

# POR DENTRO DOS DOMÍNIOS DA QUERATINA ALFA: UM ENTENDIMENTO DAS MODIFICAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS GERADAS POR ALISANTES BÁSICOS E ÁCIDOS

Valéria M. Longo<sup>1\*</sup>; Letícia Bernardes<sup>1</sup>; Iêda L. V. Rosa<sup>2</sup>; Elson Longo<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Katléia Lab, Centro Avançado de Diagnóstico Capilar, São Paulo, Brasil

<sup>2</sup> CDMF, Departamento de Química, UFSCar, São Paulo, Brasil

\* [valeria@katleia.com.br](mailto:valeria@katleia.com.br)

## RESUMO

Nesse trabalho comparou-se aspectos físico-químicos de fibras capilares caucasianas e afro padrão e alisadas com TGA e ácido glioxílico.

As caracterizações foram realizadas utilizando as técnicas: Espectroscopia de Fluorescência do Triptofano (Trp); Resistência Mecânica (RM) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) em cadinho fechado.

Os resultados de espectroscopia de fluorescência demonstraram que as fibras capilares afro sofrem uma diminuição maior da concentração de Trp que as caucasianas indicando que a matriz amorfa extra celular da primeiras é mais afetada que da última.

Quando tratadas com TGA as fibras caucasianas perderam 50% de sua resistência mecânica, ficaram mais maleáveis, apresentaram uma leve diminuição da sua matriz extracelular e completa destruição da sua matriz intracelular.

As fibras caucasianas tratadas com o ácido glioxílico perderam aproximadamente 50% de sua resistência mecânica, ficaram mais rígidas, apresentaram uma leve diminuição da sua matriz extracelular e pequena diminuição da densidade de pontes dissulfeto nas células corticais (matriz intracelular).

As fibras afro tratadas com TGA tiveram redução de aproximadamente 50% de sua resistência mecânica, ficaram mais maleáveis, apresentaram uma diminuição moderada da sua matriz extracelular e diminuição da sua matriz intracelular.

As fibras afro tratadas com o ácido glioxílico perderam aproximadamente 5% de sua resistência mecânica, ficaram mais rígidas, apresentaram uma diminuição moderada da sua matriz extracelular e diminuição moderada da densidade de pontes dissulfeto nas células corticais (matriz intracelular).

Os resultados apresentados nesse trabalho demonstraram a crescente necessidade de conhecimento da estrutura capilar resultante de diversos tratamentos químicos, segundo suas diferentes especificidades, para tratamentos cosméticos realmente assertivo.

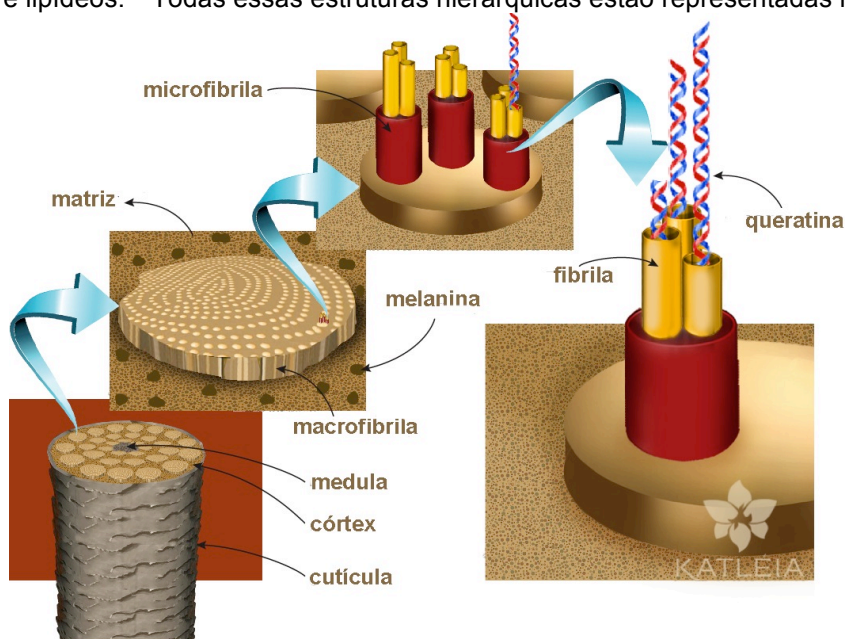
**Palavras Chaves:** fibras capilares caucasianas; fibras capilares afro; alisamento; matriz extracelular; matriz intracelular; células corticais.

## 1. INTRODUÇÃO

A fibra capilar é um biopolímero formada por uma estrutura fibrosa de proteínas que pertencem à família da queratina e é dividida em três principais estruturas: cutícula, córtex e medula (pode estar presente ou não na fibra capilar).<sup>[1]</sup>

A cutícula é a camada mais externa da fibra capilar, e constitui cerca de 10% da fibra, formada por um material protéico e amorfo, é responsável pela proteção das células corticais. Ela também tem função de regular o egresso e ingresso de água. É translúcida e livre de pigmentação, os processos químicos e físicos podem induzir à quebra ou lixiviação dessa estrutura.<sup>[1-4]</sup>

O córtex constitui cerca de 88% da massa capilar, é responsável pelas propriedades físicas e mecânicas, bem como a estabilidade estrutural e resistência à tração. Parte intermediária da fibra, é formado por microfibrilas de queratina orientadas paralelamente ao eixo axial da fibra, sendo que mudanças nas propriedades mecânicas do cabelo são atribuídas a mudanças dessa estrutura. As microfibrilas contêm as microfibras que são formadas por uma dupla hélice de queratina tridimensional cristalina, todo conjunto está incorporado em uma matriz amorfa que é rica em cistina. Uma pequena quantidade do total da massa de fibras pode ser atribuído aos pigmentos de melanina e lipídeos.<sup>[5]</sup> Todas essas estruturas hierárquicas estão representadas na Figura 1.

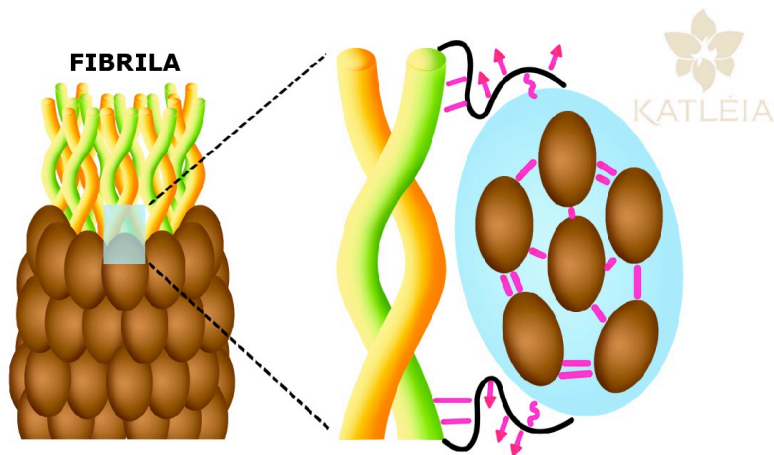


**Figura1.** Estrutura hierárquica da fibra capilar.

Suzuta et al.<sup>[6]</sup> sugeriram um modelo de ligação entre as microfibrilas e os glóbulos da matriz intracelular por meio da cistina. Também considerou que no córtex capilar a cistina pode estar em 5 locais diferentes, sendo eles: dentro da queratina, entre os filamentos de queratina, entre a fibrila e os glóbulos da matriz amorfa, entre os glóbulos da matriz e por fim dentro dos glóbulos da matriz (Figura 2).

Na estrutura do córtex capilar ainda se encontra a matriz extracelular onde situa-se a melanina.

Durante os processos de alisamento alguns alisantes atuam em ligações da cistina que estão mais na matriz ou na queratina, ou mesmo entre elas como veremos nos resultados desse trabalho.



**Figura 2.** Fibrilas, glóbulos da matriz amorfa e ligações da cistina.

O termo “raça” se aplica a subpopulações ou grupos de pessoas que apresentam várias características biológicas similares. No passado, as raças se desenvolviam e persistiam porque viajar longas distâncias era uma ação limitada. Dessa forma, pessoas similares interagiam e procriavam. As diferenças raciais ou geográficas que existem hoje, nos tipos de pele e de cabelo, podem ser remanescentes das primeiras adaptações dos seres humanos à temperatura e a outras influências ambientais.

Para classificar os tipos de cabelo, os grupos raciais podem ser divididos em três: caucasiano, oriental e afro.<sup>[7]</sup>

Uma classificação mais atual da acima citada compreende a divisão em grupos étnicos. Um dado grupo étnico possui semelhanças não só fisionômicas, mas também culturais. A determinação do grupo étnico a que pertence uma pessoa não é tarefa fácil e não pode ser considerada apenas pela cor.

No Brasil, particularmente, a mistura entre raças faz com que essa distinção de raças ou mesmo étnica incorra a erros, devido à grande diversidade existente. De la Mettrie et al.<sup>[8]</sup> apresentou um método no qual a fibra capilar é definida pela sua curvatura e não etnia.

A Figura 3 representa os diversos tipos capilares.



**Figura 3.** Tipos de cabelo conforme sua ondulação.

Apesar dessa classificação ser bastante útil a classificação por raça não pode ser descartada, pois o cabelo afro, caucasiano e afro possuem diferenças morfológicas e químicas. Assim, uma classificação mais assertiva deve considerar o tipo de cabelo e também sua origem racial predominante, como observaremos no estudo a seguir.

O córtex capilar não apresenta uma homogeneidade a nível celular devido a dois grupos

celulares predominantes, o ortho e para-cortex. A fração predominante desses dois grupos de células corticais depende da grupo étnico ao qual a fibra pertence e muitas vezes sua proporção é relacionada à curvatura final da fibra.<sup>[9-11]</sup>

A fibra capilar é um polímero que possui características físicas e químicas que podem ser facilmente modificadas, seja pelo comprimento, pela cor ou mesmo pela forma. Existe no mercado uma grande diversidade de produtos de transformação com finalidades diversas, entre eles, os alisantes, descolorantes e as colorações.<sup>[12]</sup>

Apesar de existir um número considerável de pesquisas sobre o cabelo humano, poucos dados estão disponíveis a cerca da influência de tratamentos químicos diversos em fibras capilares de diferentes etnias a nível molecular/celular.

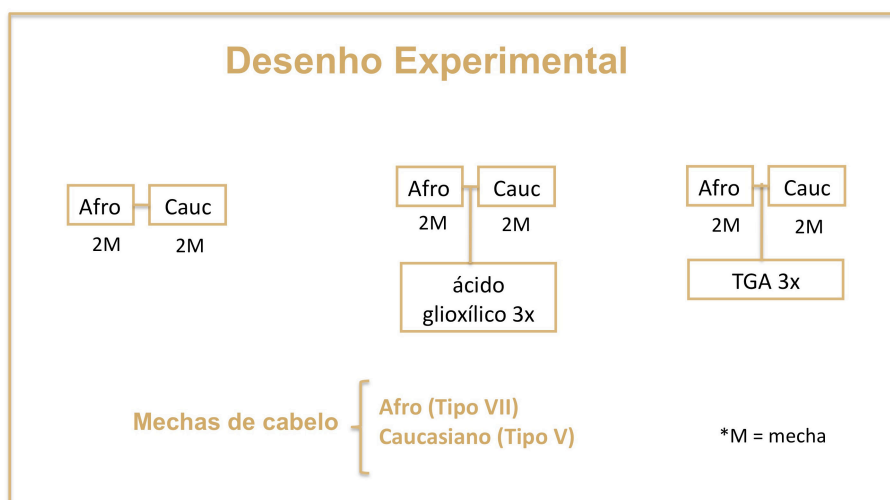
## 2. OBJETIVO

Esse trabalho teve como objetivo caracterizar por espectroscopia de triptofano (Trp), resistência mecânica e calorimetria diferencial exploratória (DSC) os danos físico químicos causados pelo alisamento com ácido glioxílico e tioglicolato de amônio (TGA) de fibras capilares caucasianas e afro. Os dados foram analisados comparativamente e uma nova estrutura nano/celular para o compósito queratina/matriz foi proposto à luz das medidas experimentais.

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1. Preparação das mechas

Foram preparadas ao todo 12 mechas sendo 6 caucasianas de cabelo do Tipo V e 6 mechas de cabelo afro do Tipo VII. O desenho experimental desse estudo encontra-se representado na Figura 4.



**Figura 4.** Fluxograma do desenho experimental realizado.

Todas as mechas foram previamente higienizadas utilizando 1ml de uma solução contendo 10% de um tensoativo aniônico (Lauril Éter Sulfato de Sódio) durante um minuto seguido de enxágue em água corrente e finalizado com água desmineralizada. As amostras passaram por um processo de secagem natural à 21°C.

O protocolo de alisamento com ácido glioxílico foi o seguinte:

O produto foi utilizado segundo instruções do fabricante. Aplicou-se 3g do produto sobre a mecha e penteou-se a mesma. Depois, aplicou-se a prancha térmica sobre a mecha, previamente aquecida a 180°C por 3 vezes. Após esse procedimento as mechas foram lavadas com água corrente por 5min posteriormente com água desmineralizada. Depois foram secas a temperatura ambiente por 24 horas. Após esse tempo todo esse processo foi repetido até completar-se 3 alisamentos.

O protocolo de alisamento realizado com o TGA foi o seguinte:

A aplicação do alisante contendo o princípio ativo tioglicolato de amônio foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante. Inicialmente, aplicou-se uniformemente 10mL do produto comercial com auxílio de um pincel de cerdas macias e aguardou-se 45 minutos em temperatura ambiente para as mechas ainda virgens e 30 minutos para as mechas previamente descoloridas. Transcorrido o repouso, massageou-se o cabelo até que ficasse com aparência lisa. Enxaguou-se

por 1 minuto em água corrente e, em seguida, com água desmineralizada. Então a mecha foi escovada e devidamente alinhada com auxílio de uma prancha modeladora. Deixou-se em repouso durante tempo necessário para a mecha esfriar para então proceder a etapa de neutralização, em que se aplicou uniformemente, com auxílio de um pincel, 20mL do agente oxidante comercializado juntamente com o produto alisante, que após 15 minutos de repouso, foi retirado em água corrente e lavado com água desmineralizada. Retirou-se o excesso de água e as mechas foram secas em temperatura ambiente ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) por 24h.

### **3.2. Caracterizações**

#### **Resistência Mecânica**

Para esse ensaio foi utilizado o equipamento da EMIC modelo DL500 dotado de um dinamômetro com célula de carga de 20N.

Foram avaliados 20 fios, recolhidos ao acaso, de cada mecha de cada grupo. Cada fio foi preso à uma garra inferior e uma garra superior ligada a uma célula de carga de um dinamômetro na parte superior. Foram avaliados os parâmetros: tensão de ruptura e deformação específica.

A célula de carga foi pré carregada, e o aumento na carga foi medido utilizando as taxas de velocidade de tração de 100mm/min. Todo o ensaio foi realizado em um ambiente climatizado ( $55 \pm 5\%$  de umidade relativa e  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ).

#### **Avaliação de triptofano (Trp) por Espectroscopia de Fluorescência**

Utilizou-se o espectrofotômetro de excitação e emissão Fluorolog - Jobin Yvan Horibe, modelo número FL3-12 com monocromador e lâmpada de xenônio. A linha de excitação utilizada, para medida do Trp, foi de 294 nm, que demonstrou ser a de maior intensidade na linha de emissão do Trp  $\sim 340$  nm. As mechas foram inseridas em um porta-amostra sob o ângulo de  $45^\circ$  em relação à célula fotomultiplicadora. Foram realizadas 3 análises de espectroscopia de emissão para cada grupo.

#### **Avaliação por calorimetria diferencial exploratória (DSC)**

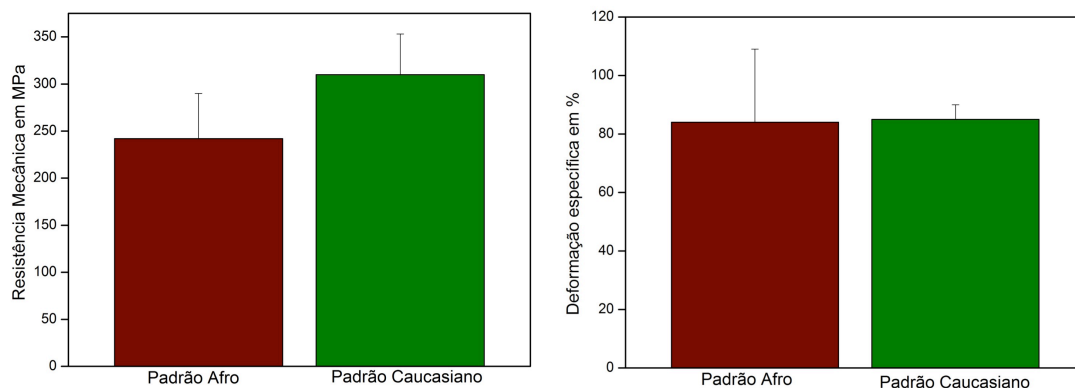
As análises térmicas da fibra capilar foram realizadas por meio de um equipamento NETZSCH Phoenix 204 Cell em cadinho fechado em meio aquoso na faixa de temperatura de 20 a  $180^\circ\text{C}$ .

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

Os processos de alisamento, cacheamento, coloração e descoloração da fibra capilar modificam a nível molecular e microscópico suas estruturas internas e externas. Durante esses processos as ligações dissulfídicas da queratina e da matriz são ocasionalmente quebradas e recombinadas em diferentes lugares.<sup>[13]</sup> Esses processos de oxidação e redução das proteínas e aminoácidos da fibra, são responsáveis, a nível molecular, por sua degradação.<sup>[14, 15]</sup> A análise do conteúdo de aminoácidos após a descoloração (oxidação) mostram que o conteúdo de cistina, metionina e tirosina diminuem enquanto que o conteúdo de ácido cisteico aumenta.<sup>[16, 17]</sup> Mais recentemente, análises de Raman indicaram que os processos de oxidação e redução na fibra capilar conduzem à desordem da queratina.<sup>[18]</sup>

#### **Diferenças entre os padrões afro e caucasiano**

A Figura 5 ilustra a tensão de ruptura e deformação específica comparativa entre o cabelo caucasiano e afro avaliado.



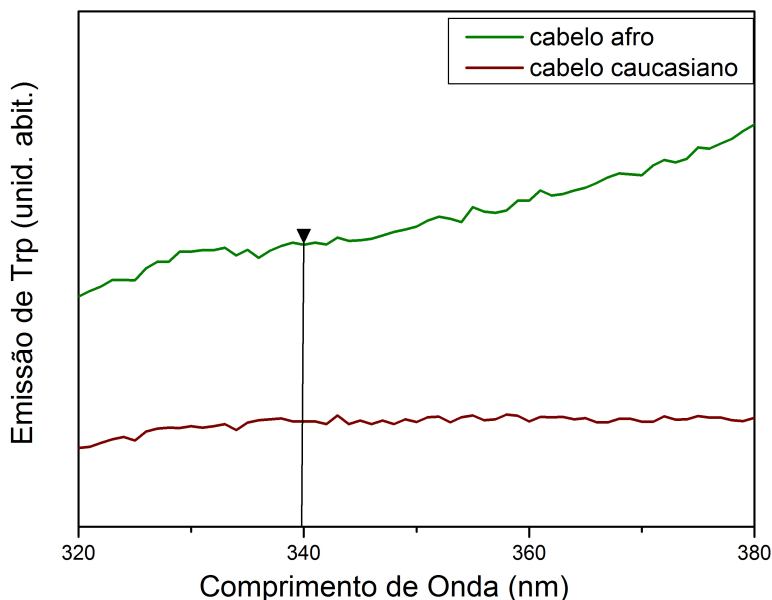
**Figura 5.** Mechas padrões afro e caucasiana virgens: a) tensão de ruptura; e b) deformação específica.

A tensão de ruptura é uma medida macroscópica que representa de maneira direta o grau de integridade da queratina- $\alpha$ .<sup>[15]</sup> Assim, uma diminuição de aproximadamente 25% na tensão de ruptura da fibra capilar após três descolorações indica que 25% da queratina foi degradada no processo de descoloração.

A deformação específica indica a maleabilidade ou emoliência da fibra capilar. A deformação específica é uma medida indireta do que está ocorrendo na matriz amorfa da fibra, rica em cistina. O aumento de maleabilidade indica que as ligações entre os glóbulos da matriz e a queratina estão diminuindo permitindo assim que a fibra se deforme mais (vide Figura 2).

Em valores absolutos, sem considerar a barra de erro, o cabelo caucasiano é 22% mais resistente que o cabelo afro. Quanto à maleabilidade os valores encontrados são praticamente os mesmos. No entanto, a variabilidade no cabelo afro é 80% maior.

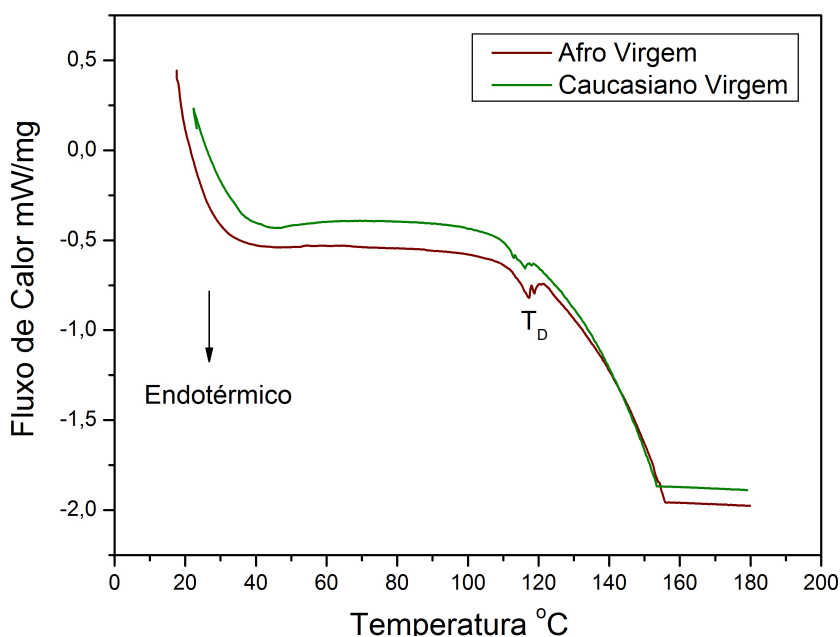
A Figura 6 ilustra as curvas de emissão do Trp dos padrões afro e caucasiano com excitação em 294 nm e emissão na faixa de 300 a 400 nm com máximo de emissão em 340 nm.



**Figura 6.** Emissão fluorescente do Trp excitado a 294 nm com emissão na faixa de 300 a 400 nm para os padrões de fibras capilares afro e caucasianas.

Observa-se que a emissão máxima em 340 nm das fibras capilares afro é aproximadamente 25% maior que das fibras caucasianas. Como a intensidade de Trp é uma medida indireta de sua concentração na fibra capilar, esse resultado indica que as fibras afro possuem cerca de 25% a mais de Trp que as caucasianas. Assim, estão naturalmente mais protegidas das radiações UV provenientes do ambiente externo. Também é indicativo de maior quantidade de matriz extra celular das fibras afro, onde fica localizado o Trp, comparativamente às fibras caucasianas.

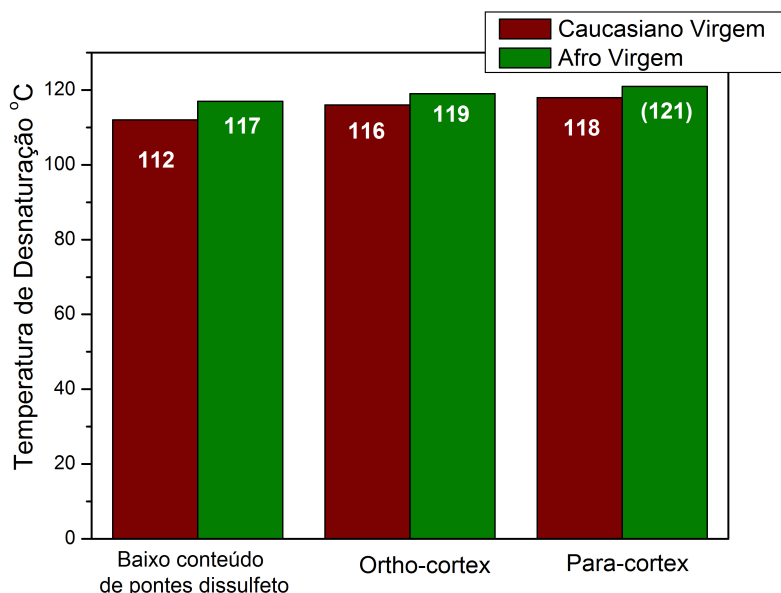
A Figura 7 ilustra as curvas de degradação da queratina alfa dos padrões afro e caucasiano.



**Figura 7.** Curva característica de degradação da queratina alfa. Os picos correspondentes à  $T_D$  representam a temperatura de desnaturação da queratina alfa.

Worftmann et al.<sup>[11]</sup> recentemente atribuíram os três picos correspondentes a essa região de desnaturação à matriz intra celular presente nas células ortho e para-corticais. O primeiro pico, em temperatura mais baixa, foi atribuído à presença de matriz com baixo conteúdo de ligações dissulfeto. O segundo pico está relacionado a células ortho-corticais e por último o terceiro à células para-corticais.

A Figura 8 demonstra as diferenças encontradas da análise da região de desnaturação das fibras caucasianas de afro.



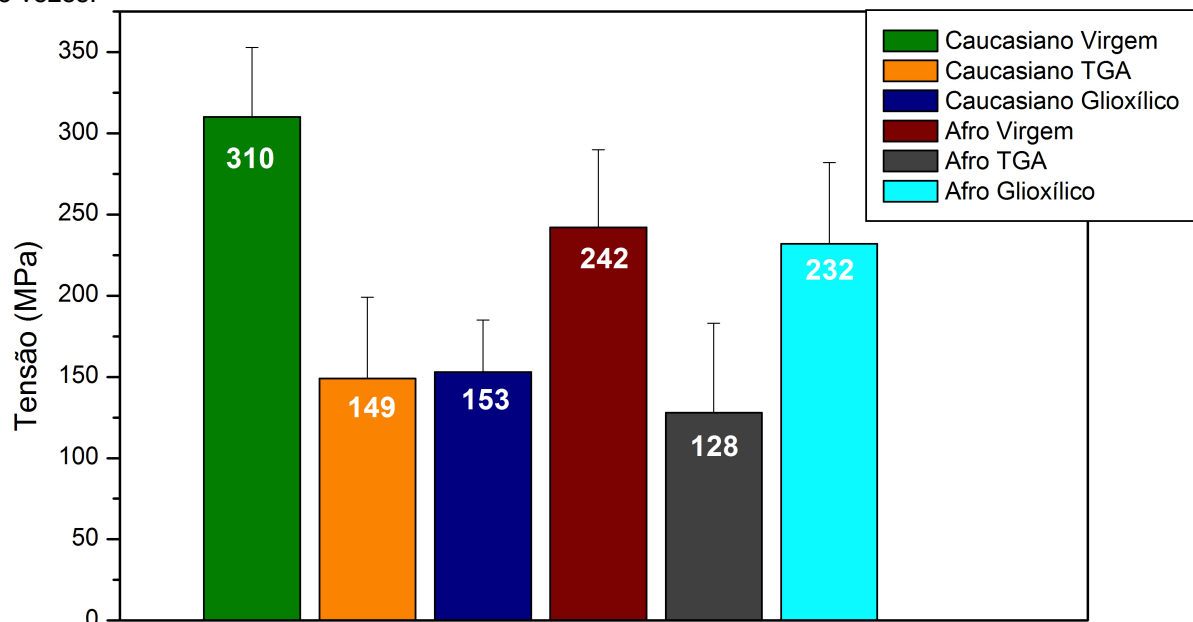
**Figura 8.** Diferença entre as temperaturas de desnaturação das fibras afro e caucasianas.

Quanto maior a temperatura apresentada do pico correspondente a cada fase (célula cortical) maior é a densidade de pontes dissulfeto.<sup>[11]</sup> Percebe-se assim, que a fibra afro apresentou maior quantidade de pontes dissulfeto em todas as matizes intracelulares observadas.

### Diferenças entre as fibras capilares alisadas afro e caucasianas

O ácido glicólico é comercializado em solução aquosa e é misturado a um creme neutro que serve de veículo para depositá-lo sobre as mechas de cabelo. Até o momento da escrita desse trabalho é considerado um alisante **proibido** pela ANVISA.

A Figura 9 ilustra a tensão de ruptura entre cabelo caucasiano e afro alisados com formol por 3 vezes.



**Figura 9.** Tensão de ruptura de cabelos afro e caucasianos tratados com TGA e ácido glicólico; dados comparativos.

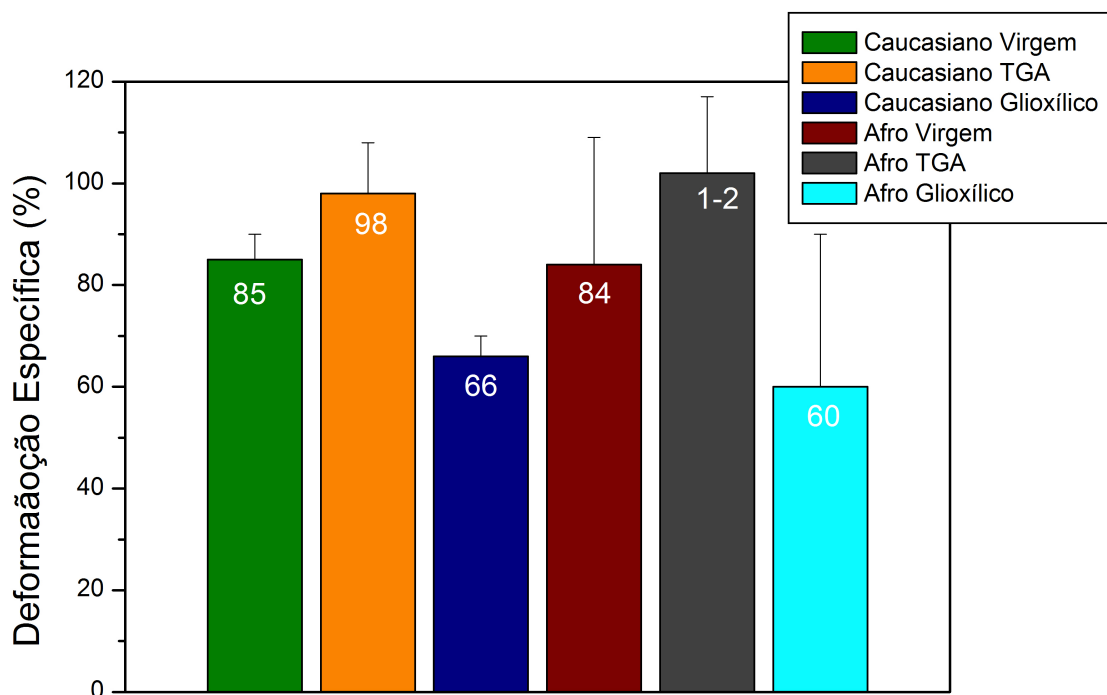
O padrão caucasiano, como comentado anteriormente é cerca de 22% mais resistente que o cabelo afro. Quando observamos o grupos alisados percebe-se que os cabelos afro e caucasiano têm uma perda semelhante de resistência mecânica quando comparados ao seu padrão (aproximadamente 50%).

Os dados comparativos para o ácido glicólico demonstram que o cabelo afro tem sua resistência mecânica menos afetada que o cabelo caucasiano nesse alisamento.

Como a tensão é um reflexo da integridade da queratina alfa pode-se dizer que o alisamento ácido conserva mais a queratina dos cabelos afro que o alisamento básico com TGA.

Uma análise comparativa da deformação específica dos padrões e dos grupos alisados estão representados na Figura 10.



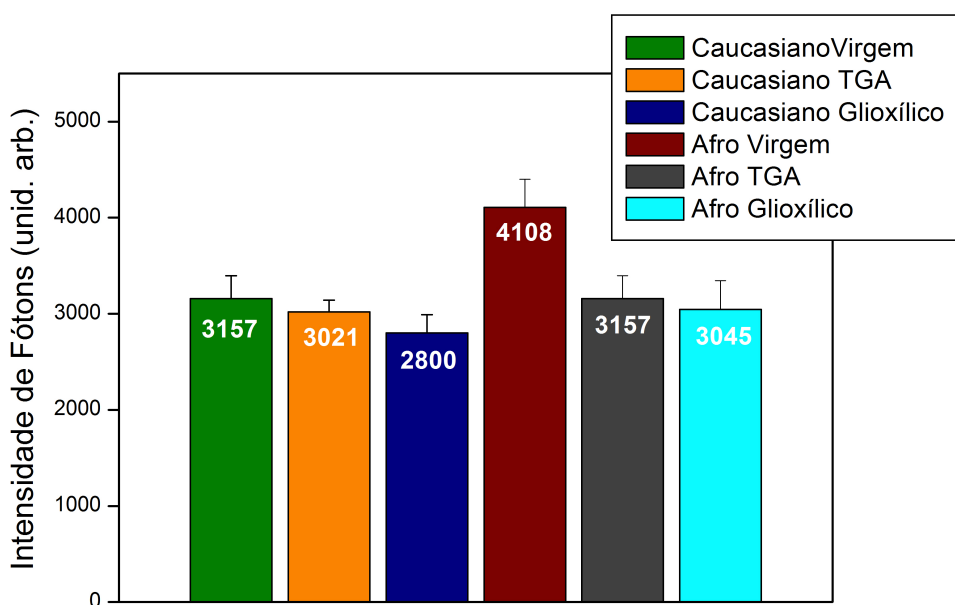


**Figura 10.** Análise comparativa da deformação específica dos padrões e dos grupos alisados.

Observa-se que o TGA (alisante básico) aumentam a deformação específica enquanto que o ácido glicoxílico (alisante ácido) diminuem a mesma. Como a propriedade de deformação está relacionada à matriz intracelular, percebe-se que por ela ser mais abundante no cabelo afro também é mais influenciada durante os tratamentos químicos.

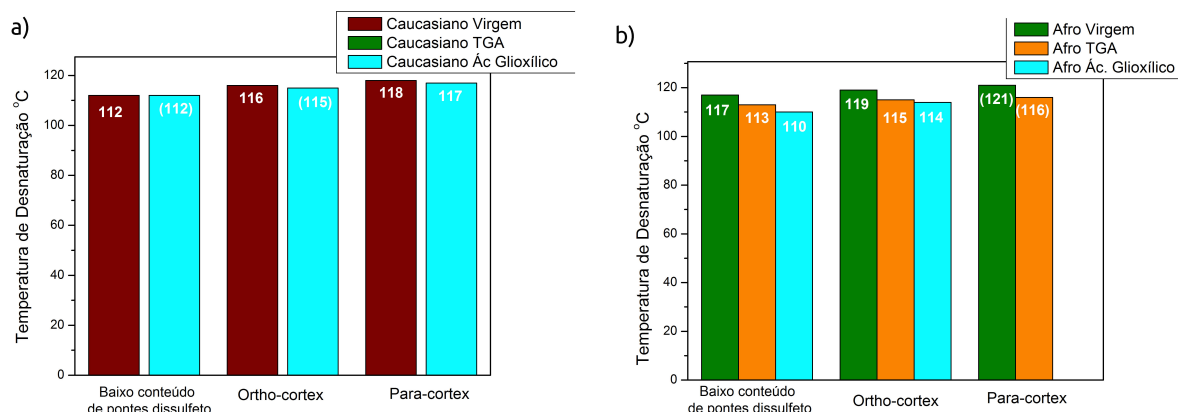
A Figura 11 ilustra as medidas comparativas espectroscopia de emissão. A emissão máxima de Trp a 340 nm foi utilizada como referência para medida dos resultados.

A emissão de Trp é uma medida indireta das modificações ocorridas na matriz extracelular do cortex, onde se situa. A observação da Figura mostra que os alisantes básicos e ácidos tiveram pouca influência nos cabelos caucásianos. No entanto, atuaram mais nos cabelos afro. O cabelo afro é mais rico em matriz extracelular que o caucásiano. É provável que essa seja a causa de uma maior degradação dessa estrutura pelos alisantes.



**Figura 11.** Emissão de Trp para os padrões virgem e alisados no máximo de emissão a 340 nm.

A Figura 12 demonstra as diferenças encontradas da análise da região de desnaturação das fibras caucasianas e afro padrões e alisadas.



**Figura 12.** Diferenças entre as temperaturas de desnaturação das fibras afro e caucasianas padrões e alisadas.

Na Figura 12a observa-se as temperaturas de desnaturação observadas no padrão virgem e alisados para o cabelo caucasiano. O alisamento com TGA não está representado, pois não foram observados nenhum pico, demonstrando uma total degradação da matriz intracelular por esse alisante. Nesse caso, o processo de neutralização que teoricamente refaz as ligações dissulfeto não ocorreu. Por outro lado, no caso do ácido glicóxico houve diminuição da temperatura dos picos das células do ortho e para córtex mostrando que o ácido glicóxico atuou diminuindo a densidade de ligações dissulfeto. A matriz referente à região de baixo conteúdo de pontes dissulfeto não sofreu alteração.

Na Figura 12b observa-se as temperaturas de desnaturação observadas no padrão virgem e alisados para o cabelo afro. O alisamento com TGA degrada menos as pontes dissulfeto que o ácido glicóxico. No caso do ácido glicóxico, as células corticais do para-córtex foram totalmente degradadas.

## 5. CONCLUSÕES

Esse trabalho comparou aspectos físico-químicos de fibras capilares caucasianas e afro padrão e alisadas com TGA e ácido glicóxico.

Observou-se que as fibras capilares afro possuem 25% a mais de Trp que as fibras caucasianas possuindo assim, maior proteção solar natural. Quanto ao aspecto de resistência mecânica as fibras caucasianas apresentam-se cerca de 22% mais resistente indicando que possuem a mesma proporção superior de queratina quando comparadas às fibras afro. A deformação específica das fibras afro e caucasianas mostraram-se estatisticamente iguais.

Quando tratadas com TGA as fibras caucasianas perderam 50% de sua resistência mecânica, ficaram mais maleáveis, apresentaram uma leve diminuição da sua matriz extracelular e completa destruição da sua matriz intracelular. Assim, esse alisante atua principalmente nas células corticais do cabelo caucasiano degradando sua estrutura.

As fibras caucasianas tratadas com o ácido glicóxico perderam aproximadamente 50% de sua resistência mecânica, ficaram mais rígidas, apresentaram uma leve diminuição da sua matriz extracelular e pequena diminuição da densidade de pontes dissulfeto nas células corticais (matriz intracelular). Esse alisante no cabelo caucasiano atua na queratina, porém preserva a coesão entre as microfibrilas.

As fibras afro tratadas com TGA tiveram redução de aproximadamente 50% de sua resistência mecânica, ficaram mais maleáveis, apresentaram uma diminuição moderada da sua matriz extracelular e diminuição da sua matriz intracelular. Assim, esse alisante no cabelo afro atua na queratina, porém preserva a coesão entre as microfibrilas, atua também na matriz extracelular degradando moderadamente essa estrutura.

As fibras afro tratadas com o ácido glicóxico perderam aproximadamente 5% de sua resistência mecânica, ficaram mais rígidas, apresentaram uma diminuição moderada da sua matriz extracelular e diminuição moderada da densidade de pontes dissulfeto nas células corticais (matriz intracelular). Esse alisante no cabelo afro degrada muito pouco na queratina, preserva a coesão entre

as microfibrilas, porém destroi as células do para-córtex e degrada a matrix extra-celular.

Os resultados apresentados nesse trabalho demonstram a crescente necessidade de conhecimento da estrutura capilar resultante de diversos tratamentos químicos, segundo suas diferentes especificidades, para tratamentos cosméticos realmente assertivo.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio dos órgãos financiadores FAPESP 2013/07296-2 e 2016/15454-5, CAPES, e CNPq.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. V. M. Longo, A. da Silva Pinheiro, J. R. Sambrano, J. A. M. Agnelli, E. Longo and J. A. Varela *International Journal of Cosmetic Science*, **2013**, 35, 539-545.
2. C. Bolduc and J. Shapiro *Clin. Dermat.*, **2001**, 19, 431-436.
3. J. M. Maxwell and M. G. Huson *Micron*, **2005**, 36, 127-136.
4. R. L. McMullen, S. Chen and D. J. Moore, 246–25, 2012. *International Journal of Cosmetic Science*, **2012**,
5. A. Kuzuhara *Biopolymers*, **2005**, 77, 335-344.
6. K. Suzuta, S. Ogawa, Y. Takeda, K. Kaneyama and K. Ara *J. Cosmet. Sci.*, **2012**, 63, 177-196.
7. Adriano S Pinheiro, Diogo Terci, Francini Picon, Viviane Albarici and Valeria M. Longo *Cosmetics & Toiletries*, **2013**,
8. G. Loussouarn, Anne-Lise Garcel, Isabelle Lozano, Catherine Collaudin, Crystal Porter, Ségolène Panhard, Didier Saint-Léger and Roland de La Mettrie *Internat. J. Dermat.*, **2007**, 46, 2-6.
9. F. J. Wortmann, G. Wortmann, J. Marsh and K. Meinert *J. Struct. Biol.*, **2012**, 177, 533-560.
10. F. J. Wortmann and H. Deutz *J. Appl. Polym. Sci.*, **1998**, 68, 1991-1995.
11. F. J. Wortmann and G. Wortmann *Experimental Dermatology*, **2018**,
12. V. M. Longo, V. F. Monteiro, A. S. Pinheiro, D. Terci, J. S. Vasconcelos, C. A. Paskocimas, E. R. Leite, E. Longo and J. A. Varela *International Journal of Cosmetic Science*, **2015**, 27, 1.
13. T. FUJII, Y. ITO, T. WATANABE and T. KAWASOE *J. Cosmet. Sci.*, **2012**, 63, 15-25.
14. M. L. Tate, Y. K. Kamath, S. B. Ruetsch and H. -D. Weigmann *Journal of the society of cosmetic chemical* **1993**, 44, 347-371.
15. C. Robbins, *Chemical and Physical Behaviour of Human Hair*. (Springer-Verlag, New York, 1988).
16. C. Robbins and C. Kelly *J. Soc. Cosmet. Chem*, **1969**, 20, 555-564.
17. L. J. Wolfram, K. Hall and I. Hui **1970**, 21, 875-900.
18. Francini C. Picon, Viviane C. Albarici, Diogo Terci, Douglas Terci, Valeria M. Longo, Elson Longo and Adriano S. Pinheiro *IFSCC Magazine*, **2014**, 3, 5-8.