identify the action of ozone gas in human hair, which indicates oxidative action potential of the capillary cuticle.

Keywords: Biomedical Engineering. Ozone Gas. Human Hair. Scanning Electron Microscopy. Infrared Spectroscopy.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo Geral	15
2.2 Objetivos Específicos	15
2.3 Justificativa	15
3. REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 Propriedades gerais da fibra capilar	17
3.2 Constituição química da fibra capilar	18
3.3 Estrutura da Fibra Capilar	21
3.4 Processos Químicos Capilares	24
3.5 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) com Refletância Total Atenuada (ATR)Microscopia Eletrônica de Varredura	27
3.6 Microscopia Eletrônica de Varredura	29
3.7 Ozônio	31
3.8 Geração de Ozônio	33
3.9 Potencial e Mecanismo de Ação do Ozônio em organismos e materiais biológicos	34
4. METODOLOGIA	36
4.1 Tipo de Estudo	36
4.2 Local e Período de Realização do Protocolo Experimental ...	36
4.3 Desenvolvimento do Aparato para Aplicação de Ozônio	36
4.4 Amostra	37
4.5 Esquema de Montagem para Aplicação de Gás Ozônio na Fibra Capilar	38
4.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	39
4.7 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) com Reflexão Total Atenuada	41

4.8 Normalização dos espectros obtidos por FTIR-ATR.....	42
5. RESULTADOS.....	44
5.1 MEV.....	44
5.2 FTIR-ATR.....	46
6. DISCUSSÃO.....	50
7. CONCLUSÃO.....	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Posição do Brasil no mercado mundial de Higiene Pessoal.....	13
Figura 2	Representação esquemática da pele humana destacando o folículo capilar.....	17
Figura 3	Reação de condensação de aminoácidos.....	19
Figura 4	Representação esquemática da proteína secundária α -hélice e folha β -pregueada.....	21
Figura 5	Ilustração das estruturas da fibra de cabelo humano.....	22
Figura 6	Subunidades da cutícula do cabelo humano.....	23
Figura 7	Estrutura hierárquica do córtex de fibra capilar.....	24
Figura 8	Esquema do processo de alisamento químico de cabelo humano.....	26
Figura 9	Esquema do mecanismo de clivagem S-S.....	26
Figura 10	Esquema comparativo entre MO e MEV.....	30
Figura 11	Montagem parcial do aparato experimental, evidenciando o a placa de aço inox vazada dentro tubo de vidro acoplado a mangueiras de silicone por meio de dois conectores de aço inox.....	37
Figura 12	Divisão dos grupos amostrais.....	38
Figura 13	Esquema de montagem para aplicação de Gás Ozônio.....	39

Figura 14	14A. Amostras de cabelo fixadas em stubs com fita dupla face de carbono, dentro da metalizadora.14B. Metalizadora Denton Vacuum Desk II utilizada no processo de Sputtering. 14C. Detector de Energia Dispersiva de Raios-x (EDS), acoplado ao Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV).....	40
Figura 15	15A. Amostra de fibra capilar prepara para processo de FTIR-ATR. 15B. Espectrômetro de infravermelho modelo Frontier usado na pesquisa.....	42
Figura 16	Imagens provenientes do microscópio eletrônico de varredura, evidenciando imagens das fibras capilares expostas ao gás ozônio. Figura 16.A apresenta amostra de cabelo virgem sem passar pelo processo de ozonização; Figuras 16.B a 16.F apresentam as amostras de cabelo processadas.....	44
Figura 17	Micrografias do microscópio eletrônico de varredura, geradas a partir de angulação vertical das amostras. Figura 17.A apresenta amostra de cabelo virgem; Figuras 17.B a 17.F apresentam as amostras de cabelo processadas.....	45
Figura 18	Espectros FTIR-UATR normalizados de 950 a 3750 cm^{-1} comparando amostras de cabelo caucasiano virgem antes e após tratamento com ozônio, em dosagens de 4, 25 e 44 mg/L por 30 minutos (18.A) e 44 mg/L por 30, 60 e 90 minutos (18.B).....	47
Figura 19	Espectros vibracionais no infravermelho normalizados na região de 3000 a 2800 (cm^{-1}), comparando amostras de cabelo caucasiano virgem antes e após tratamento com ozônio, em dosagens de 4, 25 e 44 mg/L por 30 minutos (19.A) e 44 mg/L por 30, 60 e 90 minutos (19.B).....	51
Figura 20	Espectros vibracionais no infravermelho normalizados na região de 1800 a 1350 (cm^{-1}), comparando amostras de cabelo caucasiano virgem antes e após tratamento com ozônio, em dosagens de 4, 25 e 44 mg/L por 30 minutos (20.A) e 44 mg/L por 30, 60 e 90 minutos (20.B).....	54
Figura 21	Espectros vibracionais no infravermelho normalizados na região de 1350 a 950 (cm^{-1}), comparando amostras de cabelo caucasiano virgem antes e após tratamento com ozônio, em dosagens de 4, 25 e 44 mg/L por 30 minutos (21.A) e 44 mg/L por 30, 60 e 90 minutos (21.B).....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição química do cabelo humano	19
Tabela 2	Tentativa de atribuição vibracional no infravermelho (cm^{-1}) para as bandas observadas nos espectros de cabelo humano virgem.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

18-MEA	18-metil eicosanóico
ABIHPEC	Associação Brasileira das Indústrias de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos
ATR	Refletância Total Atenuada
°C	Graus Celsius
cm	Centímetros
C	Carbono
CMC	Complexo da membrana celular
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
EPTFE	Politetrafluoretileno
FTIR	Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier
H	Hidrogênio
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HPPC	Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos
IV	Infravermelho
kV	Kilovolt
L	Litros
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
µm	Micrometros
MO	Microscópio Ótico
mg	Miligramas
N	Nitrogênio
nm	Nanômetro
O	Oxigênio (átomo)
O ₂	Oxigênio (molécula)

O ₃	Ozônio
OMS	Organização Mundial da Saúde
OSHA	Occupational Safety and Health Association
POL	Produtos de Oxidação Lipídica
ppm	Partes por milhão
S	Enxofre
TEM	Microscópio eletrônico de transmissão
UV	Ultravioleta

1 INTRODUÇÃO

Para o ser humano, o cabelo se trata de uma estrutura anexa a pele que há muito perdeu sua função biológica dentro do processo de evolução da espécie, no entanto, sua importância não pode ser subestimada em níveis emocionais e sociais (VELASCO et al, 2009). Desta forma, muitos dos estudos sobre cabelos tem sido desenvolvido com propósito de identificar produtos e protocolos que auxiliem na estética, cuidado e manutenção da fibra capilar, uma vez que há crescente interesse comercial em torno do mercado de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos (HPPC) (LIMA et al, 2019; SANTOS, 2017).

No Brasil este setor do mercado foi um dos poucos a não sofrer grandes impactos com a pandemia do Covid-19, tendo um crescimento de 2,2% contra quedas de -4,1% do PIB e -4,5% da indústria, consolidando a essencialidade dos produtos HPPC para população em geral (ABIHPEC, 2021). Tendo o Brasil ocupado o quarto lugar no ranking do mercado mundial de HPPC com uma participação de US\$ 23,8 bilhões, ficando atrás da apenas dos Estados Unidos, China e Japão (Figura 1). Sua colocação na categoria de produtos para cabelo também foi de quarto lugar (ABIHPEC, 2021).

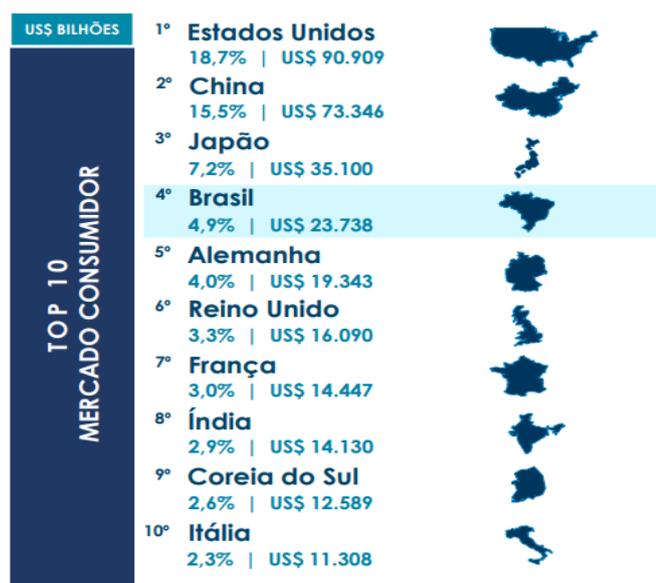


Figura 1. Posição do Brasil no mercado mundial de Higiene Pessoal

Fonte: ABIHPEC, 2021

Cientificamente o cabelo também tem sido objeto estudos em diferentes áreas como: toxicologia forense; como biomarcador de contaminantes ambientais; em investigações nutricionais; toxicologia e medicina na ação química em produtos de cuidados para cabelos, e relações com surgimento de patologias em pacientes; e na arqueologia (MAURICIO, 2019).

No entanto entre os trabalhos presentes na literatura, foram poucos os trabalhos encontrados que envolvam a associação do cabelo humano, com o gás ozônio, tal fato instigou o desenvolvimento desta pesquisa científica, visando ampliar esse conhecimento, uma vez que tal gás tem demonstrado em estudos na área da saúde, o potencial de uso por meio de óleos ozonizados, água ozonizada e até mesmo uso direto do gás ozônio na pele através de bolsas de ar, com potencial para avançar para o setor de cosméticos. Sendo um dos principais fatores na escolha do ozônio para tratamentos tanto com propriedades bactericida e fungicida, quanto com objetivo de ação antiinflamatória e cicatrizante se deve ao seu efeito oxidativo (ZENG, LU, 2018; GRECHKANYOVA et al, 2018; TRAVAGLI et al, 2010, GIULIANI et al, 2018).

Devendo, entretanto, ser ressaltado que o gás ozônio apresenta um efeito oxidante muito intenso, sua ação oxidativa é maior que do peróxido de hidrogênio (MURPHY, 2006). Na literatura atual os estudos envolvendo a análise dos efeitos oxidativos do gás ozônio na fibra capilar humana são escassos, sendo assim, a realização deste tipo de trabalho é de extrema relevância. Neste sentido, o presente estudo verificou, *in vitro*, as alterações físico-químicas da superfície da fibra capilar humana, por meio de avaliação utilizando dados de FTIR e imagens de MEV, após a exposição ao gás ozônio.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O estudo proposto teve como objetivo avaliar os resultados da interação entre amostras de cabelo humano virgem *in vitro* com o gás ozônio.

2.2 Objetivos Específicos

- Comparar a ação do gás ozônio em amostras de cabelo humano *in vitro* após aplicação de diferentes dosagens:
 - 30 min com concentração de 4 mg/L;
 - 30 min com concentração de 25 mg/L;
 - 30 min com concentração de 44 mg/L;
 - 60 min com concentração de 44 mg/L;
 - 90 min com concentração de 44 mg/L.
- Analisar as intensidades das bandas principais e as imagens microscópicas, e por meio comparativo observar as modificações ocorridas após a exposição das amostras ao gás ozônio.

2.3 Justificativa

Com o crescente uso do gás ozônio na área da saúde, empresas que trabalham com produtos e equipamentos na área da estética e cosmética, vêm demonstrando interesse em desenvolver protocolos de uso do gás ozônio que se enquadrem em seu mercado, sendo a terapia capilar uma das áreas alvo destas empresas.

Entretanto entre os estudos presentes na literatura, poucos abordam a interação entre o gás ozônio e as fibras de cabelo humano, sendo boa parte dos estudos encontrados pertencentes a pesquisas com foco em análise

atmosférica. O gás ozônio apresenta um efeito oxidante muito intenso, sua ação oxidativa é maior que do peróxido de hidrogênio.

Além disto, se fazem necessários mais estudos com cabelo humano que tenham caráter científico, e não estejam vinculadas a fins puramente comerciais, para que ocorra maior imparcialidade na divulgação dos resultados, sendo neste contexto que este trabalho de investigação sobre a interação do cabelo humano com gás ozônio, se faz importante.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Propriedades gerais da fibra capilar

A fibra capilar humana é constituída de matéria morta e apresenta diâmetro de 50-100 μm , estando distribuída por quase toda superfície do corpo humano, com exceção das palmas da mãos e sola dos pés. O folículo capilar está enraizado na epiderme em uma região dentro da derme (Figura 2), se desenvolvendo a partir do crescimento oblíquo ou curvado de células epidérmicas presentes em sua base, onde também ocorre o processo de síntese de proteínas bem como o alinhamento estrutural e a queratinização, que transformam o citoplasma na fibra capilar (HARRIS, 2009; BHUSHAN, 2008; WOLFRAM, 2001).

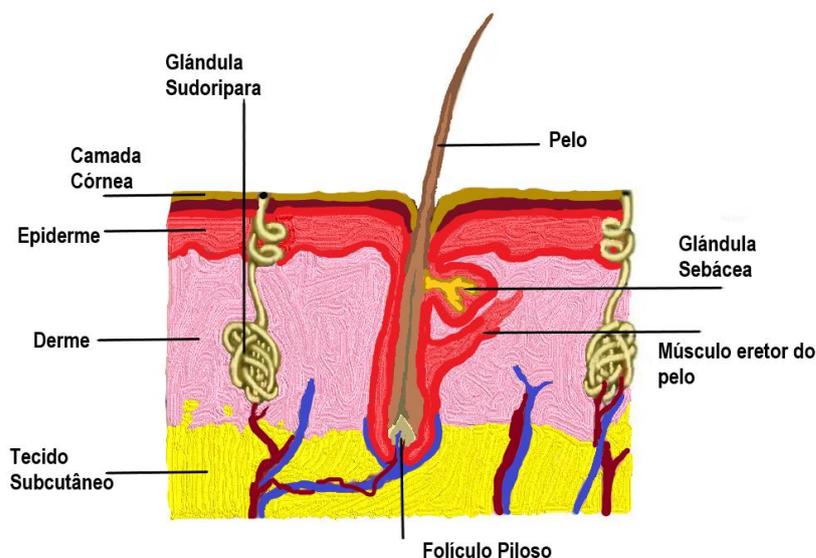


Figura 2. Representação esquemática da pele humana destacando o folículo capilar

Fonte: Adaptado de SISTEMA TEGUMENTAR

O ser humano possui em média de 90 mil a 150 mil folículos distribuídos de forma irregular pelo organismo, os folículos presentes no couro cabeludo são chamados de pelos terminais, crescem em média 1 cm/mês (0,37 mm/dia), com uma perda média de 50 a 100 fios por dia (MAURICIO, 2019; HARRIS, 2009)

O desenvolvimento da fibra capilar é um processo cíclico e dinâmico que depende não só do local em que ela cresce, mas também é influenciado por questões como idade, hábitos nutricionais e fatores hormonais, que podem afetar tanto positivamente quanto negativamente no crescimento dos fios, cujo número total já é determinado desde o momento em que nascemos, com regeneração permanente da fibra ao longo de nossa vida, passando por cerca de vinte ciclos completos (HARRIS, 2009; WOLFRAM, 2001).

3.2 Constituição química da fibra capilar

O cabelo humano se trata de um polímero natural composto principalmente de proteínas estruturais fibrosas chamadas de queratinas, que se organizam em forma de duas hélices enroladas combinadas com outras, formando fibrilas (NAKANO, 2006; WILKINSON & MOORE, 1990). O cabelo se desenvolve a partir de cavidades presentes na pele humana denominadas folículos pilosos. É neste folículo que ocorrem os processos de desenvolvimento e a queratinização da fibra capilar, ou seja, a transformação de grupos sulfídricos em ligações de dissulfeto (ROBBINS, 2001).

A queratina se trata de um polipeptídeo com elevado peso molecular, que contém cadeias compostas a partir da condensação de L-aminoácidos (Figura 3). As queratinas são divididas em duas classes, as alpha-queratinas e as beta-queratinas. As alpha-queratinas são relativamente ricas em resíduos de cistina e possuem a maioria dos aminoácidos comuns, sendo um material proteico insolúvel responsável por mais de 85% da estrutura capilar, é formada por cadeias peptídicas arranjadas em paralelo, interagindo entre si por ligações cruzadas de três tipos diferentes, sendo eles; ligações de cisteína, iônicas e de hidrogênio (LEHNINGER, 1976; VILLA et al., 2008; HALAL, 2011). Já as beta-queratinas podem ser encontradas principalmente em fibras produzidas por aranhas, nas escamas, em conchas e nos bicos de pássaros e répteis (LEHNINGER, 1976).

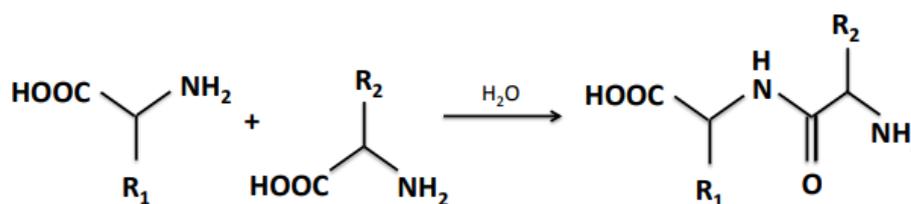


Figura 3. Reação de condensação de aminoácidos.

As alpha-queratinas ainda são divididas em dois tipos, as moles que contêm cerca de 10 a 14% de cistina, e as duras que possuem um teor de cistina mais elevado, chegando até 22%. Os dois tipos estão presentes na estrutura dos folículos pilosos, onde a queratina mole recobre a pele de forma generalizada enquanto a dura é encontrada nos anexos como a cutícula e o córtex da haste capilar (LEHNINGER, 1976; HAM & CORMACK, 1983).

Dentre os 20 aminoácidos que podem ser encontrados na natureza, 18 fazem parte da composição de uma extensa estrutura polimérica condensada, conhecida como polipeptídeos, que ocorre devido à ligação entre o grupo ácido de um aminoácido com o grupo amino do outro. Os 18 aminoácidos presentes nos polipeptídeos, se repetem e interagem entre si, de modo que os diferentes tipos de queratina dependem de como estão distribuídos os aminoácidos, além das diferenças estruturais e morfológicas (MOITA, 1989). A tabela 1 apresenta a composição química do cabelo humano, cutícula e córtex de todos os aminoácidos presente na fibra capilar.

Tabela 1. Composição química do cabelo humano

AMINOACIDOS	CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{m/g}$)		
	CABELO	CUTÍCULA	CORTEX
Ácido aspártico	339	300	416
Ácido Cistínico	32	59	27
Ácido Glutâmico	916	848	930
Alanina	347	836	368
Arginina	466	289	496
Cisteína	1435	1880	1350
Fenilalanina	124	115	126

Glicina	437	836	368
Histidina	62	53	65
Isoleucina	174	186	172
Leucina	457	404	466
Lisina	196	331	172
Metionina	13	39	9
Prolina	588	900	532
Serina	967	1628	850
Tirosina	158	134	162
Treonina	554	412	580
Valina	405	644	374

Fonte: Adaptado de MOITA, 1989

A estrutura das proteínas é incrivelmente complexa, sendo necessário conhecimento de seus vários níveis de organização para que se possa elaborar estudos. As Proteínas secundárias apresentam arranjos tridimensionais com dobramentos regulares. Tal estrutura é estabilizada através de pontes de hidrogênio e oxigênio de ligação peptídica próxima (-NH...O=C-). As numerosas pontes de hidrogênio entre as ligações peptídicas possuem grande responsabilidade na estabilização da estrutura secundária. Existem dois tipos de estruturas secundárias: α – hélice e folha β pregueada (YAO et al., 2006).

Na estrutura secundária α – hélice a molécula polipeptídica se apresenta em formato de hélice alinhada como se estivesse em torno de um cilindro, esta estrutura é mantida por pontes de hidrogênio distribuídas entre os grupos C=O e o H-N das ligações peptídicas. Já a estrutura Folha β pregueada se trata de uma estrutura decorrente da formação de pontes de hidrogênio entre duas ou mais cadeias polipeptídicas adjacentes. Tais pontes de hidrogênio ocorrem entre os grupos C=O e N-H de ligações peptídicas que pertencem a cadeias polipeptídicas vizinhas (YAO et al., 2006; McKEE & McKEE, 2003). Ambos os tipos de estruturas podem ser vistos na figura 4.

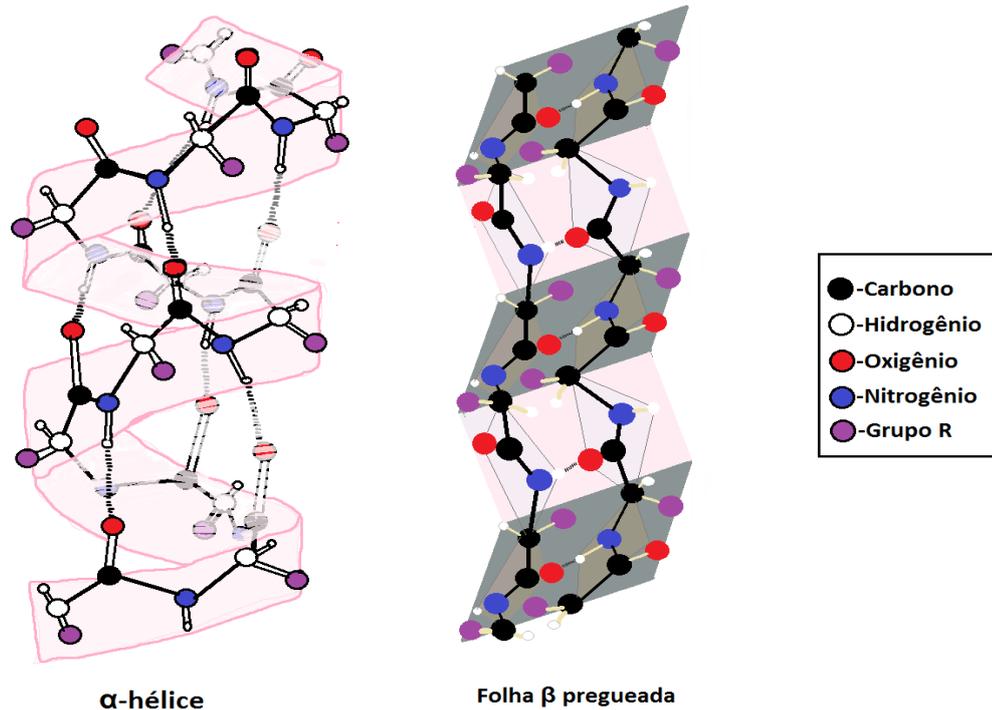


Figura 4. Representação esquemática da proteína secundária α -hélice e folha β -pregueada.

Fonte: Adaptado de McKEE & McKEE, 2003

A composição do cabelo ainda pode ser dividida em seus cinco principais elementos, que são referidos como: C. O. H. N. S., que podemos classificar como: carbono (C) com 51%; oxigênio (O) com 21%; nitrogênio (N) com 17%; hidrogênio (H) com 6%; enxofre (S) com 5%. Já os minerais presentes na fibra capilar, apesar de possuem teor relativamente baixo, também possuem sua importância, uma vez que sua ausência pode arretar na queda e alteração da coloração da fibra capilar (HALAL, 2011).

3.3 Estrutura da Fibra Capilar

A haste da fibra capilar tem sua estrutura constituída por 3 estruturas, sendo elas; cutícula, córtex e medula. Onde a cutícula encobre a região mais externa da fibra, o córtex representa maior parte dela e a medula possui a menor parte da fibra (podendo nem estar presente) e fica na região mais interna desta (VELASCO et al, 2009; ROBBINS, 2001), representação esquema dessa estrutura pode ser vista na figura 5.

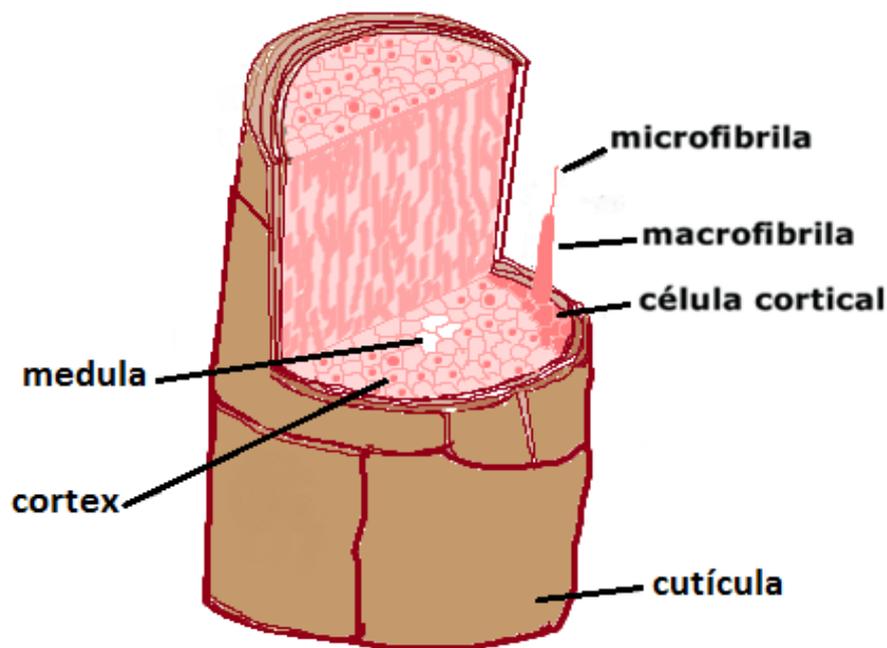


Figura 5. Ilustração das estruturas da fibra de cabelo humano
 Fonte: Adaptado de ROBBINS, 2001

A principal barreira de proteção da haste capilar é a sua cutícula, responsável por proteger a região interna contra a penetração de agentes químicos e enzimáticos, além de definir as propriedades superficiais da fibra. A cutícula é constituída de 5 a 10 camadas de células em forma de escamas que ficam sobrepostas entre si, podendo medir de 350 a 450 nm de espessura (VELASCO et al, 2009; FEUGHELMAN, 2002; DRAELOS, 2000). Cada camada sua ainda é dividida em quatro subunidades (Figura 6), sendo elas:

- **Epicutícula:** A mais fina e externa das subunidades presentes na cutícula, possui caráter hidrofóbico e seu teor de cistina está em torno de 12%.
- **Camada A:** É a subunidade com maior teor de cistina, maior de 30%, sendo a mais resistente a ataques externos.
- **Exocutícula:** Possui teor de cistina de 15% e ocupada 55% da área da cutícula.

- **Endocutícula:** Camada mais internada, tem o menor teor de cistina (~3%), sendo pouco resistente e podendo inchar ao absorver água (VELASCO et al, 2009).

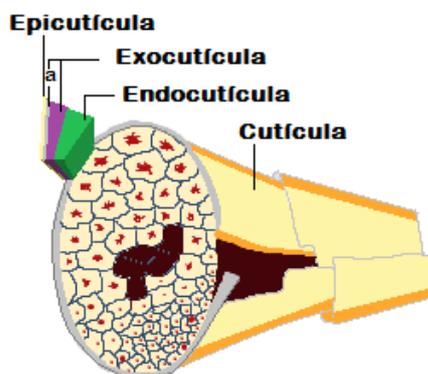


Figura 6. Subunidades da cutícula do cabelo humano
 Fonte: Adaptado de POPESCU & HOCKER, 2007.

A região entre as "escamas" da cutícula é preenchida ainda por uma fina camada de lipídios, estes lipídeos são separados por uma camada de componentes proteicos, tal estrutura entre células adjacentes é chamada de complexo da membrana celular (CMC). CMC é a única estrutura presente em todos os espaços intercelulares de fibra capilar, sendo assim considerado um caminho para penetração de substâncias no cabelo humano (INOUE, IWAMOTO, OHTA, 2005; BHUSHAN, 2010).

O córtex se localiza no interior da fibra, e é o maior constituinte desta, podendo chegar a ser responsável por 90% do volume dela (SAKAI, KIKUCHI, FUJII, 2013), ele é responsável pelas propriedades de resistência e elasticidade da fibra capilar, é composto por estruturas alongadas e paralelas que percorrem toda direção da fibra, estas estruturas por sua vez são formadas por microfibrilas de 0,1 a 0,4 μm de diâmetro (Figura 7), as microfibrilas são constituídas pelas microfibrilas e pela matriz amorfa que envolve elas, e as microfibrilas são feitas por protofibrilas, compostas de cadeias polipeptídicas de conformação α – hélice (SANT'ANNA, 2000; PAULA, 2001; ABRAHAM, 2009).

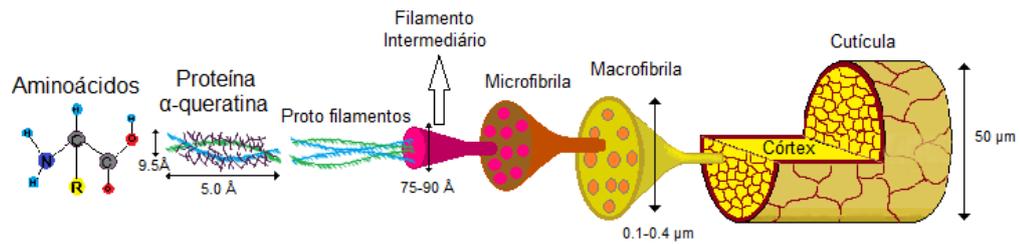


Figura 7. Estrutura hierárquica do córtex de fibra capilar
 Fonte: Adaptado de YANG, ZHANG, RHEINSTÄDTER, 2014.

No córtex também estão os grânulos de melanina, responsáveis pela coloração do cabelo humano, além de oferecerem fotoproteção para fibra, estes grânulos são produzidos por células conhecidas como melanócitos ainda dentro do bulbo capilar. A melanina é composta de dois pigmentos: eumelanina e feomelanina, sendo a eumelanina responsável por conferir tons mais escuros como marrom e preto, e a feomelanina responsável por pigmentos amarelados e avermelhados (MOITA, 1989; TOBIN, 2006; DARIO, 2016).

A medula está localizada na região central da fibra capilar, sendo a menor das 3 estruturas da fibra, ela pode se apresentar de forma contínua ao longo da fibra, fragmentada ou até mesmo ser inexistente (ocorrendo mais comumente em fibras mais finas), ela possui pouco teor de cistina e se comparada com a cutícula e o córtex, é rica em lipídios. Há estudos que sugerem que a medula possua baixa importância nas propriedades da fibra capilar (ROBBINS, 2001; WAGNER, 2006; MIRANDA-VILELA, BOTELHO, MUEHLMANN, 2014)

3.4 Processos Químicos Capilares

O cabelo é conhecido como uma das características físicas do corpo que podemos mudar com mais facilidade, contudo processos como coloração, descoloração, alisamento e permanente, também são conhecidos por induzir mudanças na cutícula e córtex do cabelo, destruindo parte de sua estrutura. A maioria dessas mudanças ocorrem por meio de reações oxidativas (MAURICIO, 2019; TRUEB, 2015).

O processo de alisamento pode ocorrer de duas formas, alisamento térmico (temporário) ou químico (permanente). Durante o processo de alisamento térmico, o calor utilizado é capaz de desfazer momentaneamente algumas interações moleculares, assim desmanchando as estruturas de α -hélices presentes córtex, que assumem então a forma de folha- β -pregueada, este processo é chamado de desnaturação. Este fenômeno é conhecido como transição $\alpha \rightarrow \beta$ -queratina e é responsável pela maior mobilidade e fluidez das proteínas do cabelo, deixando-os lisos (OLIVEIRA, 2013). O alisamento químico também chamado de permanente, é a outra forma de se alterar a forma física dos cabelos, ele consiste em fazer as mesmas alterações nas estruturas proteicas do córtex, mas age quimicamente quebrando as interações intermoleculares por oxirredução e reorganizando-as (HALAL, 2011). A princípio este processo reduz a queratina em meio básico (hidróxido de sódio, hidróxido de lítio, amônia, tioglicolato de amônio ou guanidina) por meio de um agente redutor (grupo mercaptano ou sulfeto), rompendo as ligações dissulfídicas (Figura 8). Então é realizada a neutralização para cessar a redução da queratina, por meio de uma solução ácida (ácido tioglicólico) e um agente oxidante (peróxido de hidrogênio), recuperando as interações dissulfídicas, agora organizadas em folha- β . Uma alternativa utilizada para a impermeabilização do cabelo e por meio de formol, glutaraldeído, para assim evitar que ocorra a conversão da estrutura β em α , este processo apesar de perigoso para o indivíduo, é utilizado por gerar maior durabilidade (OLIVEIRA, 2013).

O uso de alisamentos capilares é descrito na literatura como responsável pela perda da camada monomolecular de ácidos graxos covalentemente presentes na cutícula, estando incluso o ácido 18-metil eicosanóico (18-MEA). Tal camada hidrofóbica atrasa a penetração de água na fibra capilar e evitando assim a alteração de suas propriedades físicas, de forma que a remoção desta camada resulta em fibras mais suscetíveis à eletricidade estática e ao frizz quando induzidas pela umidade, além de perda de brilho do cabelo, como citado em Miranda-Vilela et al (2014).

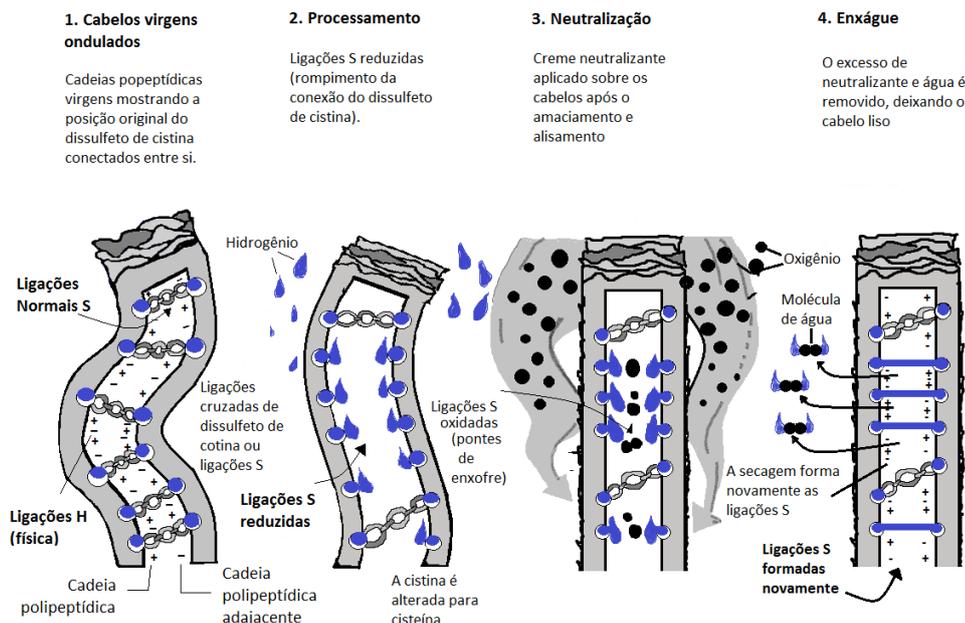


Figura 8. Esquema do processo de alisamento químico de cabelo humano.
 Fonte: Adaptado de HALAL, 2011.

Tanto em colorações permanentes e temporárias quanto para descoloração do cabelo, a fibra capilar é clareada por um processo de oxidação, que ocorrem pela aplicação da mistura de tinturas ou pó descolorante com água oxigenada de 10, 20, 30 ou até 40 volumes, onde o termo volume é referente ao volume de gás oxigênio liberando quando o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), presente na água oxigenada, se decompõe (HALAL, 2011). Uma consequência que pode ocorrer do processo de descoloração, são os danos oxidativos como efeito secundário na queratina dos cabelos, tal dano ocorre em função da clivagem oxidativa das ligações dissulfeto para formar o ácido cistéico, como pode ser visto na figura 9 (JACHOWICZ, 1987; JHONSON, 1997).

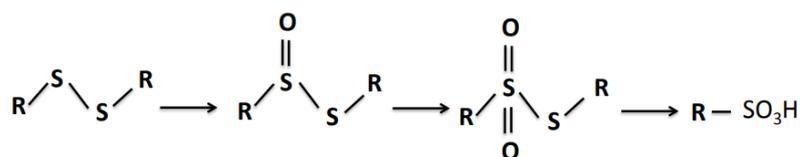


Figura 9. Esquema do mecanismo de clivagem S-S

Como já mencionado, descoloração utiliza como principais agentes o peróxido de hidrogênio e os persulfatos, que compõem o pó descolorante, principalmente de amônio e potássio, responsáveis por eliminar pigmentos naturais dos cabelos. Os persulfatos em ação conjunta com o peróxido de hidrogênio produzem uma descoloração mais rápida (MONTEIRO, 2003). Para que o processo de descoloração ocorra, é necessário que haja levantamento das cutículas, porém ao se executar tal processo de forma repetitiva, resulta-se com que as cutículas não sejam mais capazes de retornarem a posição inicial permanecendo levantadas, resultando assim em haste capilares mais porosas, fracas, frágeis e com pouquíssimo brilho (GRAY, 2007).

A clivagem oxidativa da ligação dissulfeto no processo de clareamento químico da fibra capilar ocorre através da clivagem S-S. Este tipo de clivagem gera principalmente produtos como ácido cistéico ou sulfônico (-SO₃H), mas também produz intermediários de oxidação como o monóxido de cistina (-SO-S-) e o dióxido de cistina (-SO₂-S-) (ROBBINS, 1971). A concentração da solução de peróxido de hidrogênio responsável pela clivagem oxidativa em fibra capilar é uma das menores utilizadas pelo homem, sendo menor que 8% (MATTOS et al, 2003).

Uma das formas de se identificar este tipo de clivagem oxidativa é por meio da espectroscopia na região do infravermelho (FTIR), onde estudos tem demonstrado o potencial do FTIR de apontar por meio de determinadas bandas de absorbância quando as amostras de cabelo passaram por estes tipos de clivagens (BARTON, 2011). Além disso, o dano causado pelo processo de descoloração aumenta, a porosidade resultante do desgaste infligido a camada de cutícula, e tal dano pode ser notado por meio da técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura.

3.6 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) com Refletância Total Atenuada (ATR)

A espectroscopia no infravermelho (IV) é obtida de duas formas, emissão ou absorção, sendo absorção a forma mais utilizada. A radiação IV é emitida por uma fonte de laser, então a radiação atravessa a amostra para depois ser analisada por um detector apropriado. A partir da análise da interação radiação-amostra, é gerado um espectro molecular de absorção e transmissão, criando um tipo de impressão digital molecular da amostra estudada. Cada espectro produzido tem suas diferenças, mesmo que mínimas, tornando a espectroscopia no infravermelho útil para vários tipos de análises (ILHARCO, 1998; SILVERSTEIN, BASSLER, MORRILL, 1991; SMITH, 1998; SOLOMONS, FRYHLE, 2001).

Barton (2011) desenvolveu em seu trabalho a análise de diferentes tipos de cabelo, onde fez uso da espectroscopia na região do IV com Refletância Total Atenuada (ATR), e identificou as principais bandas existentes bem como pode apontar as mudanças na estrutura em detrimento dos processos químicos aos quais as amostras foram submetidas. O autor demonstrou ainda a diferença entre os espectros provenientes de diferentes técnicas, observando assim vantagens do método ATR perante outros, pode apontar entre eles:

- Os espectros obtidos apresentaram maior qualidade;
- Não houve perda de informação estrutural química, ao contrário do que ocorre com técnicas diferentes, identificando elementos tanto da superfície (cutícula) quanto de regiões periféricas (córtex);
- Demonstrou ser uma técnica com maior economia de tempo;
- O preparo das amostras ocorre de forma simples e não destrutiva.

O uso da técnica de FTIR-ATR é caracterizado por ser uma espectroscopia de reflexão interna, onde a amostra é colocada em contato com um elemento de reflexão interna que apresenta alto índice de refração, deste modo, a radiação atravessa o elemento de reflexão e finalmente é refletida e direcionada para o detector conveniente. Devido ao seu modo de obtenção de espectros, esta técnica é muito difundida para uso com amostras de difícil manuseio (HIND; BHARGAVA; McKINNON, 2001; SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002; MENDHAM et al, 2002).

Usualmente os elementos de reflexão interna usados pela técnica ATR se tratam de cristais feitos de materiais que têm altos índices de refração, além de baixa solubilidade em água, sendo eles; o seleneto de zinco (ZnSe), o germânio (Ge), iodeto de tálio (KRS-5) e o diamante (MENDHAM et al, 2002). Embora a reflexão interna total aconteça entre a amostra e o elemento de reflexão, a radiação, que também é denominada como onda evanescente, só penetra de forma efetiva na amostra até uma curta distância, onde então é absorvida. Deste modo, o espectro de absorção de uma amostra em contato com elemento de reflexão pode ser obtido e variar conforme os parâmetros a seguir: ângulo de incidência (θ), índice de refração dos materiais do elemento de reflexão interna (n_1), e da amostra (n_2).

3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura

Imagens produzidas por meio da microscopia eletrônica de varredura fazem uso da incidência de um feixe de elétrons em uma amostra, estando essa sob condição de vácuo, por meio de um filamento capilar de tungstênio, em detrimento da aplicação de uma diferença potencial (de 0,5 a 30 kV), possibilitando assim a aceleração de elétrons e o aquecimento deste filamento, gerando a emissão de elétrons secundários e a radiação da emissão por emissão de elétrons retro espalhados, permitindo que se tenha dados sobre a amostra. Para que essa emissão de elétrons ocorra, é importante que a amostra seja previamente vaporizada com uma fina camada de metal pesado (ouro, pó de carbono, platina etc.), esse processo é chamado de sputtering, e serve para aumentar a capacidade de reflexão da amostra. As variações na topografia da amostra afetam o padrão de dispersão dos elétrons, de forma que as depressões aparecem com imagens escuras e as elevações, mais claras, o que gera o efeitos tridimensional das imagens virtuais, produzidas no monitor a partir da transcodificação da energia emitida pelos elétrons (GAMA, 2010; SILVA, 2012).

Quando comparado com outros métodos de microscopia, o MEV apresenta atributos que tornam ele um instrumento mais vantajoso na análise de fibras de cabelo humano, visto que apresenta melhor resolução que o microscópio óptico (MO) e maior facilidade no preparo de amostras que o TEM (MALISKA, 2014). Na figura 10 é possível observar o esquema comparativo entre o MO e o MEV.

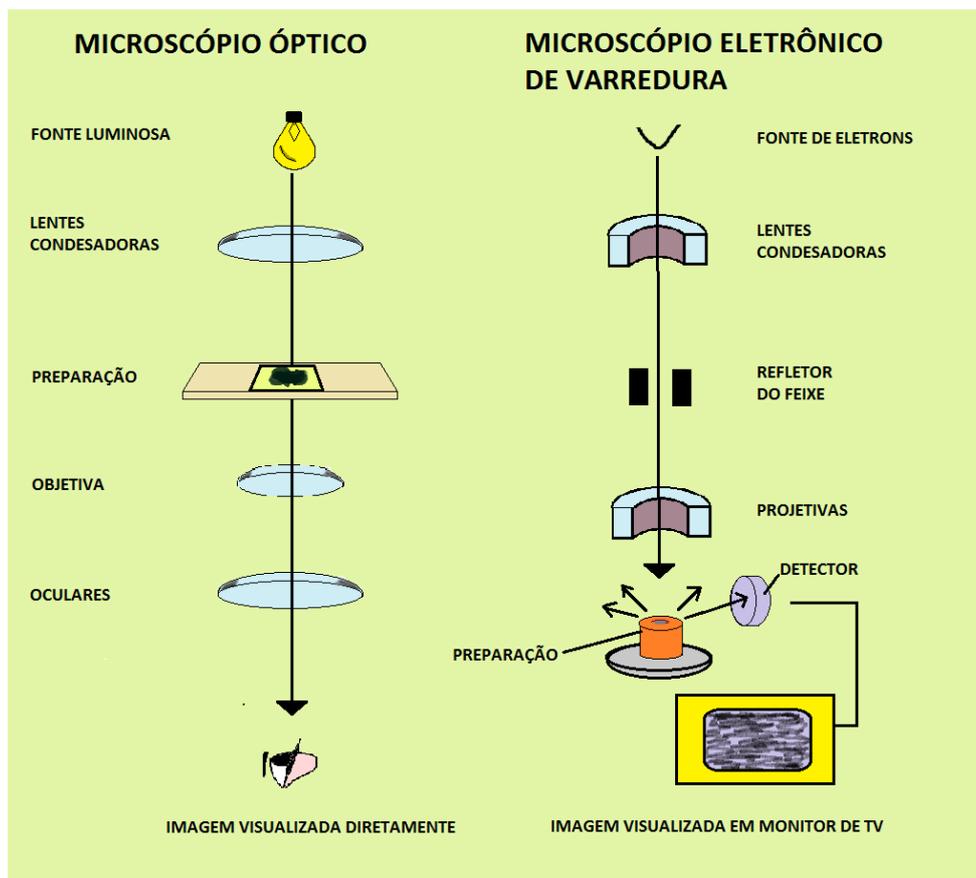


Figura 10. Esquema comparativo entre MO e MEV.
Fonte: Adaptado de CASTRO, 2002

O MEV demonstrou grande potencial na análise de superfície do cabelo, uma vez que através dele é possível se ter uma ideia sobre a extensão dos danos da cutícula bem como o número de escamas visíveis, possibilitando inclusive que se identifique espaços (se existir) entre as células que se sobrepõem (BELLARE et al., 2001).

3.7 Ozônio

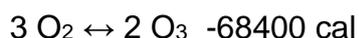
A primeira interação humana com o ozônio por meio de experimentos ocorreu em 1785, quando o físico e filósofo holandês Martin van Marum (1750-1837) submeteu o oxigênio as descargas elétricas geradas por uma máquina eletrostática, sem perceber o físico estava “gerando” ozônio, o qual descreveu como “odor de matéria elétrica” sem maiores investigações sobre o ocorrido (CROSLAND, 1970). O ozônio só veio a ser formalmente descoberto em 1840 por Christian Friedrich Schönbein (1799-1868), que trabalhava repetindo o experimento de van Marum, com uma pilha voltaica na presença de oxigênio, a pilha então formou o arco elétrico que gerou uma descarga, fazendo surgir um gás com um cheiro pungente característico, que Schönbein nomeou de ozônio (do grego ὄζειν “ozein” – cheiro) (SCHÖNBEIN, 1840).

O primeiro gerador de ozônio foi construído quase vinte anos depois em 1857, pelo inventor alemão Weber von Siemens, na época o gerador se tratava de um tubo de superindução, formado por duas placas de eletrodo interpostas com alta tensão que gerava o ozônio quando estivesse na presença de oxigênio (BOCCI, 2011).

O ozônio (O_3) também pode ser encontrado na estratosfera terrestre, onde ele atua como uma camada protetora, de forma similar a uma película, absorvendo parte da radiação ultravioleta (UV) que é emitida pelo Sol nos comprimentos de onda entre 100–280 nm (CHAPMAN, 1930), desta forma oferecendo proteção aos organismos no planeta (BOCCI, 2011). Na região da estratosfera o ozônio é gerado naturalmente por meio dos raios UV que incidem sobre o oxigênio ambiente, sendo que uma série de fatores, como temperatura e pressão, agem influenciando para o O_3 se decompor rapidamente através da reação exotérmica (baseado no curto tempo de meia-vida; 40 minutos a 20–25 °C), em moléculas de oxigênio (O_2) e em subprodutos com um grande potencial oxidativo (BOCCI, 2011).

O composto ozônio se trata de uma forma alotrópica do elemento oxigênio, formado por 3 átomos de oxigênio ligados covalentemente, este gás tem uma suave cor azul-celeste com um cheiro acre e pungente, e é formado a

partir de oxigênio puro (O₂) por meio de um processo endotérmico permitido (BOCCI, 2011). O ozônio apresenta massa molecular de 48 g/mol em comparação a molécula diatômica de oxigênio, com massa molecular de 32 g/mol, apresenta forma cíclica com distância entre os átomos de 1,26 Å, um ângulo de 116,8 ° entre os seus átomos e vários efeitos mesoméricos em equilíbrio dinâmico.



Nota-se que a reação de geração do gás ozônio é reversível, uma vez que o ozônio se decompõe espontaneamente, o que o torna dificilmente armazenável. O tempo de decomposição da molécula de ozônio está ligado com a temperatura ambiente em que ele se encontra, de forma que a 20 °C a concentração de ozônio chega a ser reduzida à metade em 40 min, enquanto a 30 °C a mesma redução ocorre em 25 min, mas a -50 °C é reduzida à metade, mas lentamente, chegando a ocorrer apenas após três meses (BOCCI, 2011).

O limite mínimo para percepção de odor de ozônio é de cerca de 0,01 ppm, sendo que o limite de exposição definido pela Administração de Segurança e Saúde Ocupacional (*Occupational Safety and Health Administration* - OSHA), é de 0,1 ppm ao longo de um dia de 8 horas, e 5 dias/semana para exposição humana, enquanto para a OMS (Organização Mundial da Saúde), a exposição ocupacional máxima indicada é de 0,06 ppm durante 8 horas de trabalho. Sendo importante frisar que, por se tratar de um gás extremamente reativo e instável, é necessário que seja produzido e consumido de imediato, visto que se degrada, voltando espontaneamente à forma de O₂ (BOCCI, 2011).

Para que o gás ozônio seja gerado, o equipamento gerador utiliza um sistema definido como ozonizador de descarga corona, onde o ozônio é formado a partir do momento em que o oxigênio escoar através de um espaço entre dois eletrodos metálicos submetidos à alta tensão elétrica, essa tensão elétrica cria um campo de alta energia que é denominado de corona. A energia da descarga elétrica neste campo promove a quebra das moléculas de

oxigênio (O_2) em átomos de oxigênio (O), e a presença de uma quantidade excessiva de moléculas de O_2 que são quebradas, forma a molécula de O_3 . Por fim a concentração final de ozônio é inversamente proporcional ao fluxo de oxigênio, de modo que quanto maior for o fluxo de oxigênio, menor será a concentração de ozônio (BOCCI, 2011).

3.7.1 Geração de Ozônio

Para geração de ozônio com fins terapêuticos é importante que seja feito uso de oxigênio puro, visto que a utilização de ar ambiente tende a gerar subprodutos, como o dióxido de nitrogênio (NO_2) – que é altamente reativo com o tubo de descarga corona e com os sistemas biológicos, sendo tóxico para o organismo humano (BOCCI, 2011).

Os componentes a serem utilizados como parte do sistema do gerador de ozônio devem ainda ser constituídos de materiais de alta qualidade e resistentes a oxidação, como por exemplo o aço inoxidável, titânio, EPTFE entre outros materiais similares, de forma que seja garantida sua compatibilidade, evitando que qualquer material ou subproduto indesejado venha a ser gerado a partir da corrosão oriunda da oxidação produzida no processo de produção do gás (BOCCI, 2011).

O gás ozônio proveniente do gerador costuma ter sua concentração expressa em mg/L, podendo também ser em $\mu\text{g/mL}$, com alguns fabricantes especificando em g/m^3 , há também reportes de concentração expressa em ppm, sendo que $1 \text{ ppm } O_3 = 0,002 \mu\text{gO}_3/\text{mL}$ (BOCCI, 2011).

Para que se possa especificar a dosagem do gás ozônio num sistema, um dos métodos utilizados é por meio do cálculo da quantidade em massa de ozônio entregue ao sistema (RAKNESS et al., 1996), através da concentração de ozônio (C) [$\mu\text{g/mL}$ ou mg/L] multiplicada pela taxa de fluxo de gás Q [L/min], resultando assim na taxa de produção de ozônio (T_{O_3}), em massa por tempo [mg/min], sendo:

$$T_{O_3} = C \times Q$$

Quando se obtém o tempo (t) [min ou h] de exposição ao gás ozônio, é possível expressar a quantidade de ozônio em massa (m_{O_3}) [mg ou g] inserida no sistema, assim:

$$m_{O_3} = T_{O_3} \times t$$

A Dosagem de Ozônio Aplicada também pode ser expressa em mg/cm² (VAN LEEUWEN, 2015), ao se dividir a quantidade de ozônio em massa (m_{O_3}) pela área da superfície exposta ao gás ozônio, dada em cm².

3.7.2 Potencial e Mecanismo de Ação do Ozônio em organismos e materiais biológicos.

O uso do gás ozônio em organismos vivos tem crescido através de inúmeras aplicações biológicas, que tem sido experimentadas e relatadas no ambiente cientificamente ao redor do mundo sob a denominação de ozonioterapia. Mas os primeiros relatos de aplicação com cunho terapêutico do ozônio surgiram durante a 1.^a Guerra Mundial, onde seu uso foi feito no tratamento de gangrena em soldados alemães, tendo sido motivado pela falta de antibióticos e pelas suas propriedades desinfetantes, essas mesmas propriedades também possibilitaram seu uso em mais de 3000 estações de tratamento de água no mundo todo (BOCCI, 2011).

O ozônio é considerado o maior potente entre os germicidas naturais conhecidos pelo homem, ele possui capacidade de eliminar vírus, bactérias, protozoários e fungos com alta eficiência e rapidez (RICKLOFF, 1987; BOCCI, 1993). Seu potencial oxidativo é maior que do peróxido de hidrogênio e do ácido peracético (MURPHY, 2006), conhecidos por sua atividade antimicrobiana contra uma ampla gama de organismos, onde mesmo soluções com concentrações de 3% peróxido de hidrogênio já garantem rápida ação bactericida (McEVOY; ROWAN, 2019).

O ozônio apresenta grande flexibilidade em suas formas de ser administrado, podendo ser feita a administração por meio de diversas vias,

como por exemplo, intramuscular, subcutânea, intraperitoneal, intravenosa (auto-hemoterapia maior e menor, mas não o gás diretamente), intrapleural, intradiscal, insuflação retal e vaginal, tópico, miofascial (ZÂNGARO, FERNANDES, LIMA, 2014) entre vários outros meios. O ozônio, por se tratar de um oxidante potente, pode reagir imediatamente com uma grande série de moléculas que estão presentes em fluidos biológicos, mais especificamente com antioxidantes, proteínas, hidratos de carbono e, preferencialmente, ácidos graxos poli-insaturados. Essa reação das moléculas de ozônio com tantas outras moléculas acaba implicando em dois processos fundamentais: a primeira reação é importante pois gera espécies reativas de oxigênio (ERO), responsáveis por desencadear várias vias bioquímicas; já a segunda reação é conhecida como peroxidação de lipídios, ela gera o peróxido de hidrogênio e uma variedade de aldeídos conhecidos como produtos de oxidação lipídica (POL) (BOCCI, 2011).

Um dos mecanismos mecanismo de ação do gás ozônio no processo de inativação de microrganismos começa pela já citada formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), a partir disso ocorre a peroxidação dos ácidos graxos poliinsaturados que estão presentes principalmente na membrana celular. Sendo os peróxidos e as espécies reativas de oxigênio os responsáveis pela danificação da integridade da parede celular e membrana citoplasmática. Os peptídeos solúveis, assim como a glutathiona e proteínas em bicamadas lipídicas fornecem alvos potenciais para o ozônio. A peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados dá origem a produtos solúveis em água, como aldeídos e peróxidos que se difundem no citosol e iniciam a oxidação de aminoácidos e proteínas (MEHLMAN; BOREK, 1987).

4. METODOLOGIA

4.1 Tipo de estudo

Foi realizado um estudo *in vitro* utilizando as técnicas de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) Espectroscopia na faixa do Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) com Reflexão total atenuada (ATR), com o objetivo de identificar e avaliar alterações físico-químicas na estrutura de fibras de cabelo humano submetidas ao contato com o gás ozônio.

4.2 Local e Período de Realização do Protocolo Experimental

O protocolo experimental de ozonização foi realizado no Centro de Inovação, Tecnologia e Educação (CITÉ), utilizando os Laboratórios: Biotecnologia e Desinfecção e Esterilização. Os protocolos de FTIR-ATR e MEV foram realizados nos laboratórios de Plasmas e Processos do Instituto de Engenharia Espacial e Laboratório de Materiais do Instituto Nacional de Pesquisa Espacial, respectivamente.

Os ensaios foram realizados entre os meses de maio a setembro/2021.

4.3 Desenvolvimento do Aparato para Aplicação de Gás Ozônio

Devido ao alto poder oxidativo deste gás, foram definidos diversos materiais altamente compatíveis (inertes) ao ozônio, tais como silicone, vidro, aço inoxidável entre outros, que pudessem ser utilizados durante os processos de ozonização, evitando reações e gerações de subprodutos no processo que poderiam gerar interferência no protocolo proposto. Inicialmente foi confeccionado, no Laboratório de Apoio Mecânico do CITÉ, um suporte em forma chapa de aço inoxidável vazada no meio para acomodação das amostras de cabelo humano, de forma que houvesse espaço para o gás circular entre as fibras capilar. Além disso, foi realizada a montagem de conectores em aço inoxidável, com o intuito de garantir a vedação entre o cilindro de vidro e as mangueiras específicas (figura 11).



Figura 11. Montagem parcial do aparato experimental, evidenciando o a placa de aço inox vazada dentro tubo de vidro acoplado a mangueiras de silicone por meio de dois conectores de aço inox.

4.4 Amostra

As amostras de cabelo humano utilizadas foram virgens na cor castanho (Perucaria™), separadas em fios de 15 cm e aproximadamente 2g, e foram lavadas com solução de 10% de Lauril éter sulfato de sódio (LESS) (Bianquímica™) e depois separadas em fio a fio, em uma tela de nylon para perucas, divididas em seis grupos (Figura 12).

Grupo 1 (CTE): Controle: Amostras de cabelo virgem sem processamento químico;

Grupo 2 O₃ 4 30: Cabelo humano exposto ao gás ozônio por 30 minutos com concentração de 4 mg/L;

Grupo 3 O₃ 25 30: Cabelo humano exposto ao gás ozônio por 30 minutos com concentração de 25 mg/L;

Grupo 4 O₃ 44 30: Cabelo humano exposto ao gás ozônio por 30 minutos com concentração de 44 mg/L;

Grupo 5 O₃ 44 60: Cabelo humano exposto ao gás ozônio por 60 minutos com concentração de 44 mg/L;

Grupo 6 O₃ 44 90: Cabelo humano exposto ao gás ozônio por 90 minutos com concentração de 44 mg/L.

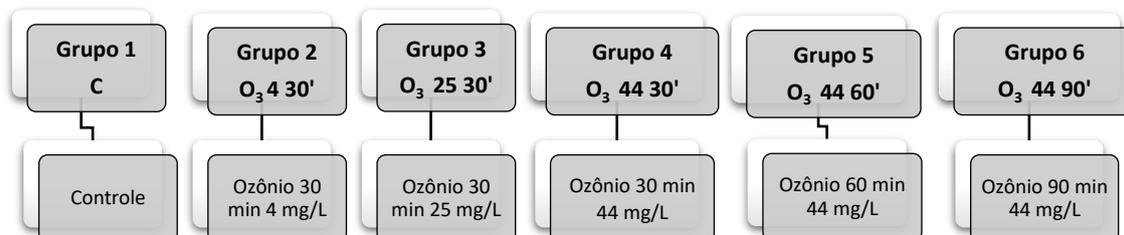


Figura 12. Divisão dos grupos amostrais.

4.5 Esquema de Montagem para Aplicação de Gás Ozônio na Fibra Capilar

As amostras lavadas e presas na tela de nylon foram fixadas em uma placa de aço inoxidável vazada acoplada dentro de um tubo de vidro, na placa as amostras estavam separadas fio a fio, em cada extremidade do tubo de vidro foi acoplada uma peça de aço inoxidável, esta montagem esteve conectada a um gerador de ozônio (OzonLife, Medical Systems, Brazil) por meio de uma mangueira de silicone em uma de suas extremidades, posicionada de modo que o gás percorra em sentido contrário ao posicionamento das cutículas, enquanto a outra estava conectada a um exaustor por meio de outra mangueira de silicone, neste sentido todo o gás ozônio excedente foi processado e descartado para o ambiente externo (Figura 13). Foram aplicadas 3 dosagens diferentes do gás ozônio (4, 25 e 44 mg/L de concentração) no intervalo de tempo de 30 minutos, além de mais duas exposições de 60 e 90 minutos para a concentração de 44 mg/L, o gerador de ozônio para a sua funcionalidade recebeu na entrada um fluxo de oxigênio de 0,125 L/min.

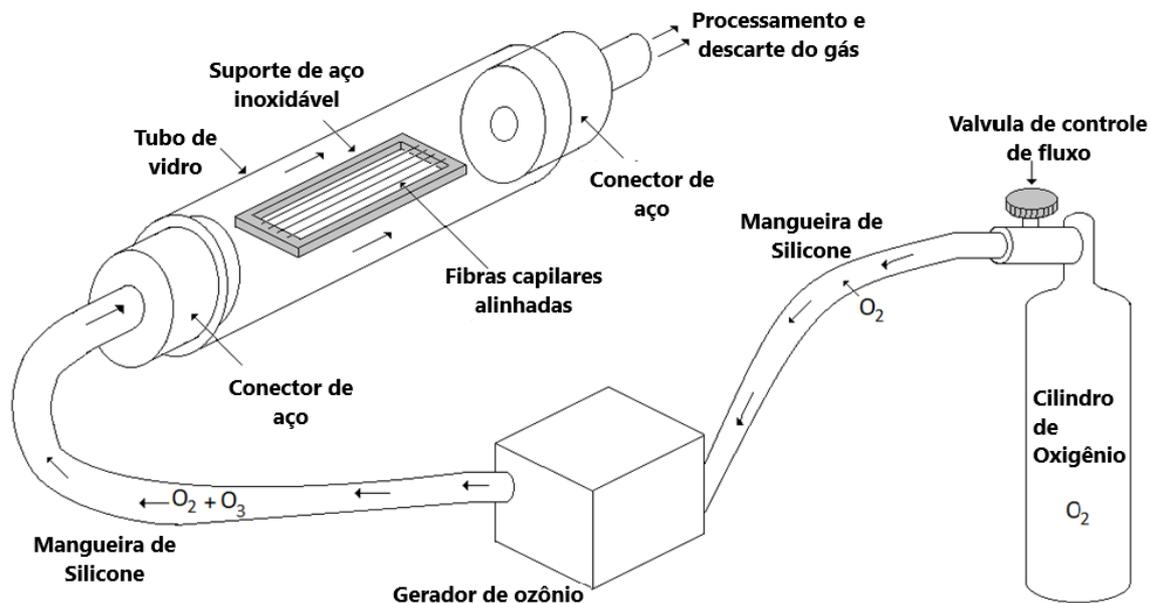


Figura 13. Esquema de montagem para aplicação de Gás Ozônio

4.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As amostras de cabelo foram fixadas em stubs com fita dupla face de carbono, posteriormente receberam deposição de filme fino de ouro pelo método sputtering, utilizando uma metalizadora Denton Vacuum Desk II (Estados Unidos) (Figuras 14.A e 14.B), em seguida os stubs foram colocados dentro de um Detector de Energia Dispersiva de Raios-x (EDS), modelo INCA x-act 51-ADD007 (Oxford Instruments, Reino Unido), acoplado ao Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), modelo VEGA3 LMU (Tescan, Alemanha) (Figura 14.C). Foi direcionado um feixe de elétrons sobre as amostras, e seu espalhamento foi avaliado por um detector, sendo posteriormente, processado por um sistema combinado de hardware/software para a obtenção das imagens e avaliação de possíveis alterações na superfície da fibra capilar (VELASCO et al, 2009).





Figura 14. 14A. Amostras de cabelo fixadas em stubs com fita dupla face de carbono, dentro da metalizadora. **14B.** Metalizadora Denton Vacuum Desk II utilizada no processo de Sputtering. **14C.** Detector de Energia Dispersiva de Raios-x (EDS), acoplado ao Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV).

4.7 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) com Reflexão Total Atenuada

Para espectroscopia de infravermelho foi utilizada a técnica de reflexão total atenuada universal (UATR), onde o preparo das amostras consistiu em enroladas em forma de pequenas bolas (Figura 15A), que seriam prensadas pelo espectrômetro de infravermelho (FT-IR/FIR) (Perkin Elmer, Estados Unidos)(Figura 15B), modelo Frontier, este equipamento atuou com uma média de 16 varreduras e tempo de 2 segundos por varredura, abrangendo uma faixa espectral de 450 a 4000 cm^{-1} , a resolução foi ajustada em 4 cm^{-1} . Para

elaboração dos espectros com as indicações de picos específicos, foi utilizado o software OriginPro (edição 8.5).

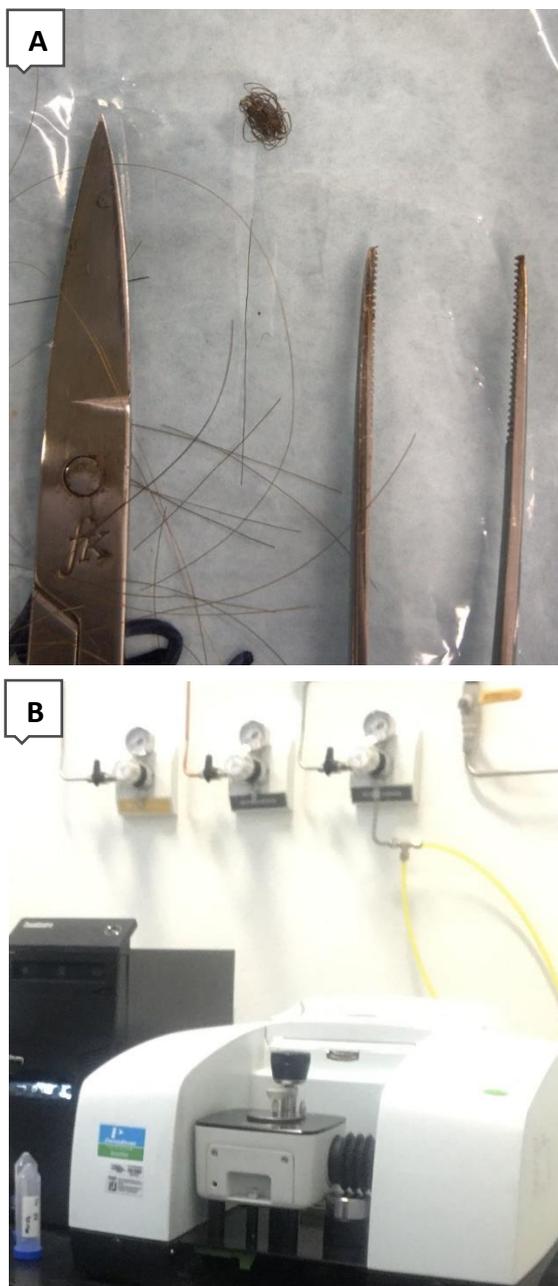


Figura 15. 15A. Amostra de fibra capilar prepara para processo de FTIR-ATR. **15B.** Espectrômetro de infravermelho modelo Frontier usado na pesquisa.

4.8 Normalização dos espectros obtidos por FTIR-ATR

Por se tratar de amostras de espessura variável, os espectros de fibra capilar humana demandam que seja feita sua normalização para que sejam

analisados corretamente. Para este estudo os espectros foram normalizados, então tiveram sua linha base corrigida e depois foram normalizados novamente.

A normalização utilizada foi a vetorial, onde foi realizado o cálculo do valor médio de intensidade dos espectros seguido pela subtração desse em cada espectro, em seguida foi feita a soma quadrática das intensidades e o espectro foi dividido pela raiz quadrada dessa soma, para confirmação do resultado, a soma dos quadrados dos valores obtidos foram somados, e o valor final de igual a 1 confirmou o sucesso na normalização.

$$y_m = \frac{\sum y_i}{i}$$

$$y'(i) = y(k) - y_m$$

$$y''(i) = \frac{y'(i)}{\sqrt{\sum_i (y'(i))^2}}$$

$$\sum_i (y''(i))^2 = 1$$

5 RESULTADOS

5.1 MEV

A técnica MEV foi utilizada visando avaliar o efeito da exposição direta da fibra capilar ao gás ozônio sem interferência de outros meios de contato. A Figura 16 mostra as micrografias obtidas pelo MEV de fibras capilares virgens submetidas ao processamento. A Figura 16.A mostra uma fração da amostra da haste capilar padrão sem tratamento. É possível observar um desgaste natural do fio, após a exposição a agentes presentes no ambiente, uma vez que as camadas de cutícula permaneceram fixas em sua conformação original e alinhadas de maneira sobreposta em forma semelhante a escamas em torno da haste capilar por todo o comprimento (WEI, BHUSHAN, TORGERSON, 2005; KALIYADAN et al, 2016).

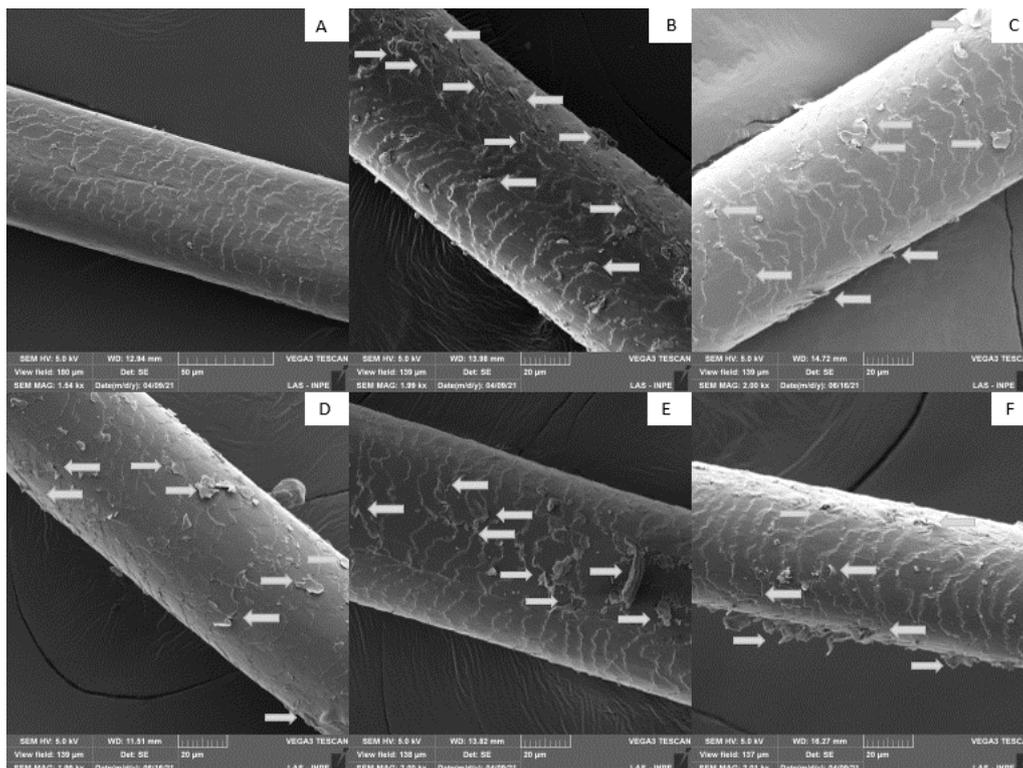
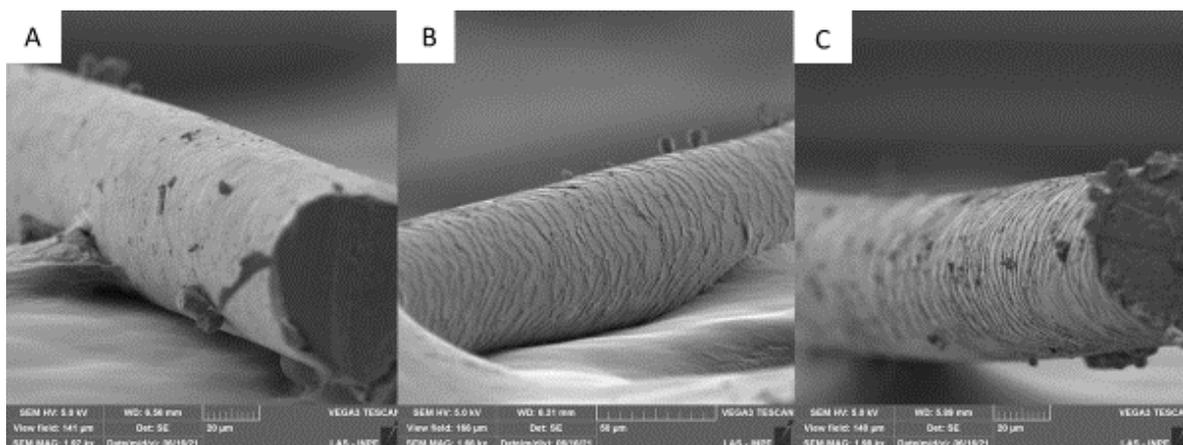


Figura 16. Imagens provenientes do microscópio eletrônico de varredura, evidenciando imagens das fibras capilares expostas ao gás ozônio. Figura 16.A apresenta amostra de cabelo virgem sem passar pelo processo de ozonização; Figuras 16.B e 16.C apresentam as amostras de cabelo processadas por 30 minutos com concentrações de 4 e 25 mg/L respectivamente, na fileira inferior as figuras 16.D, 16.E e 16.F são de amostras expostas ao ozônio por 30, 60 e 90 minutos respectivamente, todas com concentração de 44 mg/L.

De acordo com as figuras, 16.B a 16.F, é possível identificar o levantamento de algumas “escamas” da cutícula ao longo da fibra capilar. Tal alteração se deu de forma irregular e aleatória, por espalhamentos ao longo de toda haste, contudo comparando as figuras entre si, podemos identificar um maior levantamento da cutícula na região inferior da figura 16.F, enquanto a primeira figura apesar de ter mais variações visíveis na imagem, apontou descolamento menor de suas cutículas. É interessante apontar que mesmo as figuras 16.E e 16.F, correspondentes as duas maiores dosagens de exposição, respectivamente, não aparentam em primeiro momento ter causados grandes danos, sua alteração já pode ser comparada a de outros processos químicos, sejam eles naturais, como efeitos dos raios solares, ou cosméticos, por oxidação decorrente de tinturas capilares por exemplo (RICHENA, REZENDE, 2016; LEE, CHANG, 2019).

O levantamento das cutículas também pode ser mais bem visualizado ao se mudar o ângulo pelo qual se captura as imagens no MEV, de forma que mesmo as “escamas” que aparentam estas alinhadas pelas fotos da Figura 16, acabam apresentando tanto levantamento bem como espaço vazio entre suas camadas, como pode ser evidenciado na Figura 17.



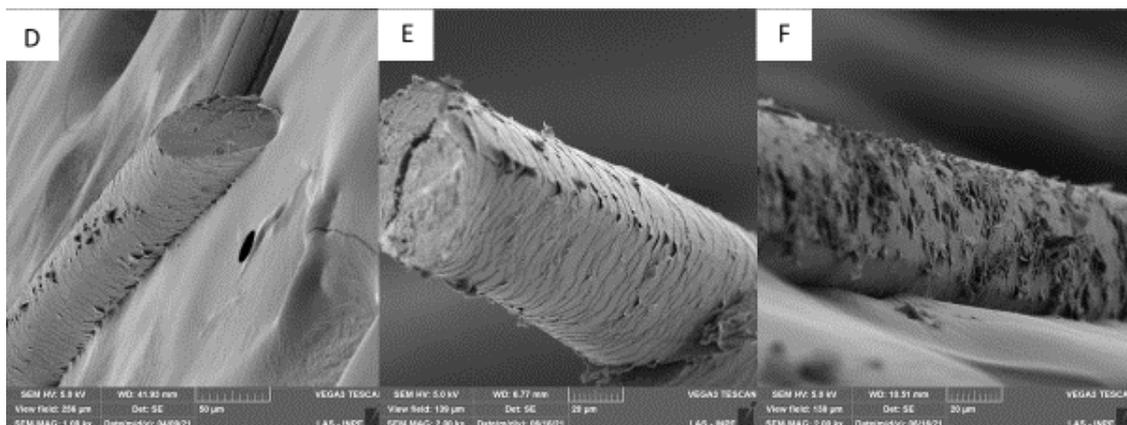


Figura 17. Micrografias do microscópio eletrônico de varredura, geradas a partir de angulação vertical das amostras. Figura 17.A apresenta amostra de cabelo virgem; Figuras 17.B e 17.C apresentam as amostras de cabelo processadas por 30 minutos com concentrações de 4 e 25 mg/L respectivamente, na fileira inferior as figuras 17.D, 17.E e 17.F são de amostras expostas ao ozônio por 30, 60 e 90 minutos respectivamente, todas com concentração de 44 mg/L.

5.2 FTIR-ATR

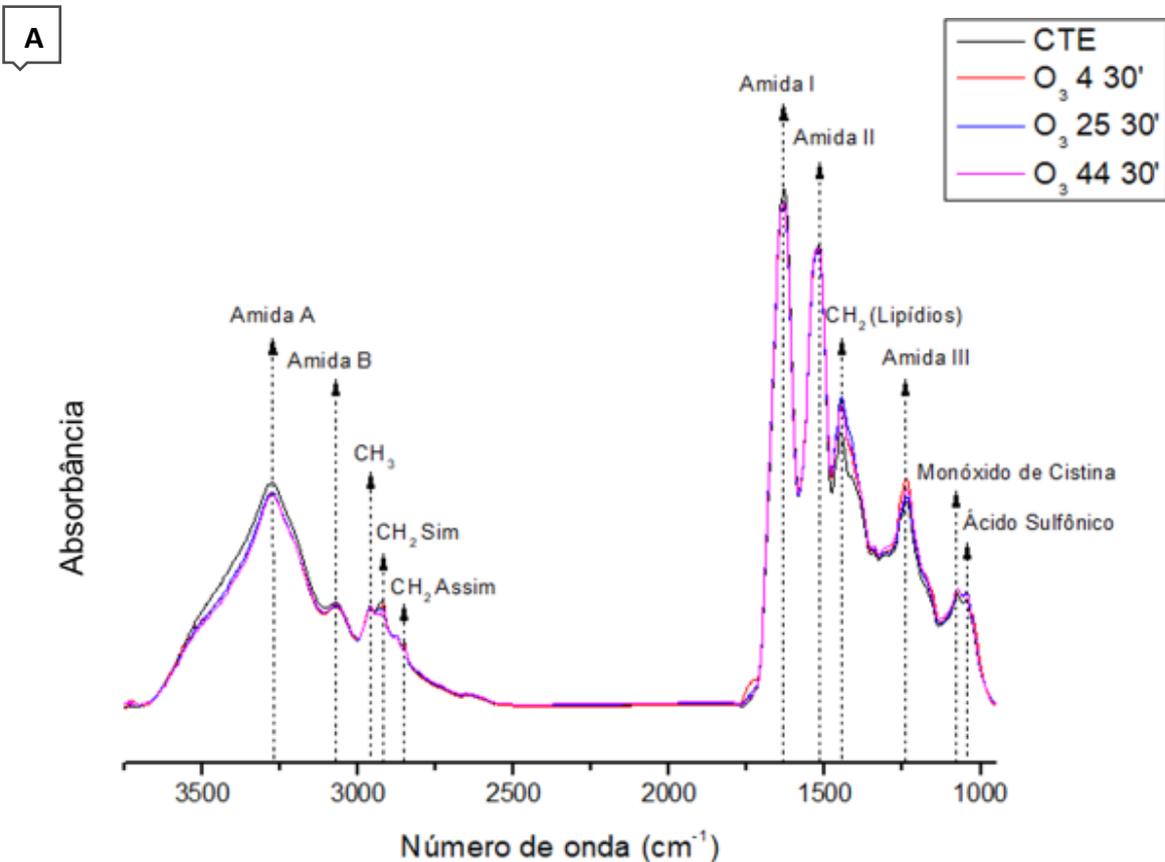
O cabelo humano é abundante em ligações peptídicas, de forma que os átomos envolvidos nesta ligação são responsáveis por uma série de bandas vibracionais encontradas nos espectros de FTIR-ATR presentes neste trabalho, que ficaram sobrepostos na região de 3750-950 cm^{-1} (Figura 18), onde diferenças sutis puderam ser notadas entre os espectros.

Além disto, a estrutura que compõe a queratina pode ser dividida em três grupos específicos, que podem originar diferentes bandas de absorção vibracional que podem estar ligadas a:

- Ligação peptídica, sendo esta a estrutura proteica primária, que é constituída a partir de uma reação de condensação entre os grupos de ácido carboxílico e amina de aminoácidos adjacentes. É a mais abundante no interior da queratina e originam as bandas amida I, II e III do espectro de IR (BARTON, 2011);
- Cadeia polipeptídica, sendo ela a proteína da estrutura secundária, é pertencente ao grupo das ligações C-C do esqueleto dorsal de todas as proteínas da queratina e pode

apresentar de um a três padrões de conformidade sensível, sendo essas estruturas α -helice, folha β e espiral aleatória diretamente relacionadas com as bandas de amida (BARTON, 2011);

- As cadeias laterais de aminoácidos, também conhecidos como grupos R, são responsáveis pelas vibrações -CH, -CH₂, -CH₃, de anéis alifáticos e aromáticos de fenilalanina, tirosina, triptofano e as vibrações significativas dos intermediários oxidativos do aminoácido cistina (isto é S=O, SO₂, SO₃, e -S-SO₃-)(BARTON, 2011).



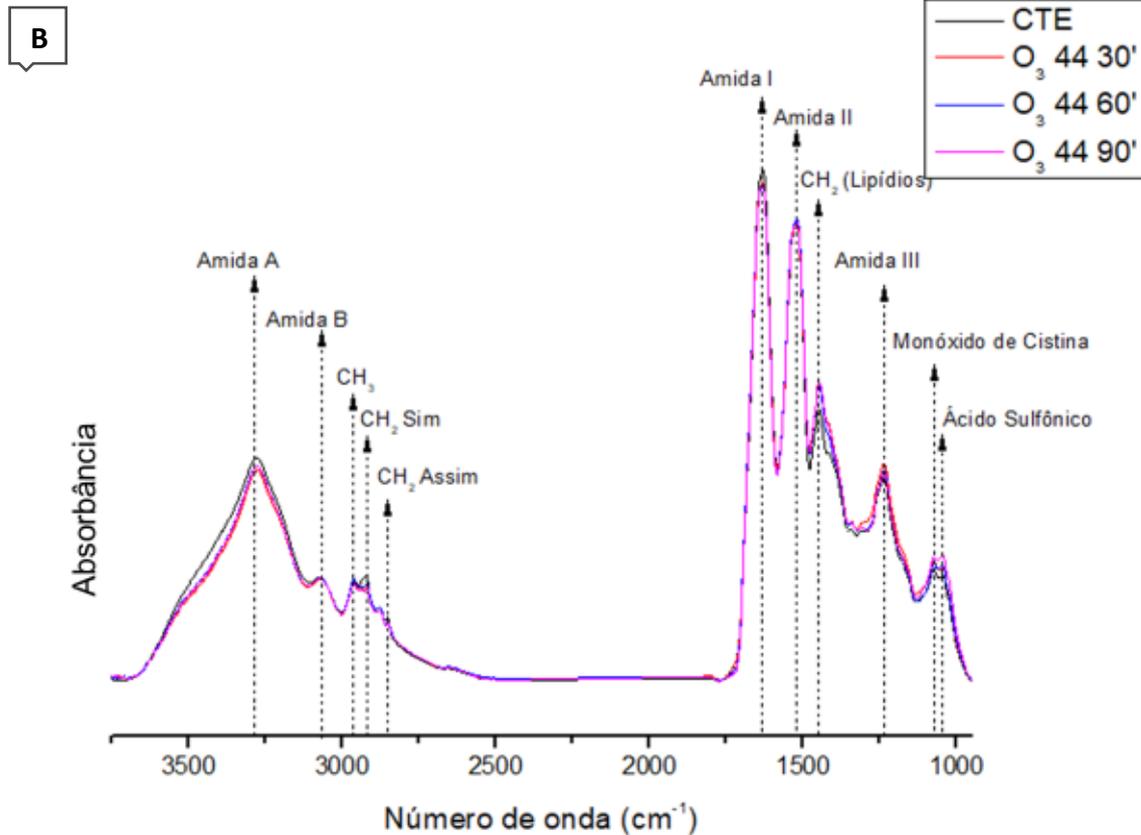


Figura 18. Espectros FTIR-UATR normalizados de 950 a 3750 cm^{-1} comparando amostras de cabelo caucasiano virgem antes e após tratamento com ozônio, em dosagens de 4, 25 e 44 mg/L por 30 minutos (18.A) e 44 mg/L por 30, 60 e 90 minutos (18.B).

Com base na literatura sobre espectroscopia infravermelho de cabelo humano, os espectros obtidos puderam ser divididos em cinco regiões. Onde a primeira região, na faixa de 4000 a 3200 cm^{-1} , representa a presença de água e do grupo carboxílico em cabelos humanos, assim, esta região é a responsável por apontar o caráter das ligações de hidrogênio e dos ácidos carboxílicos. Já na segunda região, localizada entre 3200 a 1400 cm^{-1} , observa-se as bandas para os grupos funcionais da fibra capilar, sendo eles estiramentos de hidrogênio, vibrações de estiramento de ácidos graxos, estiramento assimétrico em lipídios e proteínas. A terceira região, correspondente aos picos entre 1400 a 900 cm^{-1} , tem importância significativa no contexto dos sais minerais e suas combinações, como deformação de carboidratos e também de alguns grupos funcionais relacionados com a Queratina (MUJEEB, ZAFAR, 2017; BARTON, 2011).

A região de número quatro, 900 – 800 cm^{-1} , indica ésteres de ligação SO, bem como à deformação e às vibrações de dobramento do plano de íons NO_2 , NO_3 e CO_3 (carbonato) que podem ser usados para obter a insaturação da fibra capilar. Por fim, a última região, presente na faixa de 800 – 600 cm^{-1} relacionada a ligação dupla CIS ($=\text{CH}$), ligação angular de abano N-H, absorção de CO_2 e SO_2^4 - íons e NH_2 (MUJEEB, ZAFAR, 2017; BARTON, 2011).

A tabela 2 apresenta a relação entre os picos encontrados nos espectros obtidos e as características da composição química da fibra capilar que eles representam (LIMA et al, 2019; LYMAN, SCHOFIELD, 2008).

Tabela 2. Atribuição vibracional no infravermelho (cm^{-1}) para as bandas observadas nos espectros de cabelo humano virgem.

Grupo funcional	Número de onda (cm^{-1})
Amida A	3278
Amida B	3073
CH₃ Assim	2958
CH₂ Assim	2920
CH₂ Sim	2851
Amida I	1633
Amida II	1518
CH₂	1449
(lipídios)	
Amida III	1235
Monóxido de Cistina	1075
Ácido sulfônico	1043
NO₂	874
N-H₂	802

Fonte: Adaptado de LIMA, 2016.

6 DISCUSSÃO

Este estudo demonstra sua relevância ao buscar entender a interação entre o gás ozônio com a fibra de cabelo humano, trazendo luz sobre possíveis usos deste gás nesta região do corpo humano ao demonstrar os efeitos deste gás nas estruturas que compõem a fibra de cabelo humano.

É importante ressaltar que a relação ao levantamento das cutículas com o atrito mecânico causado pelo gás na haste capilar, é negligenciável visto que, o gás percorria o tubo de vidro com vazão calibrada em 125 ml/ min e a área da secção transversal do duto de vidro é de 3,8 cm². Desta forma o gás dentro deste frasco estava em uma velocidade média de 5,5 mm/s, o que torna o atrito do meio gasoso nos fios de cabelo incapaz de levantar as cutículas. Com intuito de verificar as estas alterações químicas, possivelmente decorrente da oxidação dos componentes bioquímicos da cutícula, realizamos as análises por FTIR para verificar as alterações químicas, possivelmente decorrentes da oxidação dos componentes bioquímicos da cutícula.

$$A = \frac{\pi * d^2}{4}$$

$$A = \frac{\pi * (2,2)^2}{4}$$

$$A = 3,8 \text{ cm}^2$$

$$Q = A * V$$

$$V = \frac{Q}{A}$$

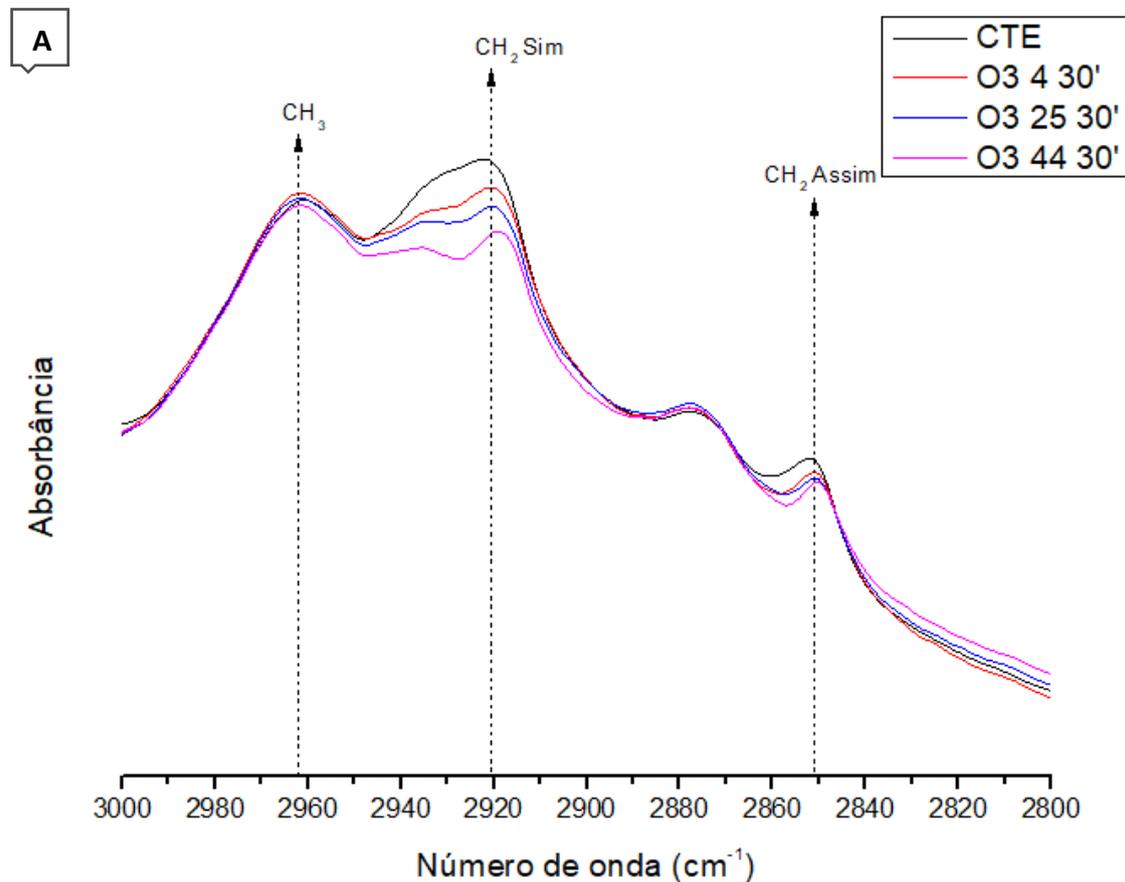
$$A = 3,8 \text{ cm}^2$$

$$Q = 125 \text{ ml/min}$$

$$V = \frac{125 \text{ cm}^3/\text{min}}{3,8 \text{ cm}^2}$$

$$V = 5,5 \text{ mm/s}$$

Dentre as bandas avaliadas, sete estão dentro da segunda região do espectro de cabelo, sendo elas então relacionadas aos estiramentos de hidrogênio, vibrações de estiramento de ácidos graxos, estiramento assimétrico em lipídios e proteínas. Tendo as bandas 2920 e 2851 cm^{-1} , que são relacionadas aos modos de alongamento e dobra de CH_2 e CH_3 de lipídios e grupos de metila, sofrido degradação em seus picos (Figura 19). Essa informação pode demonstrar que o ozônio possui capacidade de oxidar parte da cutícula capilar, levando ao aparecimento de cavidades na cutícula, similares a aquelas visualizadas nas micrografias de MEV, e assim influenciando no desprendimento dos lipídios, que podem estar contidos no complexo de membrana celular (CMC) (LIMA et al, 2019; SANTOS, 2017).



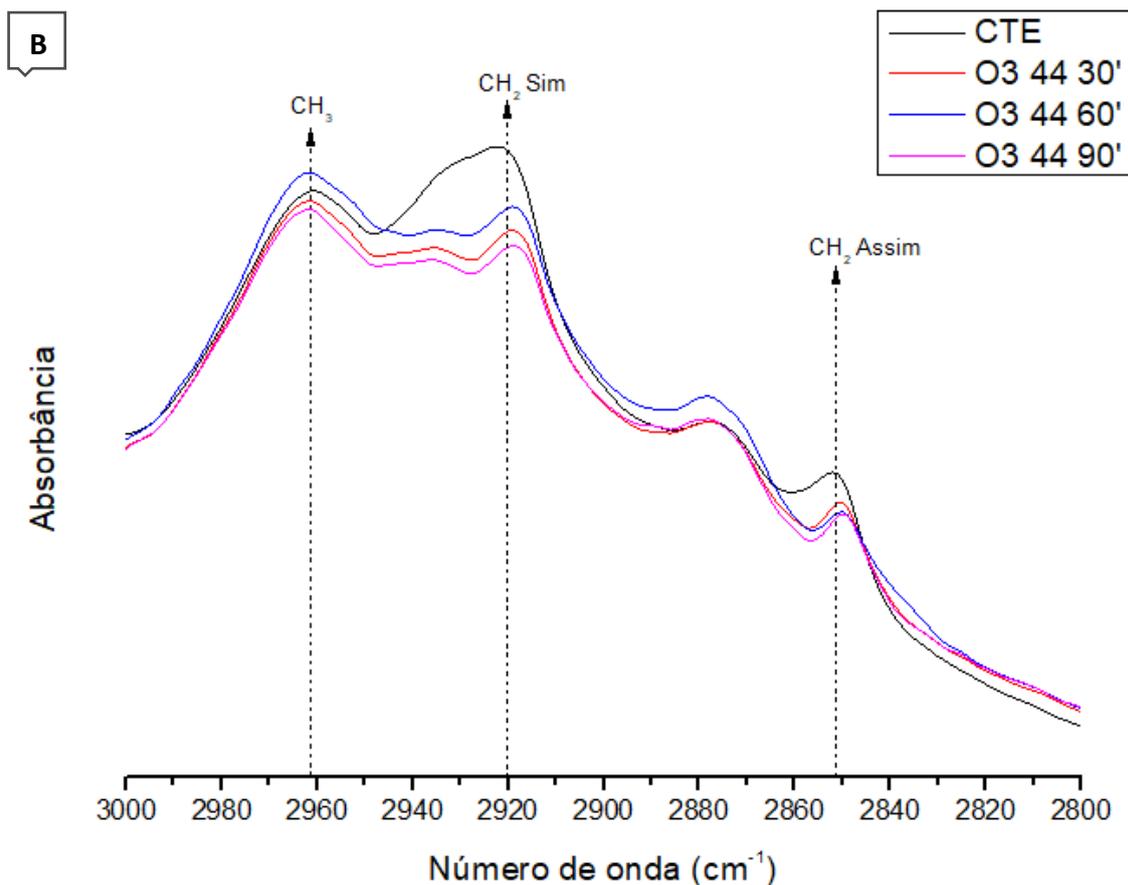


Figura 19. Espectros vibracionais no infravermelho normalizados na região de 3000 a 2800 (cm^{-1}), comparando amostras de cabelo caucasiano virgem antes e após tratamento com ozônio, em dosagens de 4, 25 e 44 mg/L por 30 minutos (**19.A**) e 44 mg/L por 30, 60 e 90 minutos (**19.B**).

Na figura 19.B pode ser visto aumento da banda 2963 cm^{-1} , correspondente ao modo de alongamento simétrico do grupo CH_3 . Tal banda é característica de deformação axial assimétrica de ligações C-H de alcanos terciários, onde duas ligações se estendem, enquanto a terceira se contrai (SILVERSTEIN, BASSLER, MORRILL, 1991). Os danos causados em fibras capilares podem exercer aumento na intensidade da vibração C-H, que pode ser correlacionado com as alterações de conformação da queratina α -helice para folha β (SAIKIA, 2013). Esta banda também pode ser correlacionada aos resíduos de aminoácidos terminais das proteínas do cabelos com menor contribuição de lipídeos (ZHOU et al., 2011). O que concatena o aumento deste

pico pela degradação de outros picos, enquanto essa diferença de resultados presente na amostra de concentração de 44 mg/L por 60 minutos, para com as outras amostras, pode estar ligado ao comportamento instável do ozônio ou seu princípio de hormese. Visto que há muitas pesquisas conduzidas com ozônio que indicam que os deste seguem o princípio de “hormese”, quando em baixas concentrações (ou doses) apresentam alta eficácia, mas esta diminui conforme se aumenta a concentração, gerando assim, toxicidade (BOCCI, ZANARDI, TRAVAGLI, 2011; VIEBAHN-HÄNSLER, LEÓN FERNÁNDEZ, FAHMY, 2012).

Os espectros também mostraram alterações na banda de 1633 cm^{-1} , que corresponde a β -folha, conformação dominante a estrutura da cutícula após exposição dessa a processos químicos que degradam, possivelmente corroborando com as imagens obtidas pelo MEV (LIMA et al, 2019; LYMAN, SCHOFIELD, 2008; SANTOS, 2017). De forma geral, pode-se dizer que os picos presentes na região espectral de 1700-1480 cm^{-1} são sensíveis a alterações na conformação estrutural secundária da proteína capilar, podendo ser úteis para identificar alterações causadas por processos químicos nos cabelos. Também foi possível, observar que a exposição excessiva ao ozônio pode possuir certo limite nas alterações provocadas nos espectros FTIR, como pode ser visto nos picos 1633 e 1449 cm^{-1} que indicam se estabilizar a partir de certa dosagem(Figura 20).

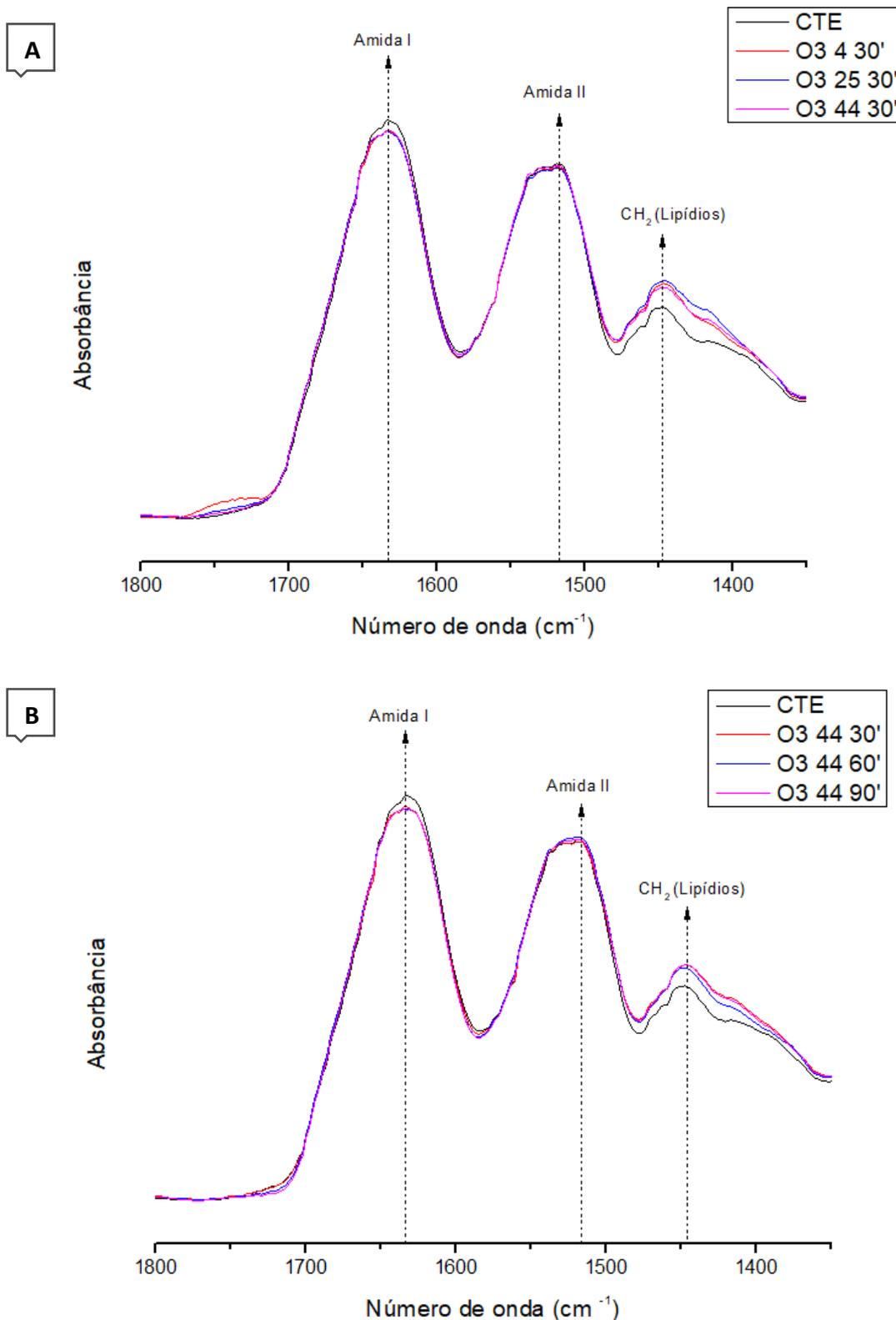


Figura 20. Espectros vibracionais no infravermelho normalizados na região de 1800 a 1350 (cm⁻¹), comparando amostras de cabelo caucasiano virgem antes e após tratamento com ozônio, em dosagens de 4, 25 e 44 mg/L por 30 minutos (**20.A**) e 44 mg/L por 30, 60 e 90 minutos (**20.B**).

A alteração da banda 1449 cm^{-1} , correspondente as ligações CH_2 de lipídios pode estar correlacionada a oxidação destas moléculas por parte ozônio, e demonstraria uma forma de ataque oxidativo diferente da encontra na literatura, uma vez que tal pico é tido como parâmetro para análises por não ter sofrido influência de outros tratamentos químicos na haste capilar descritos em estudos anteriores.

As bandas espectrais entre $1300\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ são relacionadas com o modo de vibração correspondente a amida III. Sendo o pico de absorção principal em torno de 1235 cm^{-1} (Figura 21), que é associado com o estiramento do C-N (30%) e deformação no plano do N-H (30%) da conformação folha β (LIMA et al, 2019; MUJEEB, ZAFAR, 2017; BARTON, 2011). Seguindo a literatura, o processo de oxidação da haste capilar leva a degradação de picos como 1235 cm^{-1} , contudo as amostras demonstraram o aumento deste pico, o que pode indicar uma possível formação de produtos provenientes das outras degradações, estando ainda sob domínio do princípio de hormenese, onde as amostras como menor dosagem apresentaram maior aumento de pico, em ambos os grupos avaliados. (ROBBINS, 1971; SANTOS, 2017).

Um exemplo de mudanças que costumam ser encontradas em decorrência dos produtos formados por processamentos tradicionais do cabelo humano é o aumento dos picos 1075 e 1043 cm^{-1} , respectivamente correspondentes a monóxido de cistina e ácido sulfônico (Figura 21). Este tipo de alteração também pode ser visto nos espectros FTIR das amostras de cabelo ozonizado (ROBBINS, 1971; SANTOS, 2017). O aumento de tais picos nos espectros avaliados evidência que o processo de oxidação por ozônio na haste de cabelo possa ocorrer a partir do contato direto da haste com o gás ozônio.

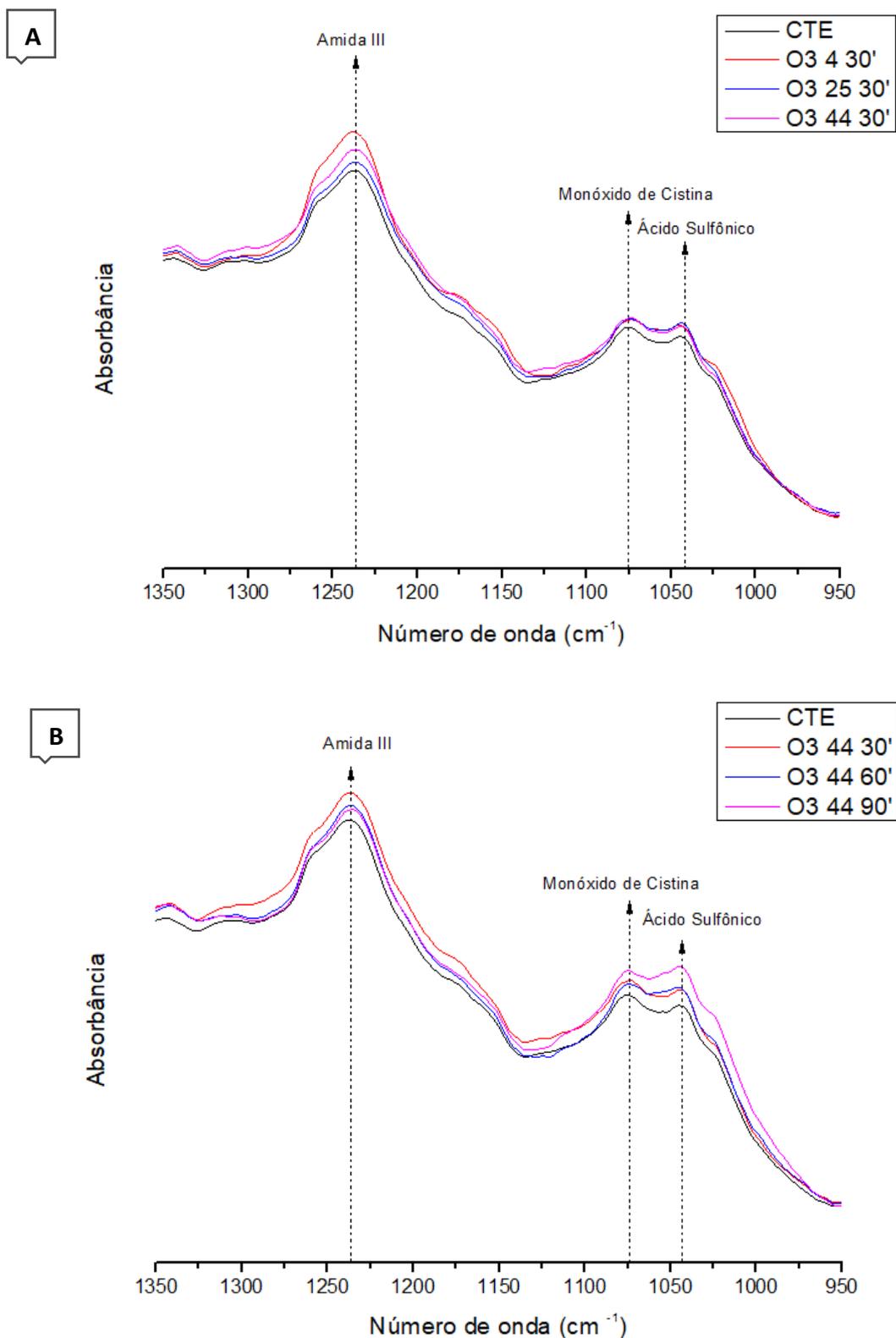


Figura 21. Espectros vibracionais no infravermelho normalizados na região de 1350 a 950 (cm⁻¹), comparando amostras de cabelo caucasiano virgem antes e após tratamento com ozônio, em dosagens de 4, 25 e 44 mg/L por 30 minutos (**21.A**) e 44 mg/L por 30, 60 e 90 minutos (**21.B**).

Considerando estes resultados provenientes de dosagens elevadas aplicadas em um estudo *in vitro*, que apresentam grande potencial oxidativo, se mostram necessários novos estudos, que devem ser realizados empregando-se fibras capilares provenientes de outras etnias, além da realização de estudos *in vivo*, com o intuito de confirmar e se aprofundar na análise das alterações bioquímicas observadas no presente estudo. Uma vez que após a elaboração de mais estudos para compreensão do impacto do gás ozônio na fibra capilar, que possam confirmar a aplicabilidade do ozônio na região do couro cabeludo sem que sejam causados grandes danos na fibra capilar.

7 CONCLUSÃO

O procedimento de exposição da fibra capilar *in vitro* ao gás ozônio, em diferentes concentrações do O₃, e também em distintos tempos de atuação, demonstrou um efeito oxidativo do gás ozônio nas fibras capilares, principalmente no CMC e na folha β. A partir do FTIR foi possível verificar a ação do gás ozônio principalmente nos picos 2920, 2851, 1633, 1235, 1075 e 1043 cm⁻¹. Na análise da superfície da fibra capilar por MEV, foi possível verificar o levantamento das cutículas, efeito característico de processos oxidativos.

Os resultados de ambos os testes podem ser correlacionados entre si uma vez que grande parte dos picos que demonstraram alteração na análise de FTIR-ATR, estão ligados a estruturas químicas presentes na região da cutícula e que segundo a literatura são responsáveis pela integridade física desta, que também demonstrou alterações nas imagens obtidas por MEV, evidenciando efeitos similares aos já descritos na literatura que indicam potencial de uso do ozônio na região fibra capilar, sem que ocorram danos graves.

Contudo, nem todos os picos de FTIR-ATR que apresentaram alterações possuíam base descrita em trabalhos anteriores que ajudasse a compreender com clareza tal mudança, como é o caso do pico 1449 cm⁻¹, o que levanta a demanda por futuros testes que auxiliem no entendimento de tal alteração.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIHPEC, Associação Brasileira das Indústrias de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos. **Panorama do setor, Higiene pessoal, Perfumaria e cosméticos**. São Paulo. 2021.

ABRAHAM, L. S. et al. Tratamentos estéticos e cuidados dos cabelos: uma visão médica (parte 1). **Surg Cosmet Dermatology**, v. 1, n. 3, p. 130-136, 2009.

BARTON, P. M. J. **A forensic investigation of single human hair fibres using FTIR-ATR spectroscopy and chemometrics**. Brisbane, 2011. 365p. Tese de Doutorado - Queensland University of Technology. 2011.

BELLARE, J. et al. A study on the conditioning effects of natural shampoos using the scanning electron microscope. **Int J Cosmet Sci**, v. 23, p. 139-45, 1968.

BHUSHAN, B. Nanoscale characterization of human hair and hair conditioners. **Prog Mater Sci**, v. 53, n. 4, p. 585-710, 2008.

BOCCI, V. et al Studies on the biological effects of ozone: 8 Effects on the total antioxidant status and on interleukin-8 production. **Mediat Inflamm**. v. 7, p. 313-7, 1993.

BOCCI, V. **Ozone - A new medical drug**. Springer Netherlands, 2011. 315 p. ISBN 978-90-481-9234-2.

BOCCI, V.; ZANARDI, I.; TRAVAGLI, V. Ozone acting on human blood yields a hormetic dose-response relationship. **J Transl Med**, v. 9, n. 1, p. 66, 2011.

CASTRO, L. A. S. **Processamento de amostras para microscopia eletrônica de varredura**. Pelotas: Embrapa, 2002. 37p.

CHAPMAN, S. A theory of upper atmospheric ozone. **Q J R Meteorol Soc**, v. 3, p. 103-25, 1930.

CROSLAND, M. Eighteenth Century - Martinus van Marum. Life and Work. v 1. Ed. by Forbes R. J. et al. **Br J Hist Sci**, Cambridge, Reino Unido, v. 5, n. 2, p. 207, 1970.

DARIO, M. F. **Desenvolvimento e avaliação de eficácia de nanoemulsão catiônica na proteção capilar aos danos foto-oxidativos**. 2016, 187p. Tese (doutorado em ciências farmacéuticas) - USP/Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

DRAELOS, Z. D. The biology of hair care. **Dermatol Clin**, v. 18, n. 4, p. 651-8, 2000.

FEUFHELMAN, M. Natural protein fibers. **J Appl Polym Sci**, v. 83, n. 3, p 489-507, 2002.

GAMA, R. M. **Avaliação do dano à haste capilar por tintura oxidativa aditiva ou não de substância condicionador**. 2010. 160P. Dissertação de Mestrado (Faculdade de Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

GIULIANI, G.; RICEVUTI, G.; GALOFORO, A.; FRANZINI, M. Microbiological aspects of ozone: bactericidal activity and antibiotic/antimicrobial resistance in bacterial strains treated with ozone. **Ozone ther**, v. 3, n. 3, 2018.

GRAY, J. **World of Hair: A Scientific Companion**. Delmar Pub, 1997.

GRECHKANYOVA, O. et al. The Usage of Laser Doppler Flowmetry for Evaluation of the Efficiency of Ozone-Containing Drugs for External Use. **J Pharm Pharmacol**. v. 6, n. 1, p. 32-7, 2018.

HALAL, J. **Tricologia e a química cosmética capilar**. São Paulo: Cengage Learning, 2011.

HAM, A. W.; CORMACK, D. H. **O sistema tegumentar (pele e anexos)**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983. p. 577-605.

HARRIS, M. I. C. **Pele estrutura, propriedades e envelhecimento**. 3.ed. São Paulo: Senac São Paulo, 2009.

HIND, A. R.; BHARGAVA, S. K.; McKINNON, A. At the solid/liquid interface: FTIR/ATR — the tool of choice. **Adv Colloid Interface Sci.** v. 93, n. 1-1, p.91-114, 2001.

ILHARCO, L. M. Espectroscopia de Infravermelho uma Técnica Antiga, Sempre Actual. **SPQ.** v. 69, p. 34-45, 1998.

INOUE, T.; IWAMOTO, Y; OHTA, N. Structural analysis of human hair cuticle using microbeam X-ray diffraction: relationship with effects of hair dyeing. **Research Front.** p. 135-6, 2005.

JACHOWICZ, J. Hair damage and attempts to its repair. **J Soc Cosmet Chem.** v. 38, n. 4, p. 263-86, 1987.

JOHNSON, D. H., ed. **Hair and Hair Care.** Nova Iorque: Marcel Dekker, 1997. 370p.

KALIYADAN, F. et al. Scanning Electron Microscopy Study of Hair Shaft Damage Secondary to Cosmetic Treatments of the Hair. **Int J Trichology.** v. 8, n. 2, p.94-8, 2016.

KUZUHARA, A. Analysis of structural changes in permanent waved human hair using Raman spectroscopy. **Biopolymers.** v. 85, n. 3, p. 274-283, 2007.

LEES, M. S.; CHANG, B. S. Morphological Damage Procedures of Hair Surface Treated with Repetitive Oxidation Coloring Agent. **Med Legal Update.** v. 19, n. 2, p. 533-9, 2019.

LEHNINGER, A. L. **Bioquímica: biossíntese e a utilização.** São Paulo: Edgard Blücher, 1976. v.1, p. 88.

LIMA, C. R. R. C. **Caracterização físico-química e analítica de fibras capilares e ingredientes cosméticos para proteção.** São Paulo, 211.p. Tese de Doutorado (Programa de Pós-graduação em Fármacos e Medicamentos) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

LIMA, C. R. R. C. et al. Heat-damaged evaluation of virgin hair. **J Cosmet Dermatol.** v. 18, p. 1885-92, 2019.

LYMAN, D. J.; SCHOFIELD P. Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy Analysis of Human Hair Fiber Structure. **Appl Spectrosc.** V. 62, n. 5, p. 525–35, 2008.

MALISKA, A. M. **Microscopia Eletrônica de Varredura**, departamento de engenharia mecânica, Universidade Federal de Santa Catarina. Disponível em: www.usp.br/nanobiodevwp-content/uploads/MEV_Apostila.pdf. Acesso em: 5 Dez. 2021.

MATTOS, I. L. et al. PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO: IMPORTÂNCIA E DETERMINAÇÃO. **Quim Nova**, v. 26, n. 3, p. 373-380, 2003.

MAURICIO, L. P. A. **Caracterização da integridade estrutural da fibra capilar tratada com diferentes produtos químicos**. 2019. 108p. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Têxtil) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal - RN, 2019.

McEVOY, B.; ROWAN, N. J. Terminal sterilization of medical devices using vaporized hydrogen peroxide: a review of current methods and emerging opportunities. **J Appl Microbiol**, v. 127, n. 5, 2019.

McKEE, T.; McKEE, J. R. **Biochemistry: The molecular basis of life**. 3. ed. Nova Iorque: McGraw-Hill, 2003. p. 108-160.

MEHLMAN, M. A.; BOREK, C.. Toxicity and Biochemical Mechanisms of Ozone. **Environ Res**, v. 42, p. 36-53, 1987.

MENDHAM, J. et al. **Análise Química Quantitativa**. 6.ed. LTC: Rio de Janeiro, 2002.

MIRANDA-VILELA, A. L.; BOTELHO, A. J.; MUEHLMANN, L. A. An overview of chemical straightening of human hair: technical aspects, potential risks to hair fibre and health and legal issues. **Int J Cosmet Sci.** v. 36, n. 1, p. 2-11, 2014.

MOITA, G. C. **Propriedades físico-químicas de cabelo: avaliação de interações com corante e surfactantes**. 1989, 145p. Dissertação (mestrado em físico-química) - UNICAMP/Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1989.

MONTEIRO, V. F. **Fibras capilares: efeitos de diferentes agentes nas alterações físicas e químicas**. 2003. Tese (Doutorado em Química) - UFSCar, São Carlos, 2003.

MUJEEB, M.A.; ZAFAR, M. FTIR Spectroscopic Analysis on Human Hair. **Int J Innov Res Sci Eng Technol**. v. 6, p. 9327-32, 2017

MURPHY, L. Ozone-the latest advance in sterilization of medical devices. **Can Oper Room Nurs J**. v. 24, n. 2, p. 28-38, 2006.

NAKANO, A. K. **Comparação de danos induzidos em cabelos de três etnias por diferentes tratamentos**. 2006, 52p. Dissertação (mestrado em físico-química) - UNICAMP/Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2006.

NAKAO, A. et al. Therapeutic antioxidant medical gas. **J Clin Biochem Nutr**, v. 44, n. 1, p. 1-13, 2009.

OLIVEIRA, V. G. Cabelos: uma Contextualização no Ensino de Química. **Cosmetic & Toiletries** (Edição em Português), 2013.

PAULA, C. M. S. S. **Alterações na ultra-estrutura do cabelo induzidas por cuidados diários e seus efeitos nas propriedades de cor**. 2001, 119. Tese (Doutorado em química) - UNICAMP/Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

POPESCU, C.; HOCKER, H. Hair-the most sophisticated biological composite material. **Chem Soc Rev**, v. 36, n. 8, p. 1282-1291, 2007.

RAKNESS, K. et al. Guideline for Measurement of Ozone Concentration in the Process Gas from an Ozone Generator. **Ozone Sci Eng**, v.18, p. 209-29, 1996.
RICHENA, M.; REZENDE, C. A. Morphological degradation of human hair cuticle due to simulated sunlight irradiation and washing. **J Photochem Photobiol B Biol**. v. 161, 430-40. 2016.

RICKLOFF, J. R. An evaluation of the sporicidal activity of ozone. **Appl Environ Microbiol**, p. 683-8, 1987.

ROBBINS, C. R. **Chemical and physical behavior of human hair**. 4 ed. Nova Iorque: Springer, 2001.

ROBBINS, C. R. Chemical aspects of bleaching human hair. **J Soc Cosmet Chem.** v. 22, n. 6, p. 339-49, 1971.

SAIKIA, J. P. Hair waving natural product: *Dillenia indica* seed sap. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.** v. 102, p. 9005-907, 2013.

SANT'ANNA, A. L. S. **Estudo da disposição de ceramidas sobre a fibra capilar para o combate a danos cuticulares.** 2000, 68p. Dissertação (mestrado em química). UNICAMP/Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

SANTOS, J. D. **Caracterização de fios de cabelo antes e após tratamentos químicos e físicos por espectroscopias Raman e no infravermelho e microscopia eletrônica.** 2017. 58p. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Química) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora - MG, 2017.

SCHÖNBEIN, C. F. Recherches sur la nature de l'odeur qui se manifeste dans certaines actions chimiques. **Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances De l'Academie Des Sciences,** v. 150, p. 706-10, 1840.

SILVA, E. M. **Caracterização Físico-química e Termoanalítica de amostras de Cabelo Humano.** 2012. 112p. Dissertação de mestrado (Instituto de Química) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. **Spectrometric identification of organic compounds.** 5.ed. Nova Iorque: John Wiley, 1991.

SISTEMA TEGUMENTAR. Disponível em: <http://www.auladeanatomia.com/novosite/sistema-tegumentar/>. Acesso em: 6 dez. 2021.

SKOOG, D. A.; HOLLER, J. F.; NIEMAN, A. T. **Princípios da análise Instrumental.** 5.ed. Bookman: Porto Alegre, 2002.

SMITH, B. C. **Infrared spectral interpretation: a systematic approach.** Boca Raton: CRC Press, 1998.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química orgânica**. 7.ed. Rio de Janeiro: LTC - Livros Técnicos e Científicos, 2001.

TOBIN, D. J. Biochemistry of human skin-our brain on the outside. **Chem Soc Rev**, v. 35, n. 1, p. 52-67, 2006.

TRAVAGLI, V.; ZANARDI, I.; VALACCHI, G.; BOCCI, V. Ozone and Ozonated Oils in Skin Diseases: A Review. **Mediat Inflamm**. v. 2010, 2010.

TRUEB, R. M. The impact of oxidative stress on hair. **Int J Cosmet Sci**. v. 37, p. 25-30, 2015.

VAN LEEUWEN, J. Proposed OS&E Requirement: Measuring Ozone Dosage. **Ozone Sci Eng**, v. 37, n. 2, p. 191-2, 2015.

VELASCO, M et al. Hair fiber characteristics and methods to evaluate hair physical and mechanical properties. **Brazilian J Pharm Sci**. v. 45, n.1, p. 153-62, 2009

VIEBAHN-HÄNSLER, R.; LEÓN FERNÁNDEZ, O. S.; FAHMY, Z. Ozone in medicine: The low-dose ozone concept—guidelines and treatment strategies. **Ozone Sci Eng**, v. 34, n. 6, p. 408-24, 2012. ISSN 0191-9512.

VILLA, A. L. V. et al. Avaliação de Perda Protéica em Cabelos Étnicos pelo método Kjeldhal. **Cosmetics & Toiletries** (Brasil). v. 20, p. 60-3, 2008.

WAGNER, R. C. C. **A estrutura da medula e sua influência nas propriedades mecânicas e de cor do cabelo**. 2006, 84p. Tese (doutorado em química) - UNICAMP/Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2006.

WEI, G.; BHUSHAN, B.; TORGERSON, P. M.; Nanomechanical characterization of human hair using nanoindentation and SEM. **Ultramicroscopy**. v. 105, n. 1-4, p. 48–266, 2005.

WILKINSON, J. B.; MOORE, R. J. **Cosmetología de Harry**. Madri: Ediciones Diaz de Santos, 1990

WOLFRAM, L. J. Hair Cosmetics. In: BAREL, A. O.; PAYE, M.; MAIBACH, H. I. **Handbook of Cosmetic Science and Technology**. Nova Iorque: Marcel Dekker, 2001. p.599- 602.

YANG, F-C.; ZHANG, Y.; RHEINSTÄDTER, M. C. The structure of people's hair. **PeerJ**. p. 1-19, 2014.

YAO, Y. et al. **Relationship between molecular weight of sericin peptides and effects of hair-care**, Fangzhi Xuebao. v. 25, n. 2, p. 14-16, 2004 (In Chinese) IN FOX, C. Wipes. Cosmetics & Toiletries. v. 121, n. 9, p.38-42, 2006.

ZÂNGARO, R. A.; FERNANDES, A. B.; LIMA, C. J. Ozônio – Fundamentos e Aplicações. In. Andrade, A. O.; Soares, A. B.; Cardoso, A.; Lamounier, E. A. **Tecnologias, Técnicas e Tendências em Engenharia Biomédica**. Uberlândia: Canal 6, 2014, p. 94-113.

ZENG, J.; LU, J. Mechanisms of action involved in ozone-therapy in skin diseases. **Int Immunopharmacol**. v.56, p. 235-41, 2018.

ZHOU, Y. et al. The effect of various cosmetic pretreatments on protecting hair from thermal damage by hot flat ironing. **J Cosmet Sci**, v. 62, p. 265-282, 2011.