

PERMEAÇÃO DE ATIVOS ORGÂNICOS COSMÉTICOS E SUA DISTRIBUIÇÃO NA FIBRA CAPILAR: UMA INVESTIGAÇÃO VIA ESPECTROMETRIA DE MASSAS POR IMAGEAMENTO

Longo, Valéria M.^{1*}; Sartori, Tatiana P.^{2,3}, Robeldo, Thaianie A.¹, Costa, Robeta B.¹, Pedroso, Natália R.¹, Lourenço, Carolina⁴, Carrilho, Emamuel^{2,3}

¹ KATLÉIA LAB, Centro Avançado de Diagnóstico Capilar, São Carlos, SP, Brasil.

² Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 13566-590 São Carlos, SP, Brasil.

³ Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Bioanalítica – INCTBio, 13083-970 Campinas, SP, Brasil.

⁴ Symrise, Global Hair Care Center, Cotia, SP, Brasil

*autor para correspondência: valeria@katleia.com.br

RESUMO

Uma das análises mais desejadas atualmente na cosmetologia é a comprovação da entrada e distribuição de ativos cosméticos no interior da fibra capilar. Particularmente, a técnica de microscopia Raman possibilita a medida de vibrações características que detectam a presença do ativo de interesse e a sua profundidade de permeação no córtex. No entanto, essa técnica possui a limitação de fluorescência advinda da melanina, tendo seu uso restrito a fibras descoloridas, albinas ou brancas.

A espectrometria de massas (MS) é uma técnica analítica utilizada para identificação e quantificação de compostos, bem como na elucidação da estrutura de moléculas desconhecidas. Abordagens inovadoras desta técnica, baseadas em vários sistemas de ionização e detecção, têm sido desenvolvidas. Atualmente, um dos métodos muito utilizados para a análise de biomoléculas, tais como proteínas, lipídeos e peptídeos, é o de ionização por dessorção à laser assistida por matriz, MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*) acoplada a um analisador por tempo de voo (TOF). Assim, MALDI-TOF é uma técnica utilizada na investigação e identificação de moléculas orgânicas, em especial biopolímeros, com elevada razão m/z ($> 10^3$ Da). Um novo direcionamento à esta técnica tem sido realizado por meio da aquisição de imagens diretamente de tecidos biológicos, sendo conhecido como *Imaging Mass Spectrometry* (IMS), o que permite a análise direta de uma seção de um tecido biológico qualquer, sem danificá-lo, possibilitando a correlação dos dados de espectrometria de massas com as características morfológicas do tecido e a localização de princípios ativos.

Neste trabalho, utilizamos de maneira inédita a técnica de imageamento por MALDI-MS para mapear a permeação de triacilgliceróis advindos do óleo de coco, argan e abacate em fibras capilares caucasianas.

As fibras foram previamente tratadas com os respectivos óleos, embutidas em resina histológica e cortadas longitudinalmente e transversalmente em um dispositivo de corte histológico desenvolvido para este fim. As análises foram realizadas por MALDI-TOF/TOF, marca Bruker, modelo autoflex maX.

As imagens obtidas mostram a permeação e distribuição dos triacilgliceróis e outros princípios ativos dentro da fibra capilar, o que permitirá a customização e ajustes dos tratamentos capilares, bem como comprovação de *claims* relacionados à permeação de ativos.

Palavras Chaves: Fibra capilar; Espectrometria de Massas, Nutrição Capilar, MALDI, Personalização.

INTRODUÇÃO

A penetração de moléculas em fibras capilares é particularmente importante para a indústria cosmética e é essencial para a garantia da eficácia pretendida.¹ Deste modo, compreender as interações físico químicas, como reatividade, polaridade, grupos funcionais do ativo ou ingrediente cosmético em questão e a cutícula irão ditar a sua permeação ou não, assim como a velocidade de permeação. Outro fator a se considerar é a substantividade do ativo com ao córtex, em que, neste último as forças de capilaridade entre meio o externo e internos podem favorecer a entrada do ativo.

O cabelo humano é naturalmente protegido de agressões externas por uma camada hidrofóbica externa. A integridade desta superfície é essencial para a percepção por parte dos consumidores de um cabelo saudável e brilhante.² A camada externa da cutícula, geralmente referida como epicutícula, é fina, mas com grande resistência a ataques químicos e contém em sua composição grande quantidade de lipídeos.³ Ademais, a extração desse composto demonstrou a presença de lipídeos de natureza prevalentemente covalente, formando a camada f (f-layer). A mesma é prevalentemente composta pelo ácido (+)-18-metileiconasóico (18-MEA), ligado com um tioester a resíduos de cisteínas na camada proteica existente abaixo da epicutícula.⁴ Esse arranjo molecular confere à superfície da fibra capilar uma grande hidrofobicidade se contraponto à hidrofiliabilidade encontrada no córtex capilar.

A aplicação de óleos vegetais na fibra capilar está cada vez mais comum nos dias atuais, tanto nos tratamentos anti-frizz como nos processos de nutrição capilar. Além disso, os óleos vegetais são bem conhecidos pelas suas propriedades antioxidantes e por vezes anti-inflamatórias, auxiliando a homeostase e conforto do couro cabeludo.⁵

A permeação dos óleos vegetais para dentro da fibra capilar depende, dentre vários fatores da afinidade do óleo em relação à superfície da fibra capilar e a sua habilidade de migrar para dentro do córtex via difusão intercelular pelo complexo da membrana celular (CMC). A mobilidade molecular irá depender do tamanho, peso, volume, densidade de cargas e viscosidade do óleo.⁶

Em termos de estruturas moleculares, óleos poli-insaturados podem criar triglicerídeos com estruturas mais “abertas” e encontrar maior dificuldade de penetração na CMC. Fatores adicionais como polaridade, a atividade dos grupos funcionais, momento dipolar, densidade de cargas, e área superficial.

Particularmente, a técnica de microscopia Raman possibilita a medida de vibrações características que detectam a presença do ativo de interesse e a sua profundidade de permeação no córtex. No entanto, essa técnica possui a limitação de fluorescência advinda da melanina, tendo seu uso restrito às fibras descoloridas, albinas ou brancas.⁷ Outra técnica utilizada para detecção de ativos *in locus* é a microscopia de fluorescência. Nesta técnica, um marcador fluorescente é ligado à molécula de interesse para sinalizar sua presença. A desvantagem da técnica é que nem todas as moléculas de interesse possuem afinidade de ligação com marcadores fluorescentes específicos.⁸

A espectrometria de massas (MS) é uma técnica analítica utilizada para identificação e quantificação de compostos, bem como na elucidação da estrutura de moléculas desconhecidas. Abordagens inovadoras desta técnica, baseadas em vários sistemas de ionização e detecção têm sido desenvolvidas. Atualmente, um dos métodos muito utilizados para a análise de biomoléculas, tais como proteínas, lipídeos e peptídeos, é o de ionização por dessorção à laser assistida por matriz, MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*) acoplada a um analisador por tempo de voo (TOF). Assim, MALDI-TOF é uma técnica utilizada na investigação e identificação de moléculas orgânicas, em especial biopolímeros, com elevada razão m/z ($> 10^3$ Da). Um novo direcionamento à esta técnica tem sido realizado por meio da aquisição de imagens diretamente de tecidos biológicos, sendo conhecido como *Imaging Mass Spectrometry* (IMS), o que permite a análise direta de uma secção de um tecido biológico qualquer, sem danificá-lo, possibilitando a correlação dos dados de espectrometria de massas com as características morfológicas do tecido e a localização de princípios ativos.⁹

Estudos prévios utilizaram a técnica conhecida como *secondary ion mass spectrometry* (SIMS) para investigar a penetração do óleo de coco e óleo mineral na fibra capilar.¹⁰ Os espectros analisados claramente mostraram a penetração do óleo de coco no córtex capilar. Sua difusão foi de total à parcial, dependendo da região observada. Contrariamente, o óleo mineral

não penetrou no córtex capilar. A diferença foi atribuída à polaridades distintas entre os dois óleos. O óleo de coco forma triglicerídeos polares e o óleo mineral é apolar. Dessa forma, o óleo de coco teria maior afinidade com o córtex capilar.

Neste trabalho, utilizamos de maneira inédita a técnica de imageamento por MALDI-MS para mapear a permeação de ácidos graxos advindos do óleo de coco, argan e abacate em fibras capilares caucasianas.

OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo demonstrar a permeação e distribuição dos óleos de coco, argan e abacate, bem como seus componentes, pela técnica de imageamento por MALDI-TOF em fibras capilares caucasianas descoloridas.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Preparação das Mechas Virgens

Para o estudo foram preparadas quatro mechas virgens caucasianas, medindo aproximadamente 20 cm e pesando 3 g.

Após o preparo todas as mechas foram lavadas com uma solução a 10% de lauril éter sulfato de sódio (LESS), enxaguadas em água corrente. Após a lavagem foram secas em ambiente padronizado a 22 °C e 50% de umidade relativa por 24 horas.

2. Preparação das Mechas Descoloridas

Após a secagem, as mechas de cabelo virgem foram submetidas a um processo de descoloração oxidativa com um descolorante de mercado à base de peróxido de hidrogênio, seguindo-se as orientações de uso do fabricante.

Todas as mechas foram submetidas a um processo padronizado de pós-limpeza utilizando uma solução 10% de LESS por um minuto seguido de enxague em água corrente. As mechas foram secas em um ambiente padronizado a 50% de umidade relativa e 22 °C e deixadas 24 horas em repouso antes dos ensaios.

3. Tratamento com as Mechas Descoloridas

As mechas descoloridas foram submetidas a tratamento com três óleos vegetais: óleo de argan, óleo de coco e óleo de abacate. Os óleos foram aplicados diretamente nas mechas em quantidade suficiente para envolver bem os fios. Cada mecha foi embalada em papel alumínio e levada a estufa a 25 °C por 24 horas. Em seguida, cada mecha foi lavada com solução de LESS 10% e água corrente e deixada para secagem em ambiente controlado (22 °C 50 e 50% UR) durante a noite.

4. Preparação dos fios para as análises

Os fios foram cortados ao longo de todo o comprimento usando um aparato produzido em laboratório, baseado no processo descrito por Kempson et al.,¹¹ que consiste em duas partes: a primeira compreende um bloco de material polimérico, onde posiciona-se uma lâmina de micrótomo a um ângulo de aproximadamente 20°, parafusos e uma placa metálica, usados para fixar a lâmina (Figuras 1a e 1b.). A segunda é composta por um bloco de alumínio com ranhuras entre 40 e 50 µm, no qual as fibras capilares são posicionadas e presas na lateral com fita adesiva (Figura 1c). O sistema foi desenvolvido no Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo com a pedido de patente em andamento.

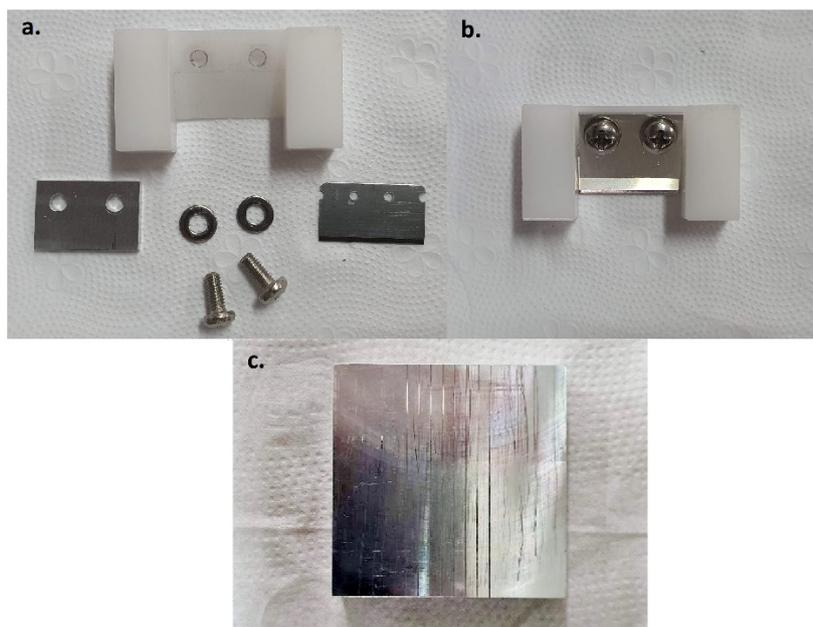


Figura 1. Aparato para corte longitudinal dos fios de cabelo. A) Peças do suporte de fixação da lâmina de micrótomo com ângulo de 20°; b) Aparato montado com a lâmina fixa; c) Bloco de alumínio com ranhuras de 40 e 50 μm .

Os fios foram colados com auxílio de uma fita dupla-face condutiva (Arcare® 90106NB) em lâminas de vidro com revestimento condutivo ITO (óxido de índio e estanho). A matriz DHB (ácido 2,5-dihidroxibenzóico), em concentração de 7 mg/mL de acetonitrila 50% acidificada com 0,1% de ácido trifluoracético (v/v) foi aplicada sobre a lâmina com auxílio do equipamento TM-Sprayer™ (HTX Technologies).

5. Caracterizações

As análises MALDI-TOF/TOF foram realizadas no espectrômetro de massas autoflex maX® (Bruker Daltonics), que utiliza o laser smartbeam-II de comprimento de onda de 355 nm, com potência de laser em 90%, diâmetro do foco em 80 μm e taxa de repetição em 2000 Hz. Os espectros foram obtidos no modo positivo de íons, utilizando o refletor, na região de m/z 450-2000. O software flexControl (Bruker Daltonics) foi utilizado para aquisição e o flexAnalysis (Bruker Daltonics) para o tratamento dos dados, assim como o software aberto MZmine.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Existe uma classificação específica para os óleos vegetais ou triglicerídeos. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA): “São os produtos constituídos principalmente de glicerídeos de ácidos graxos de espécies vegetais. Podem conter pequenas quantidades de outros lipídeos como fosfolipídeos, constituintes insaponificáveis e ácidos graxos livres, naturalmente presentes no óleo ou na gordura.”¹² Os ácidos graxos podem ser classificados em saturados (apenas ligações simples), monoinsaturados (somente uma ligação com dupla) e poli-insaturados (duas ou mais ligações duplas).

Ao contrário das gorduras animais, com exceção dos óleos de peixe, a maioria dos óleos derivados de plantas é líquida à temperatura ambiente. A maioria dos óleos derivados de plantas é pobre em gorduras saturadas e rica em gorduras poli-insaturadas e monoinsaturadas. No entanto, uma exceção é o óleo de coco, um semissólido à temperatura ambiente que contém uma grande quantidade de gordura saturada e ômega 3 e 6.¹²

Cada óleo vegetal apresenta uma função, a qual está relacionada à sua composição lipídica. Os óleos de argan, abacate e coco, são ricos em ácidos graxos insaturados como por

exemplo, os ácidos oleico, palmitoleico, ecosanoico e erucico. O óleo de argan possui também em sua composição grande quantidade dos óleos linoleico e linolênico, que são poli-insaturados.

Esses óleos, dentre outros, estão sendo utilizados atualmente pelos consumidores nos processos de umectação da fibra capilar e por isso o interesse crescente em desvendar seu mecanismo de entrada ou não na fibra capilar, interações internas com as estruturas do córtex e proteção da superfície.

A Figura 2 ilustra o espectro de MALDI-TOF/TOF da superfície de uma fibra capilar descolorida, descolorida tratada com óleo de coco e o óleo de coco.

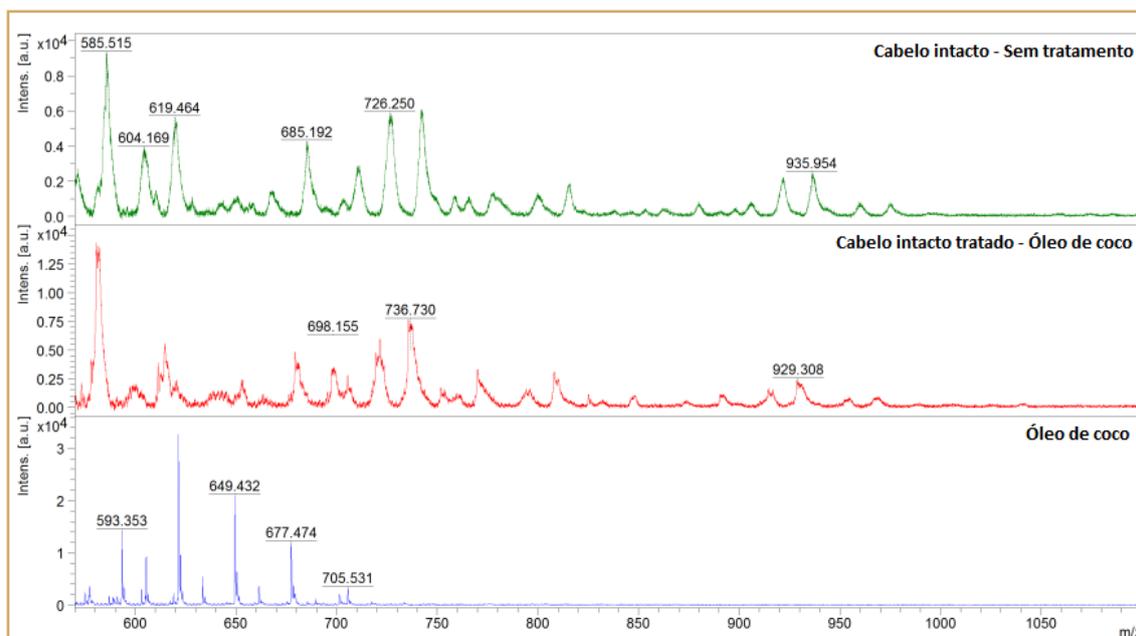


Figura 2. Espectro de MALDI-TOF/TOF da superfície de uma fibra capilar descolorida (topo), descolorida tratada com óleo de coco (meio) e do óleo de coco (baixo).

O espectro observado não possui nenhum sinal dos picos observados no óleo de coco. No entanto, observa-se um deslocamento de picos da fibra capilar tratada em relação à não tratada. Essa observação pode ser sugestiva de que algumas moléculas do óleo de coco podem ter interagido moléculas da superfície da fibra descolorida. Para comprovação desta hipótese melhoramentos dos ajustes experimentais do equipamento devem ser realizados.

A Figura 3 ilustra o espectro de MALDI-TOF/TOF do corte seccional longitudinal de uma fibra capilar descolorida, descolorida tratada com óleo de coco e do óleo de coco novamente, para referência.

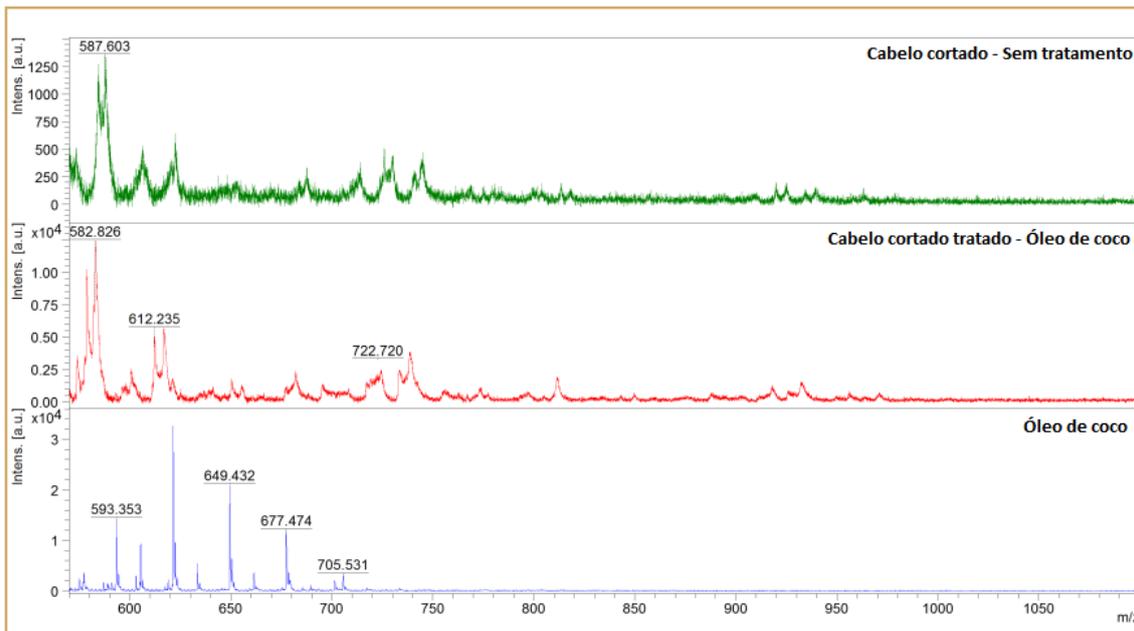


Figura 3. Espectro de MALDI-TOF/TOF do córtex de uma fibra capilar descolorida (topo), descolorida tratada com óleo de coco (meio) e do óleo de coco (baixo).

Na Figura 3 pode-se observar a presença dos picos do óleo de coco em 616,0; 650,0 e 773,0 m/z . Observa-se diferenças sutis entre os espectros de córtex sem tratamento e o córtex do cabelo tratado com óleo de coco. Os picos da amostra tratada coincidem com os do óleo de coco. Essa comparação sugere que o óleo de coco permeou a fibra capilar e penetrou no córtex. O processo oxidativo decorrente da descoloração gera na fibra capilar um aumento de ligações insatisfeitas, cisteína, ácido cisteico, diversos radicais dissulfídicos, produtos de degradação da melanina, dentre outros.¹³ De uma forma geral o córtex da fibra torna-se mais polar e mais susceptível à interações com moléculas polares. Quando comparados os espectros da fibra tratada e não tratada, observou-se o mesmo deslocamento de picos, observados na superfície. Novamente, neste caso, esse deslocamento pode ter ocorrido em decorrência de interações entre o óleo de coco e o córtex da fibra capilar. Um estudo anterior realizado com a técnica de MALDI-TOF demonstrou a permeação do óleo de coco para dentro da fibra capilar e sua disposição na mesma.¹⁰ No mesmo trabalho os autores sugerem que o óleo de coco, por possuírem moléculas com caráter preferencialmente polares e cadeias mais planas, tem maior atividade e afinidade com o córtex mais polar.

A Figura 4 ilustra o espectro de MALDI-TOF/TOF da superfície de uma fibra capilar descolorida, descolorida tratada com óleo de abacate e do óleo de abacate.

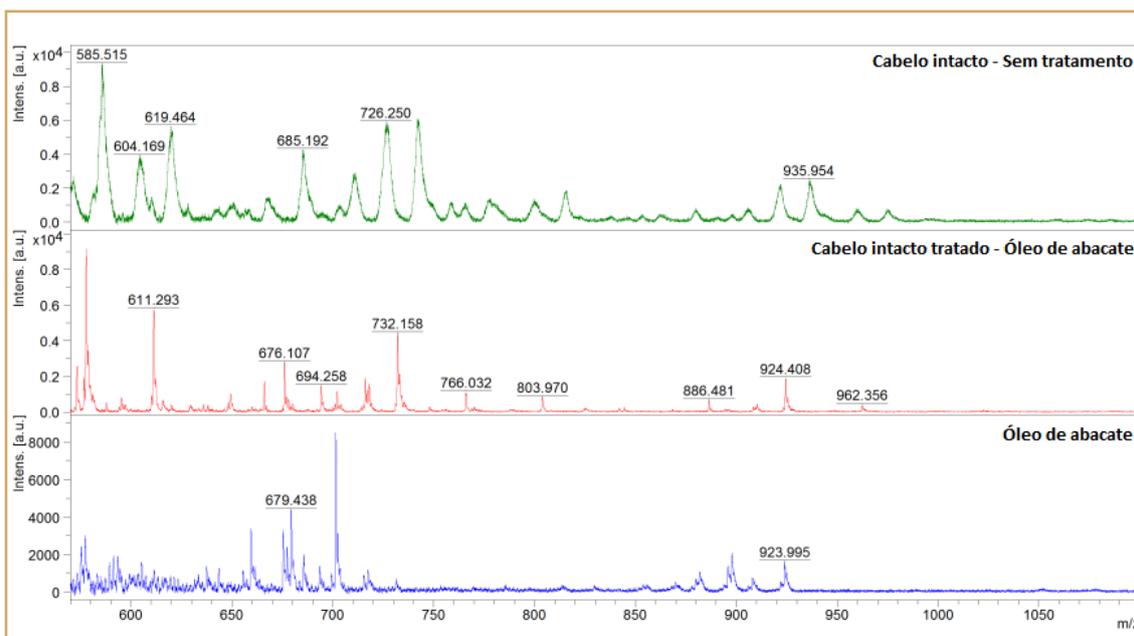


Figura 4. Espectro de MALDI-TOF/TOF da superfície de uma fibra capilar descolorida (topo), descolorida tratada com óleo de abacate (meio) e o óleo de abacate (baixo).

Na Figura 4 pode-se observar a presença dos picos do óleo de abacate na superfície da fibra em 679,4; 701,4; 717,4; 732,2; 895,8; 908,0 e 924,0 m/z . Os picos da amostra tratada coincidem com os do óleo de abacate. Essa comparação sugere que o óleo de abacate se depositou sobre a fibra capilar. O sinal obtido para esse óleo em relação ao de coco foi maior e mais claro. Ademais, o óleo de abacate possui moléculas de maior peso molecular em relação ao anterior tendo sinais acima de 800 m/z .

A Figura 5 ilustra o espectro de MALDI-TOF/TOF do córtex de uma fibra capilar descolorida, descolorida tratada com óleo de abacate e o óleo de abacate.

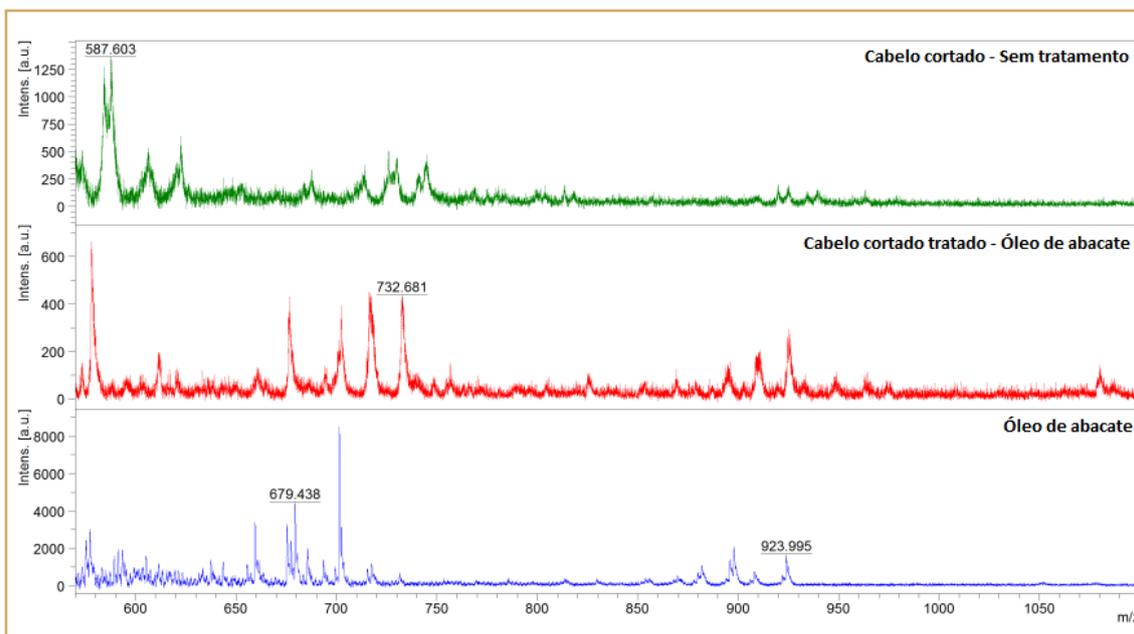


Figura 5. Espectro de MALDI-TOF/TOF do córtex de uma fibra capilar descolorida (topo), descolorida tratada com óleo de abacate (meio) e do óleo de abacate (baixo).

Na Figura 5 pode-se observar a presença dos picos do óleo de abacate no córtex da fibra em 679,4; 701,4; 717,4; 732,2; 895,8; 908,0 e 924,0 m/z , como encontrados na superfície.

Esse fato demonstra que mesmo contendo algumas moléculas de peso molecular maiores que o óleo de coco, as mesmas permeiam para dentro do córtex da fibra. Esse fato sugere que a permeação está fortemente relacionada às estruturas terciárias das moléculas em questão, que no caso são mais lineares, e da sua polaridade. A diferença em relação ao óleo de coco é que no caso do óleo de abacate a presença de moléculas na superfície foi nitidamente maior. Dessa forma o óleo de abacate interage tanto com a superfície, mais apolar, assim como com o córtex mais polar.

A Figura 6 ilustra o espectro de MALDI-TOF/TOF do córtex de uma fibra capilar descolorida, descolorida tratada com óleo de argan e do óleo de argan.

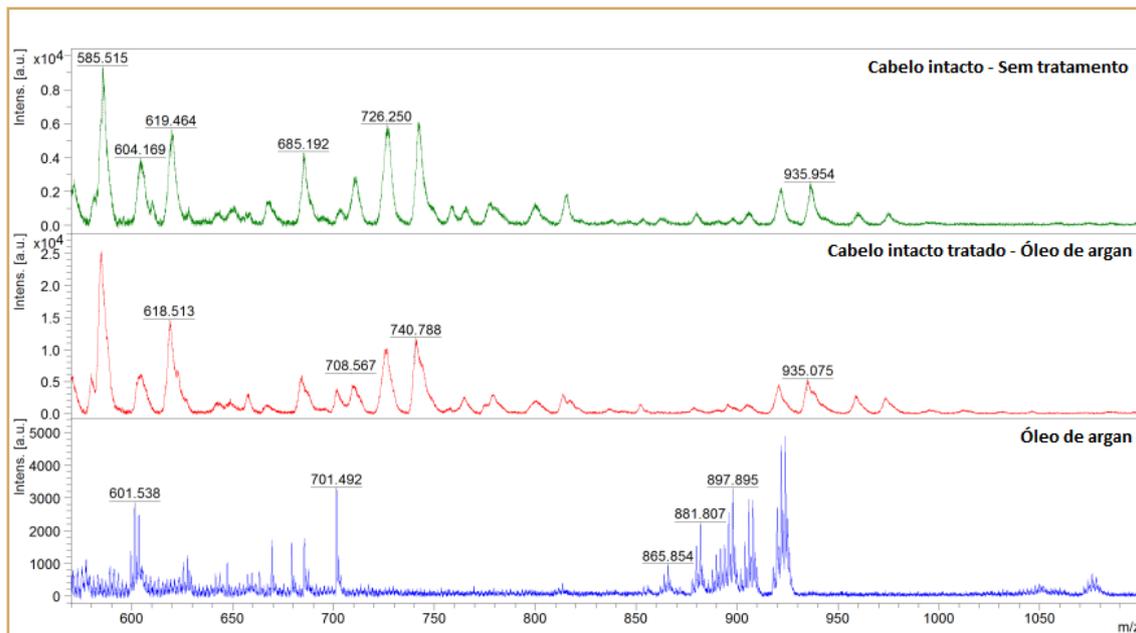


Figura 6. Espectro de MALDI-TOF da superfície de uma fibra capilar descolorida (topo), descolorida tratada com óleo de argan (meio) e do óleo de argan (baixo).

Na Figura 6 pode-se observar a presença dos picos do óleo de argan na superfície da fibra em $897,0 m/z$. Os picos da amostra tratada coincidem com os do óleo de argan. O óleo de argan possui algumas moléculas de maior peso molecular que do óleo de coco e de abacate. Ademais, é rico além de ácidos graxos monoinsaturados possui os linoleico e linolênico que são poli-insaturados.¹² As poli-insaturações modificam a estrutura terciária das moléculas deixando-as mais apolares, com menor atividade, resultando em uma tendência aumentada a ocorrência de impedimento estérico. Não se observa-se neste caso deslocamento dos picos da amostra tratada em relação à não tratada sugerindo que o óleo de argan tem menor interação molecular com a superfície que o óleo de abacate e provavelmente o óleo de coco.

A Figura 7 ilustra o espectro de MALDI-TOF da superfície de uma fibra capilar descolorida, descolorida tratada com óleo de argan e do óleo de argan.

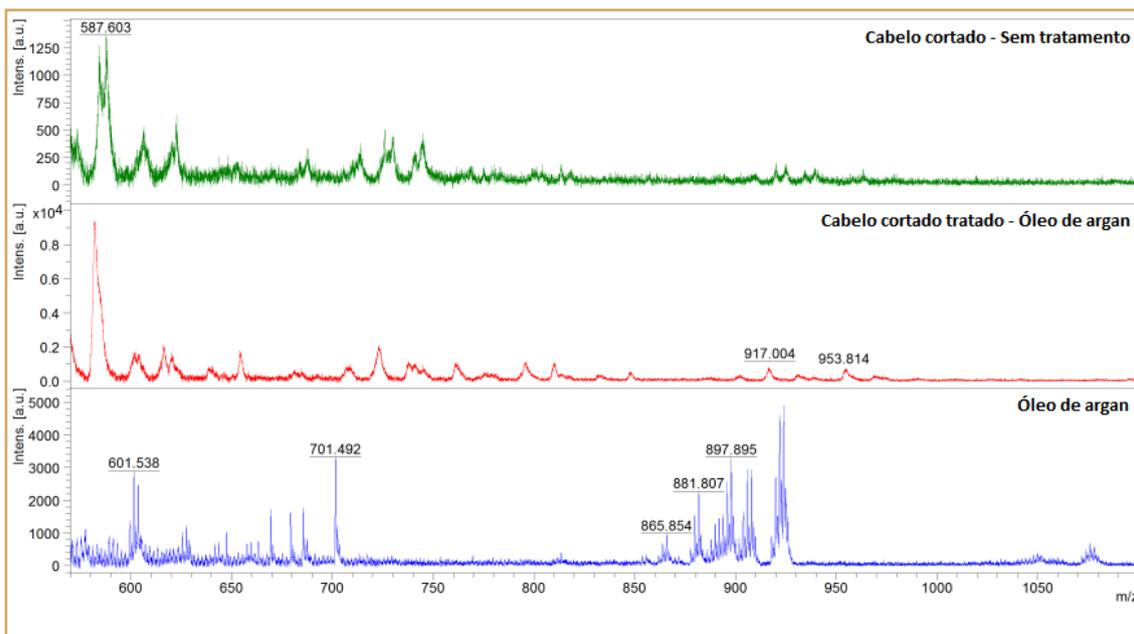


Figura 7. Espectro de MALDI-TOF do córtex de uma fibra capilar descolorida (topo), descolorida tratada com óleo de argan (meio) e o óleo de argan (baixo).

Na Figura 7 pode-se observar a presença dos picos do óleo de argan no córtex da fibra em 601,5; 647; 684 e 685,0 *m/z*. Os picos da amostra tratada coincidem com os do óleo de argan com moléculas de menor peso molecular. A comparação entre os espectros da amostra tratada e não tratada não demonstra deslocamento de picos, sugerindo uma interação molecular menor do óleo de argan com o córtex polar da fibra capilar. Moléculas de peso molecular maior, menor atividade devido à agrupamentos poli-insaturados não foram encontrados no interior da fibra.

CONCLUSÃO

Os resultados preliminares da técnica de MALDI-TOF/TOF mostraram-se promissores na detecção de moléculas orgânicas na superfície e córtex da fibra capilar, abrindo um vasto campo de análise de presença e interação de ativos cosméticos com a fibra capilar. O procedimento analítico no preparo da amostra e na análise são inéditos, contribuindo significativamente para a indústria cosmética.

O óleo de coco não foi encontrado na superfície da fibra, mas o deslocamento dos picos da amostra tratada e não tratada sugere a presença do óleo e interação molecular com a superfície, e estudos mais detalhados sobre este aspecto se faz necessário. Por outro lado, diversos picos do óleo de coco foram encontrados no córtex da fibra. Os picos entre amostra tratadas e não tratadas mostraram-se deslocados sugerindo também a interação molecular do óleo com o córtex.

Diversos picos bem definidos do óleo de abacate foram encontrados na superfície da fibra e também no córtex da fibra. Os picos entre amostra tratadas e não tratadas mostraram-se deslocados sugerindo uma interação molecular do óleo com o córtex e superfície.

Algumas moléculas de baixo peso molecular do óleo de argan foram encontradas no córtex da fibra e algumas de mais alto peso molecular na superfície. Não se observou deslocamento dos picos entre amostra tratada e não tratada sugerindo que esse óleo tem menor interação molecular tanto com a fibra com a superfície.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, projeto PIPE-SEBRAE de número 2021/12099-8 pelo apoio financeiro à essa pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gummer, C. L. Elucidating Penetration Pathways into the Hair Fiber Using Novel Microscopic Techniques. *J. Cosmet. Sci.* **2001**, *52*, 265-280.
2. Tanamachi, H.; Tokunaga, S.; Tanji, N.; Oguri, M.; Inoue, S. 18-MEA and hair appearance. *J. Cosmet. Sci.* **2010**, *61*, 147-160.
3. Carr, C. M.; Leaver, I. H.; Hughes, A. E. Photoelectron spectroscopy and the surface chemistry of wool. *Textile Research Journal* **1986**, *56*, 457.
4. Korner, A.; Wortmann, G., Isolation of 18-MEA containing proteolipids from wool fibre cuticle. In *Proceedings 11th International Wool Textile Research Conference*, Leeds (UK), 2005; pp 4-9.
5. Gode, V.; Bhalla, N.; Shirhatti, V.; Mhaskar, S. Quantitative measurement of the penetration of coconut oil into human hair using radiolabeled coconut oil. *J. Cosmet. Sci.* **2012**, *63*, 27-31.
6. Robbins, C. R., *Chemical and Physical Behaviour of Human Hair*. Springer-Verlag: New York, 1988.
7. Kuzuhara, A. Analysis of structural change in keratin fibers resulting from chemical treatments using Raman spectroscopy. *Biopolymers* **2005**, *77*, 335-344.
8. Swift, J. A.; Chahal, S. P.; Challoner, N. I.; Parfrey, J. E. Investigation on the penetration of hydrolyzed wheat proteins into human hair by confocal laser-scanning fluorescence microscopy. *J. Cosmet. Sci.* **2000**, *51*, 193-203.
9. Kamata, T.; Shima, N.; Sasaki, K.; Matsuta, S.; Takei, S.; Katagi, M.; Miki, A.; Zaito, K.; Nakanishi, T.; Sato, T.; Suzuki, K.; Tsuchihashi, H. Time-Course Mass Spectrometry Imaging for Depicting Drug Incorporation into Hair. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 5476-5481.
10. Ruetsch, S. B.; Kamath, Y. K.; Rele, A. S.; Mohile, R. B. Second ion mass spectrometric investigation of penetration of coconut and mineral oils into human hair fibers: Relevance to hair damage. *J. Cosmet. Sci.* **2001**, *52*, 169-184.
11. Kempson, I. M.; Skinner, W. M.; Kirkbride, P. K. A. Method for the Longitudinal Sectioning of Single Hair Samples. *J Forensic Sci* **2002**, *47*.
12. Ribeiro, A. C.; Jr, D. A.; Souza, V. M., *Tricologia e cosmética capilar*. Companhia Farmacêutica de Publicações Ltda: 2021; Vol. 1, p 312.
13. Robbins, C.; Kelly, C. Amino acid analysis of cosmetically altered hair. *J. Soc. Cosmet. Chem* **1969**, *20*, 555-564.