



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Instituto de Química

Campus Araraquara - SP

Programa de Pós-graduação em Química

Departamento de Química Analítica

João Carlos de Souza

**Desenvolvimento de sensores eletroanalíticos e
métodos cromatográficos para avaliação das
reações de oxidação, mutagenicidade/toxicidade e
determinação de *p*-toluenodiamina e *p*-aminofenol
em águas residuárias mimetizando processos de
tintura de cabelos**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Valnice Boldrin Zanoni

Araraquara - SP

2020

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Instituto de Química

Campus Araraquara - SP

Programa de Pós-graduação em Química

Departamento de Química Analítica

João Carlos de Souza

**Desenvolvimento de sensores eletroanalíticos e
métodos cromatográficos para avaliação das
reações de oxidação, mutagenicidade/toxicidade e
determinação de *p*-toluenodiamina e *p*-aminofenol
em águas residuárias mimetizando processos de
tintura de cabelos**

Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Valnice Boldrin Zanoni

Araraquara - SP

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

S719d Souza, João Carlos de
Desenvolvimento de sensores eletroanalíticos e métodos cromatográficos para avaliação das reações de oxidação, mutagenicidade/toxicidade e determinação de *p*-toluenodiamina e *p*-aminofenol em águas residuárias mimetizando processos de tintura de cabelos / João Carlos de Souza. – Araraquara : [s.n.], 2020
237 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Maria Valnice Boldrin Zanoni

1. Corantes e tingimento. 2. Cabelo. 3. Queratinas.
4. Oxidação. 5. Águas residuais. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Desenvolvimento de sensores eletroanalíticos e métodos cromatográficos para avaliação das reações de oxidação, mutagenicidade/toxicidade e determinação de *p*-toluenodiamina e *p*-aminofenol em águas residuárias mimetizando processos de tintura de cabelos"

AUTOR: JOÃO CARLOS DE SOUZA

ORIENTADORA: MARIA VALNICE BOLDRIN

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:


Prof.^a Dr.^a MARIA VALNICE BOLDRIN

Departamento de Química Analítica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara


Prof.^a Dr.^a MIRIAN CRISTINA DOS SANTOS

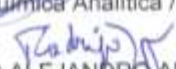
Departamento de Química Analítica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara


Profa. Dra. IVANA CESARINO

Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Agrônômicas - UNESP - Botucatu


Prof. Dr. SEBASTIÃO DE PAULA EIRAS

Departamento de Química Analítica / Centro de Ciências Exatas e Tecnologia - UFU - Uberlândia


Prof. Dr. RODRIGO ALEJANDRO ABARZA MUNOZ

Departamento de Química Analítica / Centro de Ciências Exatas e Tecnologia - UFU - Uberlândia

Araraquara, 12 de março de 2020

Dedico esse pequeno trabalho de esforço pessoal e comprometimento de minha melhora intelectual e pessoal, a todos que proporcionaram, de forma direta e indiretamente, a execução deste trabalho.

Dados curriculares

1. Dados pessoais

Nome: João Carlos de Souza

Nacionalidade: Brasileira

Nascimento: 23/10/1985 – Uberlândia – Minas Gerais - Brasil

Endereço profissional: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP

Instituto de Química de Araraquara - IQAr

Departamento de Química Analítica - DQA

Grupo de Eletroanalítica de Araraquara - GEAr

Rua Professor Francisco Degni, n° 55

Bairro Jardim Quitandinha - 14800-900

Araraquara - São Paulo - Brasil

Telefone: (16) 3301-9519

Endereço eletrônico: souza_jc33@yahoo.com.br

2. Formação acadêmica / Titulação

2.1. Graduação

Bacharelado em Química com Atribuições Tecnológicas

Universidade Federal de Uberlândia – UFU

Uberlândia – Minas Gerais – Brasil

Período: Agosto 2004 - Dezembro 2009

Título: “Estudo da determinação de íons cobre(II) em cachaça com 1-(2-piridilazo)-2-naftol e empregando a mistura homogênea dos solventes água – etanol – metilisobutilcetona.”

Orientador: Prof. Dr. Sebastião de Paula Eiras

2.2. Pós-graduação

Doutorado em Química

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP - Instituto de Química

Araraquara – São Paulo – Brasil

Período: Agosto 2015 – Março 2020

Título: “Desenvolvimento de sensores eletroanalíticos e métodos cromatográficos para avaliação das reações de oxidação, mutagenicidade/toxicidade e determinação de *p*-

toluenodiamina e *p*-aminofenol em águas residuárias mimetizando processos de tintura de cabelos.”

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Valnice Boldrin Zanoni

Estágio de Pesquisa no Exterior – Doutorado Sanduíche

Universidade de Coimbra – Faculdade de Ciências e Tecnologia – Departamento de Química
Coimbra – Portugal

Período: Novembro 2018 – Setembro 2019

Título: “Estudo do comportamento eletroquímico da queratina e sua interação com *p*-toluenodiamina e *p*-aminofenol e seus produtos de oxidação mimetizando reações de tintura permanente de cabelo.”

Orientadora/Supervisora: Prof^a. Dr^a. Ana Maria Coelho Ferreira de Oliveira Brett

Mestrado em Química Analítica

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP - Instituto de Química
Araraquara – São Paulo – Brasil

Período: Agosto 2013 - Junho de 2015

Título: “Determinação íons cobre(II) em aguardente de cana-de-açúcar utilizando a combinação spot test - espectroscopia de reflectância difusa.”

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Pezza

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Helena Redigolo Pezza

2.3. Formação complementar

2017 - Técnicas analíticas em matrizes ambientais. (Carga horária: 8 horas).

Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR. Curitiba – PR – Brasil.

2016 - HPLC - GC - Preparação de amostra. (Carga horária: 8 horas).

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP. Araraquara – SP – Brasil

2016 - Análise de risco ambiental. (Carga horária: 3 horas).

Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC. Florianópolis – SC – Brasil

2012 - Monitoramento do processo magistral. (Carga horária: 3 horas).

Instituto de Pesquisa Tecnológica e Controle de Qualidade - INTECQ. São José do Rio Preto – SP – Brasil.

2011 - Operação do HPLC isocrático JASCO PU 980. (Carga horária: 2 horas).

Instituto de Pesquisa Tecnológica e Controle de Qualidade - INTECQ. São José do Rio Preto – SP – Brasil.

2011 - Armazenamento de dados pelo sistema Baseline N2000. (Carga horária: 2 horas).

Instituto de Pesquisa Tecnológica e Controle de Qualidade - INTECQ. São José do Rio Preto – SP – Brasil.

2009 - Introdução à validação de métodos e ensaios químicos. (Carga horária: 21 horas).

Universidade Federal de Uberlândia - UFU. Uberlândia – MG – Brasil.

2008 - Química forense. (Carga horária: 3 horas).

Universidade Federal de Uberlândia - UFU. Uberlândia – MG – Brasil.

2008 – Quimiometria - análise multivariada de dados químicos. (Carga horária: 40 horas).

Universidade Federal de Uberlândia - UFU. Uberlândia – MG – Brasil.

2007 - Química analítica forense. (Carga horária: 6 horas).

Universidade Federal da Paraíba – UFPB. João Pessoa – PB – Brasil.

2007 - Agrotóxicos: Destinação final de embalagens vazias. (Carga horária: 6 horas).

Universidade Federal de Uberlândia - UFU. Uberlândia – MG – Brasil.

2007 - Produção de açúcar e álcool. (Carga horária: 20 horas).

Universidade Federal de Uberlândia - UFU. Uberlândia – MG – Brasil.

2006 - Biossegurança. (Carga horária: 6 horas).

Universidade Federal de Uberlândia - UFU. Uberlândia – MG – Brasil.

2006 - Cinética química. (Carga horária: 6 horas).

Universidade Federal de Uberlândia - UFU. Uberlândia – MG – Brasil.

2005 - Composição química do café. (Carga horária: 6 horas).

Universidade Federal de Uberlândia - UFU. Uberlândia – MG – Brasil.

3. Artigos publicados

SOUZA, J. C.; MACHINI, W. B. S.; ZANONI, M. V. B.; BRETT, A. M. O. Human hair keratin direct electrochemistry and *in situ* interaction with *p*-toluenediamine and *p*-aminophenol hair dye precursors using a keratin electrochemical biosensor. **ChemElectroChem**, v. 7, p. 1277-1285, 2020.

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

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

SOUZA, J. C.; SILVA, B. F.; MORALES, D. A.; UMBUZEIRO, G. A.; ZANONI, M. V. B. Assessment of the autoxidation mechanism of *p*-toluenediamine by air and hydrogen peroxide and determination of mutagenic environmental contaminant in beauty salon effluent. **Science of The Total Environment**, v. 685, p. 911-922, 2019.

SOUZA, J. C.; SILVA, J. L.; FABRÃO, R. M.; STRADIOTTO, N. R.; ZANONI, M. V. B. Electroactive sugars, organic acids and sugar alcohol analysis in wine using anon-exchange chromatography with electrochemical detection. **Microchemical Journal**, v. 1, n. 1, p. 972-978, 2019.

BESSEGATO, G. G.; **SOUZA, J. C.**; CARDOSO, J. C.; ZANONI, M. V. B. Assessment of several advanced oxidation processes applied in the treatment of environmental concern constituents from a real hair dye wastewater. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 6, n. 1, p. 2794-2802, 2018.

HUDARI, F. F.; **SOUZA, J. C.**; ZANONI, M. V. B. Adsorptive stripping voltammetry for simultaneous determination of hydrochlorothiazide and triamterene in hemodialysis samples using a multi-walled carbon nanotube-modified glassy carbon electrode. **Talanta**, v. 179, n. 1, p. 652-657, 2017.

MOREIRA, L. F. P. P.; BELUOMINI, M. A.; **SOUZA, J. C.**; STRADIOTTO, N. R. Study of the electrochemical behavior of biodiesel microemulsion. **Electroanalysis**, v. 29, n. 1, p. 1941-1949, 2017.

SOUZA, J. C.; TOCI, A. T.; BELUOMINI, M. A.; EIRAS, S. P. Determination of copper in sugarcane spirit by flame atomic absorption spectrometry using a ternary solvent mixture (water-ethanol-acetone). **Eclética Química Journal**, v. 42, n. 1, p. 33-39, 2017.

SOUZA, J. C.; PEZZA, H. R.; PEZZA, L. A simple and green analytical method for determination of copper(II) in whisky and sugarcane spirit by diffuse reflectance spectroscopy. **Analytical Methods**, v. 8, n. 1, p. 1867-1875, 2016.

SOUZA, J. C.; TOCI, A. T.; BELUOMINI, M. A.; EIRAS, S. P. Spectrophotometric determination of copper(II) in sugarcane spirit using 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol and a homogeneous ternary mixture of the solvents water, ethanol and methyl isobutyl ketone. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 3, p. 687-701, 2016.

4. Capítulos de livros publicados

SILVA, B. F.; **SOUZA, J. C.**; ZANONI, M. V. B. Cromatografia aplicada na análise de corantes. In: Maria Valnice Boldrin Zanoni; Hideko Yamanaka. (Orgs.). Corantes: caracterização química, toxicológica, métodos de detecção e tratamento. 1ed. São Paulo: Editora Unesp, 2016, v. 1, cap. 11, p. 179-197.

5. Resumos expandidos publicados em anais de congressos

SOUZA, J. C.; ROSSINI, E. L.; PEZZA, H. R.; PEZZA, L. Estudos de interferentes na determinação de íons cobre(II) em aguardente de cana-de-açúcar utilizando a combinação spot test - espectroscopia de reflectância difusa. In: 55º Congresso Brasileiro de Química, 2015, Goiânia - GO.

SOUZA, J. C.; TOCI, A. T.; PEZZA, H. R.; PEZZA, L. Otimização das variáveis para construção de um método analítico mais limpo na determinação de íons cobre(II) em aguardente de cana por spot test - reflectância difusa. In: 54º Congresso Brasileiro de Química, 2014, Natal - RN.

SOUZA, J. C.; BORGES, C. H. R.; LIMA, M. A. O.; EIRAS, S. P. Complexação de Cu^{2+} com PAN no sistema água - etanol - MIC para determinação do íon em cachaça. In: XLVIII Congresso Brasileiro de Química, 2008, Rio de Janeiro - RJ.

LIMA, M. A. O.; ALMEIDA, E. S.; **SOUZA, J. C.**; EIRAS, S. P. Estudo da complexação de íons Co^{2+} com 2-TTA em mistura homogênea de água - etanol - clorofórmio. In: XLVIII Congresso Brasileiro de Química, 2008, Rio de Janeiro - RJ.

BORGES, C. H. R.; ALMEIDA, E. S.; **SOUZA, J. C.**; IAMAMOTO, M. S.; EIRAS, S. P. Influência da massa de sílica funcionalizada com PAR e das vazões de percolação da amostra e do eluente na extração sólido - líquido de Mn^{2+} . In: XLVIII Congresso Brasileiro de Química, 2008, Rio de Janeiro - RJ.

3. Resumos publicados em anais de congressos

SOUZA, J. C.; ZANONI, M. V. B.; BRETT, A. M. O. Electrochemical oxidation mechanism of the hair dye reagent *p*-aminophenol at a glassy carbon electrode. In: 47th IUPAC World Chemistry Congress, 2019, Paris – França.

SOUZA, J. C.; ZANONI, M. V. B.; BRETT, A. M. O. Electrochemical oxidation mechanism of the hair dye reagent *p*-toluenediamine at a glassy carbon electrode. In: XXV International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 2019, Limerick – Irlanda.

SOUZA, J. C.; SILVA, B. F.; ZANONI, M. V. B. Detection of *p*-aminophenol and sub-products formed during oxidative process in water and hair salon effluent. In: 41ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2018, Foz do Iguaçu - PR.

SOUZA, J. C.; SILVA, J. L.; FABRAO, R. M.; STRADIOTTO, N. R.; ZANONI, M. V. B. Determinação cromatográfica de açúcares, ácidos orgânicos e álcool de açúcares em vinho usando detecção eletroquímica. In: 19ª Encontro Nacional de Química Analítica - 7º Congresso Iberoamericano de Química Analítica, 2018, Caldas Novas - GO.

SOUZA, J. C.; HUDARI, F. F.; ZANONI, M. V. B. Determinação de hidroclorotiazida e triantereno em água de hemodiálise por CLAE-DAD. In: 19ª Encontro Nacional de Química Analítica - 7º Congresso Iberoamericano de Química Analítica, 2018, Caldas Novas - GO.

SILVA, B. F.; **SOUZA, J. C.**; ZANONI, M. V. B. Detection of harmful products formed during the reaction between *p*-toluenediamine and *p*-aminophenol, a common reagents used in permanent hair dyeing. In: 7th Conference on Mass Spectrometry, 2018, Rio de Janeiro - RJ.

MOREIRA, L. F. P. P.; BELUOMINI, M. A.; **SOUZA, J. C.**; STRADIOTTO, N. R. Estudo do comportamento eletroquímico do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em microemulsões de biodiesel. In: XXI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2017, Natal - RN.

SOUZA, J. C.; SILVA, B. F.; ZANONI, M. V. B. Detection of harmful subproducts formed during the oxidative process of *p*-toluenediamine, the common reagent used in permanent hair dying. In: 46° World Chemistry Congress, 2017, São Paulo - SP.

SOUZA, J. C.; SILVA, B. F.; ZANONI, M. V. B. Avaliação de *p*-toluenodiamina e *p*-aminofenol por CLAE-DAD em água e efluente oriundo de tintura de cabelo. In: VIII Encontro Nacional de Química Ambiental, 2017, Curitiba - PR.

SOUZA, J. C.; BESSEGATO, G. G.; ZANONI, M. V. B. Determinação de *p*-fenilenodiamina e resorcinol por CLAE-DAD em efluentes oriundos da tintura de cabelo. In: 18° Encontro Nacional de Química Analítica, 2016, Florianópolis - SC.

SOUZA, J. C.; PEZZA, H. R.; PEZZA, L. Metodologia analítica ambientalmente mais amigável para determinação de cobre em uísque. In: 67ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira Progresso da Ciência, 2015, São Carlos - SP.

SOUZA, J. C.; PEZZA, H. R.; PEZZA, L. Development of an environmentally more benign reflectometric method for determination of copper(II) ions in sugarcane spirit. In: 38ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2015, Águas de Lindóia - SP.

PEZZA, H. R.; TOCI, A. T.; COLETTA, A.; BORALLE, N.; **SOUZA, J. C.**; PEZZA, L. Autenticidade e rastreabilidade de cafés torrados brasileiro por ^1H -RMN. In: 37ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2014, Natal - RN.

REZENDE, H. P.; **SOUZA, J. C.**; PAIVA, V. A. B.; ALMEIDA, E. S.; EIRAS, S. P.; CRUZ, W. O. Simplex modificado para otimizar variáveis na formação do cis-diol de boro com curcumina na mistura de água – etanol – clorofórmio. In: XV Encontro Nacional de Química Analítica e III Congresso Iberoamericano de Química Analítica, 2009, Salvador - BA.

SOUZA, J. C.; ALMEIDA, E. S.; REZENDE, H. P.; PAIVA, V. A. B.; EIRAS, S. P. Determinação espectrofotométrica de cobre em cachaça empregando PAN e mistura homogênea dos solventes água – etanol – MIC. In: XV Encontro Nacional de Química Analítica e III Congresso Iberoamericano de Química Analítica, 2009, Salvador - BA.

OLIVEIRA, D. R.; **SOUZA, J. C.**; ALMEIDA, E. S.; IAMAMOTO, M. S.; EIRAS, S. P. Estudo da pré-concentração de soluções de íons Cu^{2+} no sistema de extração sólido - líquido e sílica funcionalizada com PAN. In: XV Encontro Nacional de Química Analítica e III Congresso Iberoamericano de Química Analítica, 2009, Salvador - BA.

PAIVA, V. A. B.; ALMEIDA, E. S.; **SOUZA, J. C.**; REZENDE, H. P.; EIRAS, S. P. Determinação de matéria orgânica no solo: uma avaliação do impacto ambiental. In: XV Encontro Nacional de Química Analítica e III Congresso Iberoamericano de Química Analítica, 2009, Salvador - BA.

LIMA, M. A. O.; **SOUZA, J. C.**; ALMEIDA, E. S.; OLIVEIRA, D. R.; EIRAS, S. P. Avaliação da influência da composição da mistura dos solventes H_2O - EtOH - CHCl_3 na sensibilidade da determinação de íons Co^{2+} com 2-TTA. In: XXII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química – MG, 2008, Belo Horizonte - MG.

ALMEIDA, E. S.; **SOUZA, J. C.**; LIMA, M. A. O.; BORGES, C. H. R.; EIRAS, S. P. Estudo dos interferentes na determinação de Al^{3+} com 8-hidroxiquinolina em uma mistura de água - etanol - clorofórmio. In: XXII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química - MG, 2008, Belo Horizonte - MG.

BORGES, C. H. R.; **SOUZA, J. C.**; OLIVEIRA, D. R.; IAMAMOTO, M. S.; EIRAS, S. P. Caracterização da sílica gel funcionalizada com 4-(2-piridilazo)-resorcinol. In: XXII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química – MG, 2008, Belo Horizonte - MG.

SOUZA, J. C.; LIMA, M. A. O.; ALMEIDA, E. S.; OLIVEIRA, D. R.; EIRAS, S. P. Tratamento de resíduos utilizados na determinação de íons Co^{2+} empregando o sistema água - etanol - clorofórmio. In: XXII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química - MG, 2008, Belo Horizonte - MG.

SOUZA, J. C.; ALMEIDA, E. S.; LIMA, M. A. O.; BORGES, C. H. R.; EIRAS, S. P. Estudo dos interferentes na determinação de íons Cu^{2+} em cachaça com PAN e uma mistura de água -

etanol - metilisobutilcetona. In: XXII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química - MG, 2008, Belo Horizonte - MG.

ALMEIDA, E. S.; **SOUZA, J. C.**; LIMA, M. A. O.; BORGES, C. H. R.; EIRAS, S. P. Estudo da influência da temperatura e do tempo na determinação de Al^{3+} com 8-hidroxiquinolina e uma mistura de água - etanol - clorofórmio. In: 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008, Águas de Lindóia - SP.

SOUZA, J. C.; ALMEIDA, E. S.; LIMA, M. A. O.; EIRAS, S. P. Avaliação do teor de cobre em cachaça empregando misturas dos solventes água - etanol - acetona e detecção por absorção atômica. In: 14º Encontro Nacional de Química Analítica, 2007, João Pessoa - PB.

ALMEIDA, E. S.; **SOUZA, J. C.**; LIMA, M. A. O.; EIRAS, S. P. Estudo da complexação de íons Al^{3+} com 8-hidroxiquinolina em mistura homogênea de água - etanol - clorofórmio. In: XXI Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química - MG, 2007, Uberlândia - MG.

6. Apresentações de Trabalho (oral)

SOUZA, J. C.; SILVA, B. F.; ZANONI, M. V. B. Detection of *p*-aminophenol and sub-products formed during oxidative process in water and hair salon effluent. In: 41ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2018, Foz do Iguaçu - PR.

PEZZA, H. R.; TOCI, A. T.; COLETTA, A.; BORALLE, N.; **SOUZA, J. C.**; PEZZA, L. Autenticidade e rastreabilidade de cafés torrados brasileiro por ^1H -RMN. In: 37ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2014, Natal - RN.

SOUZA, J. C.; ALMEIDA, E. S.; EIRAS, S. P. Estudo da extração por fase única de alumínio: sistema água – etanol – clorofórmio e 8-hidroxiquinolina. In: IX Encontro Interno e XIII Seminário de Iniciação Científica - PIBIC/CNPq/FAPEMIG da Universidade Federal de Uberlândia, 2009, Uberlândia – MG.

7. Outras produções bibliográficas

SOUZA, J. C. Determinação íons cobre(II) em aguardente de cana-de-açúcar utilizando a combinação spot test - espectroscopia de reflectância difusa, 2015, Dissertação Mestrado, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho.”

SOUZA, J. C. Estudo da determinação de íons cobre(II) em cachaça com 1-(2-piridilazo)-2-naftol e empregando a mistura homogênea dos solventes água – etanol – metilisobutilcetona, 2009, Trabalho Conclusão de Curso, Universidade Federal de Uberlândia.

8. Participação em eventos

2019 – 47th IUPAC World Chemistry Congress. Paris – França.

2019 - XXV International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics. Limerick – Irlanda.

2018 - 41ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Foz do Iguaçu – PR – Brasil.

2017 – 46th IUPAC World Chemistry Congress e 40ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. São Paulo – SP – Brasil.

2017 - VI Escola de separações. Campinas – SP – Brasil.

2017 - VIII Encontro Nacional de Química Ambiental. Curitiba – PR – Brasil.

2016 - 18º Encontro Nacional de Química Analítica. Florianópolis – SC – Brasil.

2016 - Workshop Avanços em química analítica e bioenergia - Nelson Ramos Stradiotto. Florianópolis – SC – Brasil.

2015 - 67ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência. São Carlos – SP – Brasil.

2015 - 38ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Águas de Lindóia – SP – Brasil.

2014 - 54º Congresso Brasileiro de Química. Natal – RN – Brasil.

2009 - Ferramenta para o desarmamento e a não proliferação de armas de destruição em massa. Palestra Programa Nacional de Integração Estado-Empresa na Área de Bens Sensíveis – PRONABENS. Uberlândia – MG – Brasil.

2008 - XLVIII Congresso Brasileiro de Química - CBQ. Rio de Janeiro – RJ – Brasil.

2008 - XXII Encontro Regional SBQ-MG. Belo Horizonte – MG - Brasil.

2008 - Comemoração do dia nacional do químico. Uberlândia – MG – Brasil.

2007 - 14º Encontro Nacional de Química Analítica. João Pessoa – PB – Brasil.

2007 - XXI Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química - MG. Uberlândia – MG – Brasil.

2006 - I Encontro de Química do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba - IV Mostra de Pós-Graduação - III Jornada Científica de Química. Uberlândia – MG – Brasil.

2006 - II Semana da Química - II Escola de Inverno. Uberlândia – MG – Brasil.

2005 - Comemoração ao dia Nacional do Químico. Uberlândia – MG – Brasil.

9. Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

2008 - XXI Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química - MG. Uberlândia – MG – Brasil.

10. Orientações e supervisões

1 - Juliana Paula de Oliveira. Avaliação de contaminantes oriundos do uso de tintura de cabelo: Análise de PPD e derivados em urina humana. Início: 2019 - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP. (Coorientador).

2 - Giovanna de Deus Sperandio. Início: 2019 - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho.” (Coorientador).

*“Conheça todas as teorias, domine
todas as técnicas, mas ao tocar uma
alma humana, seja apenas outra
alma humana.”*

Carl Gustav Jung

Agradecimentos

Ao Instituto de Química, Campus de Araraquara – SP, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP pelas facilidades, estrutura e recursos concedidos à realização deste trabalho;

Ao Departamento de Química - Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra – UC e ao Instituto Pedro Nunes – IPN pela oportunidade de realização de estágio de pesquisa no exterior (doutorado sanduíche), pelas facilidades, estrutura e recursos concedidos à realização do estágio;

Em especial a Prof^a. Dr^a. Maria Valnice Boldrin Zanoni pela orientação, amizade, paciência e pelos ensinamentos ao qual levarei comigo pelo resto da vida.

Em especial a Prof^a. Dr^a. Ana Maria Coelho Ferreira de Oliveira Brett e ao Prof. Dr. Christopher Michael Ashton Brett pela recepção, orientação, amizade, paciência e ensinamentos durante a realização de estágio de pesquisa no exterior (doutorado sanduíche) em Coimbra – Portugal. Ensinamentos que levarei comigo pelo resto da vida.

Em especial a Dr^a. Bianca Ferreira da Silva pela orientação, amizade, paciência, conversas e ensinamentos ao qual levarei comigo pelo resto da vida;

À Prof^a. Dr^a. Gisela de Aragão Umbuzeiro, Docente da Faculdade de Tecnologia da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP de Limeira – SP, pela parceria firmada e colaboração neste trabalho, e pelas análises de toxicidade e mutagenicidade realizadas em seu laboratório;

Ao Dr. Daniel Alexandre Morales e a Dr^a. Adria Caloto de Oliveira, do Laboratório de Ecotoxicologia Genotoxicidade – LAEG, localizado na Faculdade de Tecnologia da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP de Limeira – SP, pela colaboração neste trabalho e pela realização das análises de mutagenicidade e toxicidade, respectivamente;

Ao Prof. Dr. Paulo Clairmont Feitosa de Lima Gomes, Docente do Departamento de Química Analítica do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP de Araraquara - SP, por ceder a impressora 3D para confecção do suporte magnético utilizado neste trabalho;

À Mestre Natália da Costa Luchiari, do Departamento de Química Analítica do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP de Araraquara-SP, pela disposição e ajuda na confecção do suporte magnético utilizado neste trabalho;

Aos companheiros de trabalho do Grupo de Eletroanalítica de Araraquara - GEAr pela amizade, momentos de dificuldades, alegrias vividas juntos durante toda a jornada e pelas proveitosas discussões no decorrer deste trabalho;

Aos amigos e companheiros José Luiz, Edervaldo Buffon, Thúlio Ferreira, Marcos Vinícius, Máisa Beluomini, João Pedro, Acelino Cardoso, Josiel Silva, Kallyni Irikura, Beatriz Costa e Silva, César Marasco, Natália Luchiari, Guilherme Bessegato, Juliano Cardoso, Felipe Hudari, Alysso Martins, Lilian Torquato e João Angelo meus sinceros agradecimentos pela amizade, paciência, companhia, viagens, churrascos, momentos de dificuldades e de alegrias vividos juntos durante toda a jornada, e pelas proveitosas conversas e discussões no decorrer deste trabalho;

Aos amigos e companheiros, do Departamento de Química - Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra – UC, Wesley Machini, Ana-Maria Chiorcea-Paquim e Isabel Fernandes, meus sinceros agradecimentos pela recepção, paciência, amizade, companhia, alegrias e pelas proveitosas conversas e discussões, durante o decorrer de meu estágio de pesquisa no exterior (doutorado sanduíche) em Coimbra - Portugal;

Aos demais professores e funcionários do Instituto de Química, Campus Araraquara – SP, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, que diretamente e indiretamente ajudaram no decorrer do curso e na realização deste trabalho;

Aos demais funcionários do Departamento de Química, da Faculdade de Ciências e Tecnologia, da Universidade de Coimbra – UC e do Instituto Pedro Nunes - IPN, que diretamente e indiretamente ajudaram no decorrer do estágio de pesquisa no exterior (doutorado sanduíche);

Aos demais amigos conquistados no decorrer do curso de doutorado pela amizade, momentos de dificuldades e alegria vividos juntos durante toda a jornada;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (Processo nº 2015/12998-1) pela concessão da bolsa de doutorado e pelo apoio financeiro à pesquisa;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (Processo nº 2018/12449-6) pela concessão da bolsa de estágio de pesquisa no exterior - BEPE (doutorado sanduíche), no Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, e pelo apoio financeiro à pesquisa;

Aos meus pais por me proporcionarem a chance de realizar o doutorado, e por todo o amor e apoio dedicados, não só durante esta etapa, como também em todas as outras escolhas da minha vida;

À minha grande e melhor amiga Jaqueline Leschonski pela amizade, companheirismo paciência, pelos momentos de alegrias, pelas proveitosas conversas e discussões a respeito da vida e da espiritualidade, e por ter me salvado a vida;

À minha namorada Daniela Matos pelo companheirismo, paciência, apoio nos momentos difíceis, e pelo amor e carinho. Te amo muito, meu amor!!!

A todos os demais familiares e amigos próximos que sempre me apoiaram e incentivaram em todo o decorrer da minha vida.

Resumo

O tingimento dos cabelos é um processo adotado por milhões de pessoas em todo o mundo, e envolve reações oxidativas complexas entre agentes precursores e acopladores em meio oxidante alcalino no interior do fio de cabelo. Embora estes compostos estejam presentes em tinturas comerciais de cabelos, poucos estudos são encontrados com foco no monitoramento de produtos e subprodutos formados a partir destas reações, em águas de rejeitos de salão de beleza e outras amostras ambientais e biológicas. Esta abordagem, poderia ser de alta relevância no entendimento da persistência e biotransformação dessas substâncias, já que nos últimos anos, vários estudos levantaram questionamentos a respeito da toxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade, acompanhada de uma grande preocupação dos órgãos reguladores de proteção ambiental e de saúde humana a respeito desses compostos.

Tendo em vista, contribuir para o melhor entendimento dessas reações, o presente trabalho propôs investigar a estabilidade dos precursores *p*-toluenodiamina (PTD) e *p*-aminofenol (PAF), em meio alcalino de 0,1 mol L⁻¹ de tampão amônio a pH 8,0, na presença e na ausência de agente oxidante (peróxido de hidrogênio). A reação de oxidação da PTD apresentou a formação de vários intermediários de reação como os derivados do radical semi-quinonadiimina, quinonadiimina, difenilamina e o produto derivado da Base de Bandrowski (BB). A reação de oxidação do PAF apresentou a formação de vários intermediários de reação como os derivados do radical semi-quinonaimina, quinonaimina, além da formação de dímeros, trímeros e um tetrâmero. A reação entre a PTD e o PAF apresentou a formação de vários intermediários e produtos finais de reação oriundos da oxidação da PTD e do PAF e de seis diferentes produtos.

Testes de mutagenicidade dos produtos finais da PTD e do PAF, bem como da reação entre ambos, foram realizados com bactérias *Salmonella enterica* Typhimurium YG1041, com e sem ativação metabólica. Os resultados obtidos mostrou alta mutagenicidade para o derivado da BB e para os produtos da reação entre a PTD e o PAF, e os produtos formados pela oxidação do PAF não mostraram mutagenicidade. Testes de toxicidade aguda, realizados com *Daphnia similis*, mostraram alta toxicidade.

Uma metodologia analítica foi desenvolvida para a determinação de PTD e PAF por CLAE/DAD. O método obteve relações boas lineares, bons limites de detecção e de quantificação com boa recuperação. O método foi aplicado de maneira satisfatória em amostras de água, bem como em amostra de efluente de salão de cabeleireiros. As concentrações encontradas, de PTD e de PAF, para amostra de água antes do tratamento foi de 2,48 ±

$0,10 \times 10^{-3}$ e $1,90 \pm 0,30 \times 10^{-3}$ mg L⁻¹, para a amostra de água após o tratamento foi de $1,77 \pm 0,10 \times 10^{-3}$ e $1,30 \pm 0,20 \times 10^{-3}$ mg L⁻¹, e para amostra de efluente de salão de cabeleireiros foi de $2,08 \pm 0,20$ mg L⁻¹ e $2,10 \pm 0,50$ mg L⁻¹, respectivamente. Na amostra de efluente foram identificados vários produtos da oxidação da PTD, do PAF e da reação entre ambos.

O comportamento eletroquímico oxidativo da PTD e do PAF foi investigado. As reações de oxidação da PTD e do PAF mostraram ser reversíveis, controladas por difusão e pela transferência de dois elétrons e dois prótons tanto para a PTD quanto para o PAF. Um mecanismo de oxidação eletroquímica para a PTD e para o PAF foi proposto. Os coeficientes de difusão da PTD e do PAF foram determinados, e os valores foram de $D_{\text{PTD}} = 1,57 \times 10^{-5}$ cm² s⁻¹ e $D_{\text{PAF}} = 1,03 \times 10^{-5}$ cm² s⁻¹, respectivamente.

Uma metodologia analítica para quantificação desses precursores, em amostras de fluidos biológicos de soro fetal bovino (simulando o plasma sanguíneo humano) e de urina artificial (simulando a urina humana), foi desenvolvida. A quantificação eletroquímica, na faixa de concentração de $1,0 \times 10^{-7}$ a $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, mostrou um limite de detecção de $1,2 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ para a PTD e de $1,7 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ para o PAF. O método eletroanalítico desenvolvido foi aplicado satisfatoriamente para a determinação de PTD e PAF em amostras de soro fetal bovino e de urina artificial.

O comportamento eletroquímico da queratina capilar humana foi investigado. Para isso, foi realizada a construção de um biossensor de queratina pela modificação de um eletrodo de carbono vítreo com queratina de cabelo humano por voltametria de pulso diferencial. O comportamento eletroquímico da queratina mostrou dois picos de oxidação dependentes do pH. O primeiro pico correspondeu ao primeiro pico de oxidação dos resíduos de aminoácidos cisteína, P1_{Cis}, em $EP1 = + 0,53$ V, e o segundo pico correspondeu ao terceiro pico de oxidação dos resíduos aminoácidos cisteína e ao segundo pico de aminoácidos metionina P2_{Cis + Met}, em $EP2 = + 1,28$ V.

Foi estudada também a desnaturação da queratina de cabelo humano, pela incubação da queratina com agentes desnaturantes ureia e dodecil sulfato de sódio, e com o agente redutor tris(2-carboxietil) fosfina, por voltametria de pulso diferencial. Por fim, foi estudada a interação da queratina com a PTD e o PAF, por voltametria de pulso diferencial e espectroscopia de impedância eletroquímica, pela incubação da queratina com esses precursores, por diferentes períodos de tempo, a fim de entender o processo de tingimento dos cabelos e a fixação desses compostos no interior da fibra capilar. Os resultados dos experimentos de desnaturação e da interação da queratina com os precursores mostraram que

tanto os agentes desnaturantes, quanto os agentes redutores e precursores promoveram um aumento nas correntes de pico dos resíduos de aminoácidos eletroativos, ao longo do tempo de incubação. Além disso, foi verificado o aparecimento de novos picos de resíduos de outros aminoácidos presentes na estrutura da queratina, pelo desdobramento da estrutura da molécula da queratina, estavam enterrados e/ou encobertos.

Por fim, foi desenvolvido um sensor eletroquímico em eletrodo impresso de carbono, modificado com nanopartículas magnéticas (NPM) de ferro funcionalizadas com grupos ácido carboxílico e L-cisteína. As NPM funcionalizadas foram depositadas em cima do eletrodo de trabalho, onde ficaram imobilizadas pela atração magnética do ímã de neodímio, fixado em um suporte construído em impressora 3D. O comportamento eletroquímico dos analitos foi avaliado e o sensor eletroquímico mostrou-se bastante promissor na determinação da PTD e do PAF, com um ganho de corrente de 34,0% para a PTD e de 51,7% vezes para o PAF comparado ao eletrodo impresso sem as NPM. O processo de oxidação da PTD mostrou ser um processo irreversível com reações químicas do produto, com um de pico de oxidação em potencial de $E_{oxPTD} = + 0,25$ V. Para o PAF observou-se que a oxidação foi um processo reversível com reações químicas do produto em potencial de $E_{oxPAF} = + 0,21$ V. Por fim, o método foi otimizado quanto ao tempo de deposição dos analitos, concentração e volume de NPM a serem depositadas sobre o eletrodo. As otimizações apresentaram como condições ótimas um tempo de deposição de 3 minutos, concentração e volume de NPM de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ e $50,0 \text{ }\mu\text{L}$, respectivamente.

Palavras Chave: *p*-toluenodiamina, *p*-aminofenol, corante de cabelos permanentes, queratina, efluente de salão de cabeleireiros, nanopartículas magnéticas

Abstract

The hair dyeing is a process adopted by millions of people worldwide, and involves complex oxidative reactions between precursor and couplers agents, in alkaline oxidizing medium, inside the hair strand. Although these compounds are present in commercial hair dyes, few studies are found with a focus on monitoring products and byproducts formed from these reactions, during the hair dye process, in salon wastewater and other environmental and biological samples. This approach could be of high relevance in understanding of the persistence and biotransformation of these substances, since in recent years, several studies have raised questions about toxicity, mutagenicity and genotoxicity, accompanied by a major concern of the regulatory agencies for environmental protection and health about these compounds.

In order to contribute to a better understanding of these reactions, the present work proposed to investigate the stability of the precursors *p*-toluenediamine (PTD) and *p*-aminophenol (PAP), in an alkaline medium of 0.1 mol L⁻¹ ammonium buffer at pH 8.0, in the presence and absence of oxidizing agent (hydrogen peroxide). The PTD oxidation reaction showed the formation of several reaction intermediates, such as the derivatives of the semi-quinonediimine radical, quinonediimine, diphenylamine and the product derived from the Bandrowski's Base (BB). The PAP oxidation reaction showed the formation of several reaction intermediates, such as those derived from the semi-quinoneimine radical, quinoneimine, in addition to the formation of dimers, trimers and tetramer. The reaction between PTD and PAP showed the formation of several intermediates and final reaction products arising from the oxidation of PTD and PAP. In addition to these products, the formation of six different products were identified.

Mutagenicity tests of the final products of PTD and PAP, as well as of the reaction between both, were carried out with bacteria *Salmonella enterica Typhimurium* YG1041, with and without metabolic activation. The results obtained showed high mutagenicity for the derivative of BB and for the products of the reaction between PTD and PAP, and the products formed by the oxidation of PAP did not show mutagenicity. Acute toxicity tests, performed with *Daphnia similis*, showed high toxicity.

An analytical methodology was developed for the determination of PTD and PAP by HPLC-DAD. The method obtained good linear relationships, good limits of detection, quantification and recovery. The method was applied satisfactorily in water samples, as well as in a haidressing salon effluent sample. The concentrations found of PTD and PAP, for

water sample before treatment were $2,48 \pm 0,1 \times 10^{-3}$ and $1,90 \pm 0,3 \times 10^{-3}$ mg L⁻¹, for the sample of water after treatment was $1,77 \pm 0,1 \times 10^{-3}$ and $1,90 \pm 0,3 \times 10^{-3}$ mg L⁻¹, and for a hairdressing salon sample it was $2,08 \pm 0,2$ mg L⁻¹ and $2,10 \pm 0,5$ mg L⁻¹, respectively. In the effluent sample, several oxidation products of PTD, PAP and the reaction between them were identified. This shows that considerable quantities of these products are being discharged into the common sewer daily.

The oxidative electrochemical behavior of PTD and PAP was investigated. The oxidation reactions of PTD and PAP have been shown to be reversible. The reaction was controlled by diffusion, by transferring two electrons and two protons to PTD, which occurred in the nitrogen atoms of the amine groups of the molecule. The oxidation of PAP was controlled by diffusion, and by the transfer of two electrons and two protons, which occurred in the oxygen and nitrogen atoms of the hydroxyl and amine groups of the molecule, respectively. An electrochemical oxidation mechanism for PTD and PAP has been proposed. The diffusion coefficients of PTD and PAP were determined, and the values were $D_{\text{PTD}} = 1.57 \times 10^{-5}$ cm² s⁻¹ and $D_{\text{PAP}} = 1.03 \times 10^{-5}$ cm² s⁻¹, respectively.

An analytical methodology for quantifying these precursors, in samples of biological fluids from fetal bovine serum (simulating human blood plasma) and artificial urine (simulating human urine), was developed. Electrochemical quantification, in the concentration range of 1.0×10^{-7} to 1.0×10^{-6} mol L⁻¹, showed a detection limit of 1.2×10^{-7} mol L⁻¹ for PTD and of 1.7×10^{-7} mol L⁻¹ for PAP. The electroanalytical method developed was applied satisfactorily in samples of fetal bovine serum and in artificial urine.

The electrochemical behavior of human capillary keratin was investigated. For this, the construction of a keratin biosensor was performed by modifying a glassy carbon electrode with human hair keratin by differential pulse voltammetry. The electrochemical behavior of keratin showed two pH-dependent oxidation peaks. The first peak corresponded to the first oxidation peak of the cysteine amino acid residues, P1_{Cys}, at EP1 = + 0.53 V, and the second peak corresponded to the third oxidation peak of the cysteine amino acid residues, the second methionine amino acid peak and the peak of oxidation of histidine P2_{Cys + Met} amino acid residues, at EP2 = + 1.28 V.

Human hair keratin denaturation was also studied, by incubating the keratin with denaturing agents urea and sodium dodecyl sulfate, and with the reducing agent tris-(2-carboxyethyl)-phosphine, by differential pulse voltammetry. Finally, the interaction of keratin with PTD and PAP was studied, using differential pulse voltammetry and electrochemical

impedance spectroscopy, through the keratin incubation with these precursors, for different periods of time, in order to understand the dyeing process of the hair and the fixation of these compounds inside the hair fiber. The results of the denaturation experiments and of the keratin interaction with the precursors showed that both the denaturing, reducing and precursor agents promoted an increase in the peak currents of the electroactive amino acid residues, over the incubation time. Probably, these compounds did not induce oxidative damage to keratin, but caused an unfolding of the morphological structure and this provided that amino acid residues, which were buried or covered up, were more exposed to the surface of the biosensor, facilitating its oxidation. In addition, the appearance of new peaks of residues of other amino acids present in the keratin structure was verified, which were also buried and/or covered by the unfolding of the keratin molecule structure.

Finally, the study of PTD and PAP was carried out on a printed carbon electrode, modified with iron magnetic nanoparticles (MNP) functionalized with carboxylic acid and L-cysteine groups. The functionalized MNP were deposited on top of the working electrode, where they were immobilized by the magnetic attraction of the neodymium magnet, fixed on a support built in a 3D printer. The electrochemical behavior of the analytes was evaluated. The modified electrode with the nanoparticles proved to be very promising in the determination of PTD and PAP, with a current gain of 34.0% for PTD and 51.7% for PAP, compared to the printed electrode without MNP. The PTD oxidation process was indicative of being an irreversible process with chemical reactions of the product, with a peak oxidation potential of $E_{OXPTD} = + 0.25$ V. For PAP, it is observed that the potential oxidation of $E_{OXPAp} = + 0.21$ V. Finally, the method was optimized regarding the time of deposition of the analytes, concentration and volume of MNP to be deposited on the electrode. The optimizations presented a deposition time of 3 minutes, concentration and volume of MNP of 1.0 mg mL^{-1} and $50.0 \text{ }\mu\text{L}$, respectively.

Keywords: *p*-toluenediamine, *p*-aminophenol, permanent hair dyes, keratin, wastewater from hairdressing salon, magnetic nanoparticles.

Lista de figuras

Figura 1 -	Estrutura tegumentar humana com uma unidade polissebácea.....	47
Figura 2 -	Imagem de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da medula porosa de uma seção transversal da fibra do cabelo.....	48
Figura 3 -	Estrutura do cabelo humano.....	49
Figura 4 -	Imagens de MEV do interior do cortéx do cabelo humano aumentada 1.000 vezes (A), 5.000 vezes (B), 10.000 vezes (C) e 20.000 vezes (D)...	50
Figura 5 -	Imagem de MEV da cutícula do cabelo humano.....	51
Figura 6 -	Estágios de crescimento do cabelo humano.....	53
Figura 7 -	Estrutura física do cabelo liso (A) e do cabelo crespo (B).....	53
Figura 8 -	Ligações e interações intra e intercelulares presentes nos fios de cabelos.....	54
Figura 9 -	Estruturas moleculares da eumelamina (A) e feomelamina (B).....	55
Figura 10 -	Estruturas moleculares da α -queratina (A) e da β -queratina (B).....	63
Figura 11 -	Fixação dos corantes capilares temporários na fibra capilar.....	68
Figura 12 -	Fixação dos corantes capilares semipermanentes no interior da fibra capilar.....	73
Figura 13 -	Fixação dos corantes capilares permanentes no interior da fibra capilar.....	74
Figura 14 -	Processo alérgico provocado por corante capilar permanente* (A), por doses de PFD** (B) e em tatuagem de henna*** (C).....	79
Figura 15 -	Desenho do suporte magnético e suporte magnético impresso em impressora 3D.....	100
Figura 16 -	Procedimento de fixação do eletrodo de carbono impresso no suporte magnético, deposição das NPM-AC-LC sobre o eletrodo e montagem da célula eletroquímica.....	102
Figura 17 -	Espectro de massas obtido para 10,0 mg L ⁻¹ de PTD em tampão amônio 0,1 mol L ⁻¹ a pH 8,0, após 3 horas de reação, na ausência de peróxido de hidrogênio.....	103
Figura 18 -	Espectro de massas obtido para 10,0 mg L ⁻¹ de PTD em tampão amônio 0,1 mol L ⁻¹ a pH 8,0, após 3 horas de reação, na presença de peróxido de hidrogênio a 1,0% (v/v).....	105
Figura 19 -	Espectro de massas obtido para o produto de coloração castanho escuro.....	105

Figura 20 -	Espectro de massas obtido para o produto de coloração roxo.....	106
Figura 21 -	Espectros de absorção UV-Vis em 10,0 mg L ⁻¹ de PTD em 0,1 mol L ⁻¹ de tampão amônio a pH 8,0: (A) oxigênio dissolvido e (B) peróxido de hidrogênio 0,1% (v/v).....	108
Figura 22 -	Espectros de absorção UV-Vis, obtidos em metanol, para o padrão de PTD e os produtos formados pela oxidação da PTD em tampão amônio 0,1 mol L ⁻¹ a pH 8,0 isolados por CCD.....	109
Figura 23 -	Espectro de IR, obtido em clorofórmio, para o produto de coloração castanho escuro.....	110
Figura 24 -	Espectro de IR, obtido em clorofórmio, para o produto de coloração roxa.....	111
Figura 25 -	Espectro de ¹ H-RMN obtido para o produto de coloração castanho escuro em metanol deuterado.....	112
Figura 26 -	Espectro de ¹ H-RMN obtido para o produto de coloração roxa em metanol deuterado.....	113
Figura 27 -	Espectro de massas obtido para 10,0 mg L ⁻¹ de PAF em tampão amônio 0,1 mol L ⁻¹ a pH 8,0, após 3 horas de reação, na ausência de peróxido de hidrogênio.....	115
Figura 28 -	Espectro de massas obtido para 10,0 mg L ⁻¹ de PAF em tampão amônio 0,1 mol L ⁻¹ a pH 8,0 após 3 horas de reação na presença de peróxido de hidrogênio a 1,0% (v/v).....	117
Figura 29 -	Espectro de massas obtido para o produto de coloração castanho claro....	117
Figura 30 -	Espectro de massas obtido para o produto de coloração castanho escuro.....	118
Figura 31 -	Espectro de massas obtido para o produto de coloração rosa.....	118
Figura 32 -	Espectros de absorção UV-Vis em 10,0 mg L ⁻¹ de PAF em 0,1 mol L ⁻¹ de tampão amônio a pH 8,0: (A) oxigênio dissolvido e (B) peróxido de hidrogênio 0,05% (v/v).....	120-121
Figura 33 -	Espectros de absorção UV-Vis, obtidos em metanol, para o padrão e os produtos formados pela oxidação do PAF, em tampão amônio 0,1 mol L ⁻¹ a pH 8,0, isolados por CCD.....	122
Figura 34 -	Espectro de IR, obtido em clorofórmio, para o produto de coloração castanho claro.....	123
Figura 35 -	Espectro de IR, obtido em clorofórmio, para o produto de coloração castanho escuro.....	124

Figura 36 -	Espectro de IR, obtido em clorofórmio, para o produto de coloração rosa.....	125
Figura 37 -	Espectro de IR, obtido em clorofórmio, para o produto precipitado (tetrâmero).....	126
Figura 38 -	Espectro de ^1H -RMN obtido para o produto de coloração castanho claro em metanol deuterado.....	127
Figura 39 -	Espectro de ^1H -RMN obtido para o produto de coloração castanho escuro em metanol deuterado.....	128
Figura 40 -	Espectro de ^1H -RMN obtido para o produto de coloração rosa em metanol deuterado.....	129
Figura 41 -	Espectro de ^1H -RMN obtido para o produto precipitado (tetrâmero) em metanol deuterado.....	130
Figura 42 -	Espectro de massas obtido para a reação entre a PTD e o PAF, na proporção de (1:1), em tampão amônio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 8,0, após 3 horas de reação: (A) Espectro de massas aumentado na faixa de m/z 100 a 150 Da, (B) espectro de massas aumentado na na faixa de m/z 200 a 245 e em (C) espectro de massas aumento na faixa de m/z 300 a 365 Da.....	132
Figura 43 -	Espectro de massas obtido para o produto de coloração castanho escuro.....	133
Figura 44 -	Espectro de massas obtido para o produto de coloração castanho claro....	134
Figura 45 -	Espectro de massas obtido para o produto de coloração roxo.....	134
Figura 46 -	Espectro de massas obtido para o produto de coloração marrom.....	135
Figura 47 -	Espectro de massas obtido para o produto de coloração rosa.....	135
Figura 48 -	Espectro de massas obtido para o produto de coloração marrom escuro...	136
Figura 49 -	Espectro de massas obtido para o produto de coloração rosa claro.....	136
Figura 50 -	Espectro de massas obtido para os produtos precipitados da reação entre a PTD e o PAF.....	137
Figura 51 -	Espectros de absorção UV-Vis para a reação da PTD e o PAF, na proporção de (1:1) (ambos a $10,0 \text{ mg L}^{-1}$) em tampão amônio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 8,0 em atmosfera de oxigênio dissolvido (A) e 1,0% (v/v) de peróxido de hidrogênio (B).....	141

Figura 52 -	Espectros de absorção UV-Vis, obtidos em metanol, para os produtos formados pela reação entre a PTD e o PAF, isolados por CCD.....	142
Figura 53 -	Espectro de IR, obtido em clorofórmio, para o produto de coloração castanho escuro, formado pela reação entre a PTD e o PAF.....	143
Figura 54 -	Espectro de IR, obtido em clorofórmio, para o produto de coloração castanho claro, formado pela reação entre a PTD e o PAF.....	144
Figura 55 -	Espectro de IR, obtido em clorofórmio, para o produto de coloração roxo, formado pela reação entre a PTD e o PAF.....	145
Figura 56 -	Espectro de IR, obtido em clorofórmio, para o produto de coloração marrom, formado pela reação entre a PTD e o PAF.....	146
Figura 57 -	Espectro de IR, obtido em clorofórmio, para o produto de coloração rosa claro, formado pela reação entre a PTD e o PAF.....	147
Figura 58 -	Espectro de IR, obtido em clorofórmio, para o produto de coloração rosa escuro, formado pela reação entre a PTD e o PAF.....	148
Figura 59 -	Espectro de IR, obtido em clorofórmio, para o produto de coloração marrom escuro, formado pela reação entre a PTD e o PAF.....	149
Figura 60 -	Espectro de IR, obtido em clorofórmio, para o produto precipitado, formado pela reação entre a PTD e o PAF.....	150
Figura 61 -	Espectro de ^1H -RMN obtido para o produto de coloração rosa escuro em metanol deuterado.....	151
Figura 62 -	Espectro de ^1H -RMN obtido para o produto de coloração marrom escuro em metanol deuterado.....	152
Figura 63 -	Cromatograma obtido por CLAE/DAD para os padrões de PTD e PAF a $50,0 \text{ mg L}^{-1}$. Fase móvel tampão acetato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,6):acetonitrila 98:2 (v/v), respectivamente, fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura da coluna de $40,0 \text{ }^\circ\text{C}$, volume de injeção de $20,0 \text{ }\mu\text{L}$ e comprimento de onda de $\lambda = 236 \text{ nm}$	162
Figura 64 -	Cromatogramas obtidos por CLAE/DAD para as amostras de água antes do tratamento (A), após o tratamento (B) e efluente de salão de cabeleireiros (C). Fase móvel tampão acetato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,6):acetonitrila 98:2 (v/v), respectivamente, fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura da coluna de $40,0 \text{ }^\circ\text{C}$, volume de injeção de $20,0 \text{ }\mu\text{L}$ e comprimento de onda de $\lambda = 236 \text{ nm}$	165-166
Figura 65 -	Espectro de massas <i>full scan</i> obtido para a amostra de efluente de salão de cabeleireiros.....	167

Figura 66 -	Espectro de massas obtido para a amostra de efluente de salão de cabeleireiros ampliado na faixa de m/z 100 a 150 Da (A), ampliado na faixa de m/z 150 a 200 Da (B), ampliado na faixa de m/z 200 a 250 Da (C), ampliado na faixa de m/z 300 a 350 Da (D), ampliado na faixa de m/z 350 a 400 Da (E) e ampliado na faixa de m/z 450 a 500 Da (F).....	168-169
Figura 67 -	Voltamogramas cíclicos obtidos em GCE, para $1,0 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ de PTD, a pH: (A) 1,0, (B) 4,0, (C) 7,0 e (D) 9,0; e para $1,0 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ de PAF a pH: (E) 1,0, (F) 4,0, (G) 7,0 e (H) 9,0. (—) branco (eletrólito suporte), (—) primeira varredura e (—) segunda varredura, Velocidade de varredura $\nu = 50,0$ mV s ⁻¹	171
Figura 68 -	Voltamogramas cíclicos obtidos em GCE, para $1,0 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ de PTD (A) e de PAF (B), a pH 7,0 no intervalo de velocidade de varredura de 5,0 – 500,0 mVs ⁻¹	172
Figura 69 -	Voltamogramas de pulso diferencial em 3D, com linha de base corrigida, em GCE, para $1,0 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ de PTD: (A) oxidação e (B) redução e $1,0 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ de PAF: (C) oxidação e (D) redução, em diferentes pHs de eletrólito de suporte. Velocidade de varredura $\nu = 5,0$ mV s ⁻¹ . Gráficos <i>Eap</i> vs. pH para a PTD (E) e para o PAF (F).....	173
Figura 70 -	Voltamogramas de onda quadrada obtidos em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ , a pH 7,0, para $1,0 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ de PTD (A) e PAF (B) em GCE. Velocidade de varredura $\nu_{ef} = 50,0$ mV s ⁻¹ . I_t – corrente de pico total, I_d – corrente de pico direta e I_i – corrente de pico inversa.....	176
Figura 71 -	Voltamogramas de pulso diferencial, com linha de base corrigida, obtidos em GCE, tampão de fosfato 0,1 mol L ⁻¹ a pH 7,0, nas concentrações de 0,1, 0,2, 0,4, 0,5, 0,6, 0,8 e $1,0 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹ de PTD (A) a para o PAF (B). Voltamograma de pulso diferencial obtidos para as amostras de soro fetal bovino (—) e de urina artificial (—). Velocidade de varredura $\nu = 5,0$ mV s ⁻¹	177
Figura 72 -	Voltamograma de pulso diferencial obtido, com linha de base corrigida, para o filme multicamadas espesso de queratina humana nativa adsorvida no GCE, em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ a pH 8,0. Velocidade de varredura $\nu = 5,0$ mV s ⁻¹	180
Figura 73 -	(A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos, em 3D, com linha de base corrigida, para o filme multicamadas espesso de queratina capilar humana adsorvida no GCE, em diferentes pHs de eletrólitos suporte. (B) Gráfico de potencial de pico de oxidação do filme espesso de multicamadas de queratina capilar humana adsorvido no GCE (▲) Ep1Cis e (■) Ep2Cis + Met e de corrente de pico (▲) Ip1Cis e (■) Ip2Cis + Met vs. pH. Velocidade de varredura $\nu = 5,0$ mV s ⁻¹	181
Figura 74 -	Estrutura 3D da queratina humana recombinante 36 (ab160141).....	182
Figura 75 -	Gráfico de hidropaticidade da sequência da cadeia de aminoácidos da proteína queratina humana recombinante 36. Aminoácidos eletroativos: cisteína (amarelo), tirosina (vermelho), triptofano (verde), histidina	

	(roxo) e metionina (azul).....	184
Figura 76 -	Voltamogramas de pulso diferencial obtidos, com linha de base corrigida, para o filme de multicamadas espesso de queratina humana adsorvido no GCE, em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ a pH 8,0: (—) biossensor eletroquímico de queratina nativa e (—) desnaturada em: (A) 6,0 mol L ⁻¹ de uréia, (B) SDS 33,3 mmol L ⁻¹ , (C) TCEP 10,0 mmol L ⁻¹ , durante diferentes períodos de tempo de 30, 60, 90 e 120 minutos. Velocidade de varredura de 5,0 mV s ⁻¹	185-186
Figura 77 -	Voltamogramas de pulso diferencial obtidos, com linha de base corrigida, para o filme de multicamadas espesso de queratina humana adsorvido no GCE, em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ a pH 8,0: (—) biossensor eletroquímico de queratina nativa e (—) incubada em: (A) PTD 2,0×10 ⁻⁷ mol L ⁻¹ , (B) PAF 2,0×10 ⁻⁷ mol L ⁻¹ , (C) PTD e PAF (1:1) 2,0×10 ⁻⁷ mol L ⁻¹ , durante diferentes períodos de tempo de 30, 60, 90 e 120 minutos. Velocidade de varredura de 5,0 mV s ⁻¹	187-188
Figura 78 -	Espectros de impedância de plano complexo, em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ a pH 8,0, em K ₄ [Fe(CN) ₆]/K ₃ [Fe(CN) ₆] a 5,0 mmol L ⁻¹ , no potencial do ponto médio aplicado, E _{ap} = + 0,25 V: Controle GCE (☆), controle do biossensor eletroquímico de queratina antes (violeta) e após interação com precursores de tintura de cabelo: (A) PTD, (B) PAF e (C) PTD + PAF, durante diferentes tempos de incubação: 30 (verde), 60 (azul) e 120 minutos (vermelho). Circuitos elétricos equivalentes (a1), (b1) e (c1).....	190-191
Figura 79 -	NPM de ferro funcionalizadas com grupos ácido carboxílico (A) e NPM de ferro funcionalizadas com grupos ácido carboxílico e L-cisteína (B).....	193
Figura 80 -	Espectro de IR obtido para NPM-AC (linha preta) e para as NPM-AC-LC (linha vermelha).....	194
Figura 81 -	Imagens de MEV-FEG obtidas para as NPM-AC-LC aumentadas 1.500 vezes (A), 5.000 vezes (B), 50.000 vezes (C) e 100.000 vezes (D).....	196
Figura 82 -	Histograma referente ao diâmetro das NPM-AC-LC.....	197
Figura 83 -	Espectro de energia dispersiva de raios X (EDX) das NPM-AC-LC.....	197
Figura 84 -	Imagens de MEV-FEG da superfície do eletrodo de carbono impresso aumentada 15.000 vezes (A), das NPM-AC-LC sobre a superfície do eletrodo de carbono impresso aumentadas 1.500 vezes (B), 5.000 vezes (C) e 25.000 vezes (D).....	198
Figura 85 -	Imagens de TEM das NPM-AC-LC (A), imagens HR-TEM das NPM-AC-LC (B), imagem ampliada da área das NPM-AC-LC (C) e padrão de difração cristalina de uma NPM-AC-LC (D).....	199

Figura 86 -	Difratograma de raios X das NPM-AC-LC.....	201
Figura 87 -	Voltamogramas cíclicos obtidos para a oxidação $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão BR (pH 4,0) (A) e para $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de PTD em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão BR (pH 4,0) em eletrodo impresso de carbono (B), eletrodo impresso modificado com NPM-AC (C) e eletrodo impresso modificado com NPM-AC-LC (D). Velocidade de varredura $v = 50,0 \text{ mV s}^{-1}$	202
Figura 88 -	Voltamogramas cíclicos obtidos para a oxidação $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão BR (pH 4,0) (A) e para $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de PAF em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão BR (pH 4,0) em eletrodo impresso de carbono (B), eletrodo impresso modificado com NPM-AC (C) e eletrodo impresso modificado com NPM-AC-LC (D). Velocidade de varredura $v = 50,0 \text{ mV s}^{-1}$	203
Figura 89 -	Tempo de deposição de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de PTD (A) e PAF (B), em tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 4,0, em eletrodo impresso de carbono modificado com NPM-AC-LC.....	204
Figura 90 -	Concentração de NPM-AC-LC em $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de PTD (A) e PAF (B) em tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 4,0.....	205
Figura 91 -	Volume de NPM-AC-LC em $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de PTD (A) e PAF (B) em tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 4,0.....	206

Lista de esquemas

Esquema 1 -	Mecanismo de biossíntese da eumelamina e da feomelanina.....	56
Esquema 2 -	Mecanismo de fixação do corante temporário Acid Orange 7 na fibra do fio de cabelo.....	70
Esquema 3 -	Mecanismo de fixação do corante temporário Basic Red 76 na fibra do fio de cabelo.....	71
Esquema 4 -	Processo químico de tingimento dos cabelos e os principais produtos formados, pela reação química entre a PFD e o RSN, na presença de peróxido de hidrogênio e amônia.....	76
Esquema 5 -	Representação esquemática da reação de oxidação da PTD, em meio alcalino, na presença e na ausência de peróxido de hidrogênio.....	114
Esquema 6 -	Representação esquemática da reação de oxidação do PAF, em meio alcalino, na presença e na ausência de peróxido de hidrogênio.....	131
Esquema 7 -	Representação esquemática da reação entre a PTD e o PAF, em meio alcalino, na presença e na ausência de hidrogênio.....	153
Esquema 8 -	Mecanismos de oxidação eletroquímica propostos para a PTD e para o PAF no GCE.....	175
Esquema 9 -	Representação esquemática da reação de funcionalização das NPM funcionalizadas de grupos ácido carboxílico com L-cisteína.....	200

Lista de tabelas

Tabela 1	- Aminoácidos encontrados no cabelo humano natural.....	58-60
Tabela 2	- Aminoácidos encontrados na queratina do cabelo humano natural.....	61-62
Tabela 3	- Corantes temporários ácidos e básicos utilizados no tingimento dos cabelos.....	69-70
Tabela 4	- Compostos utilizados como corantes semipermanentes no tingimento dos cabelos.....	72
Tabela 5	- Estruturas propostas dos compostos detectados por MS/MS durante a oxidação da PTD, em tampão amônio 0,1 mol L ⁻¹ a pH 8,0, na presença e na ausência de peróxido de hidrogênio.....	106-107
Tabela 6	- Estruturas propostas dos compostos detectados por MS/MS durante a oxidação do PAF, em tampão amônio 0,1 mol L ⁻¹ a pH 8,0, na presença e na ausência de peróxido de hidrogênio.....	119-120
Tabela 7	- Estruturas propostas dos compostos detectados por MS/MS durante a reação da PTD e o PAF, na proporção de (1:1), em tampão amônio 0,1 mol L ⁻¹ a pH 8,0, na presença e na ausência de peróxido de hidrogênio.	138-140
Tabela 8	- Resultados dos testes de mutagenicidade obtidos para o derivado da BB, analisada com a cepa Salmonella YG1041, com e sem ativação metabólica.....	156
Tabela 9	- Resultados dos testes de mutagenicidade obtidos para o Trímero, analisada com a cepa Salmonella YG1041, com e sem ativação metabólica.....	157
Tabela 10	- Resultados dos testes de mutagenicidade obtidos para o Precipitado (tetrâmero), analisada com a cepa Salmonella YG1041, com e sem ativação metabólica.....	158
Tabela 11	- Resultados dos testes de mutagenicidade obtidos para os produtos Precipitados 4,5,6 e 7, analisada com a cepa Salmonella YG1041, com e sem ativação metabólica	159
Tabela 12	- Teste de toxicidade aguda em <i>Daphnia similis</i> . Resultados expressos em efeito concentração 50%, 48 horas (EC50).....	160
Tabela 13	- Parâmetros cromatográficos obtidos para a PTD e para o PAF por CLAE/DAD.....	163
Tabela 14	- Valores de recuperação obtidos para a PTD nas amostras de água e efluente de salão de cabelereiros.....	164
Tabela 15	- Valores de recuperação obtidos para o PAF nas amostras de água e efluente de salão de cabelereiros.....	164-165
Tabela 16	- Comparação entre as figuras de mérito do método proposto, com o de outros métodos relatados na literatura, para a determinação de PTD e	

	PAF.....	178
Tabela 17 -	Determinação de PTD e de PAF nas amostras de fluídos biológicos de soro fetal bovino e de urina artificial.....	179
Tabela 18 -	Parâmetros de Randles obtidos para $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, do plano complexo da EIS, em GCE sem modificação, no biossensor eletroquímico de queratina e após a interação com precursores de corantes capilares PTD, PAF e PTD + PAF, durante diferentes períodos de tempo.....	191-192

Lista de siglas e abreviaturas

® - Marca Registrada

¹H-RMN – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

3D – Três Dimensões

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APHA – Associação Americana de Saúde (American Health Association)

BB – Base de Bandrowski

BR – Britton-Robinson

CCD – Cromatografia de Camada Delgada

CE – Energia de Colisão (Collision Energy)

CEM₂ – Concentração Efetiva Mínima

CG – Cromatografia Gasosa

CHT – Quitosana (chitosan)

Cis – Cisteína

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CUR – Gás de Cortina

CV – Voltametria Cíclica (Cyclic Voltammetry)

CXP – Potencial de Saída de Colisão

D – Coeficiente de Difusão

DAD – Detector por Arranjo de Diodos

DE – Detecção Eletroquímica

DMSO – Dimetilsulfóxido

DP – Potencial de Depleção (Depletion Potential)

DPV – Voltametria de Pulso Diferencial (Differential Pulse Voltammetry)

Dr. – Doutor

Dr.^a. - Doutora

E – Potencial

EC – Concentração Efetiva (Effective Concentration)

EC – Eletroforese Capilar

EIS – Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (Electrochemical Impedance Spectroscopy)

Eox – Potencial de Oxidação

EP – Potencial de Entrada (Entrance Potential)

Epa – Potencial de Pico Anódico

Epc – Potencial de Pico Catódico

EQM – Eletrodo Quimicamente Modificado

Ered – Potencial de Redução

EUA – Estados Unidos da América

GCE – Eletrodo de Carbono Vítreo (Glassy Carbon Electrode)

H – Altura dos Pratos Teóricos

His – Histidina

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (High Performance Liquid Chromatography)

HR-TEM - Microscopia de Transmissão Eletrônica de Alta Resolução (High Resolution Transmission Electronic Microscopy)

IARC – Agência Internacional para a Pesquisa sobre Câncer (International Agency for Research on Cancer)

Ipa – Corrente de Pico Anódico

Ipc – Corrente de Pico Catódico

IR – Infravermelho (Infrared)

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

M. P. – Método Proposto

m/z – Razão *massa/carga*

Met – Metionina

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

MNP – Magnetic Nanoparticles (Nanopartículas Magnéticas)

MS/MS – Espectrometria de Massas Sequencial

MWNTS - Nanotubos de Carbono de Múltiplas Paredes (Multiple Wall Carbon Nanotubes)

N – Número de Pratos Teóricos

NAT1 – N-Acetiltransferase 1

NAT2 – N-Acetiltransferase 2

NPM – Nanopartículas Magnéticas

NPM-AC – Nanopartículas Magnéticas Funcionalizadas com Grupos Ácido Carboxílico

NPM-AC-LC – Nanopartículas Magnéticas Funcionalizadas com Grupos Ácido Carboxílico e L-Cisteína

OMS – Organização Mundial de Saúde

PAF – *p*-aminofenol

PAP – *p*-aminophenol

PFD – *p*-fenilenodiamina

pH – Potencial Hidrogeniônico

PTD – *p*-toluenodiamina

Prof. – Professor

Prof^a. Professora

QDI - Quinonadiimina

R² – Coeficiente de Correlação

R_{ct} – Resistência de Transferência de Carga

R_f – Fator de Retenção

RPM – Rotações por minuto

R_s – Resolução

RSN – Resorcinol

s – Coeficiente Ângular da Reta (Inclinação da Reta)

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

SP – São Paulo

std – Desvio Padrão

SWW – Voltametria de Onda Quadrada (Square Wave Voltammetry)

TCEP – tris(2-carboxietil)fosfina

TEM – Microscopia de Transmissão Eletrônica (Transmission Electronic Microscopy)

t_R – Tempo de Retenção

t_R' – Tempo de Retenção Corrigido

UC – Universidade de Coimbra

UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas

USEPA – Associação de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (United States Environmental Protection Association)

UV-Vis – Ultravioleta e Visível

W_{1/2} – Largura de Pico a Meia Altura

Lista de símbolos e unidades

% - porcentagem
< - menor
> - maior
 $\leq$ - menor ou igual
 $\geq$ - maior ou igual
 α – alfa
 β – beta
o – orto
m – meta
p – para
v – velocidade de varredura
v/v – volume/volume
v/v/v – volume/volume/volume
nm – nanômetros
 $\mu\text{mol g}^{-1}$ – micromol por grama
g – gramas
mg – miligramas
mL – mililitros
 mL min^{-1} – mililitro por minuto
 mol L^{-1} – mol por litro
 $\mu\text{g L}^{-1}$ – microgramas por litro
 mg L^{-1} – miligramas por litro
cm – centímetros
Da – Daltons
 μL – microlitros
mm – milímetros
V – Volts
mV – milivolts
ms - milisegundos
 mV s^{-1} – milivolts por segundo
A – Ampere

org – organismos

$\mu\text{L min}^{-1}$ – microlitros por minutos

$\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ – microgramas por microlitros

psi – libra-força por polegada quadrada

$\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ – nanogramas por microlitros

Hz – Hertz

ppm – partes por milhão

$^{\circ}\text{C}$ – graus Célcus

μm - micrometros

mg mL^{-1} – miligramas por mililitro

$\mu\text{S cm}^{-1}$ – microSiemens por centímetro

nA – nanoámpere

KHz – quilohertz

lux – nível de iluminância

mmol L^{-1} – milimol por litro

g mol^{-1} – gramas por mol

$\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ – centímetro quadrado por segundo

mM – milimolar (milimol por litro)

Sumário

1. Introdução.....	43
2. Revisão bibliográfica.....	46
2.1. Estrutura e morfologia do cabelo humano.....	46
2.2. Coloração do cabelo humano.....	54
2.3. Composição química do cabelo humano.....	57
2.4. Tinturas de cabelos.....	66
2.5. Toxicidade, mutagenicidade, carcinogenicidade e genotoxicidade das tinturas de cabelos.....	77
2.6. Métodos analíticos desenvolvidos e utilizados na quantificação e monitoramento de corantes capilares em diversas matrizes.....	82
3. Objetivos.....	87
4. Parte experimental.....	87
4.1. Reagentes e equipamentos.....	87
4.2. Oxidação da PTD, do PAF e a reação entre ambos.....	88
4.3. Produtos de oxidação da PTD, do PAF e da reação entre ambos.....	89
4.4. Monitoramento da PTD, do PAF e da reação entre ambos.....	90
4.5. Testes de mutagenicidade e toxicidade dos produtos formados pela reação de oxidação da PTD, do PAF, e da reação entre ambos.....	91
4.6. Determinação de PTD e de PAF em amostras de águas e rejeitos de cabeleireiros por CLAE/DAD em MS/MS.....	93
4.7. Estudo do comportamento eletroquímico e os mecanismos de transferência eletrônica da PTD e do PAF.....	95
4.8. Determinação eletroquímica da PTD e do PAF em fluidos biológicos.....	96
4.9. Comportamento de oxidação eletroquímica da queratina humana adsorvida no GCE (biossensor eletroquímico de queratina).....	97
4.10. Estudo eletroquímico da queratina humana desnaturada adsorvida no GCE.....	97
4.11. Estudo eletroquímico da interação da queratina capilar humana com a PTD e o PAF no biossensor eletroquímico de queratina.....	98
4.12. Aquisição e apresentação de dados eletroquímicos.....	99
4.13. Construção do suporte magnético para eletrodo impresso.....	99
4.14. Funcionalização das nanopartículas magnéticas (NPM) de grupos ácido carboxílicos com L-cisteína.....	100

4.15. Caracterização das NPM-AC-LC.....	100
4.16. Comportamento eletroquímico da PTD e do PAF com as NPM-AC-LC.....	101
4.17. Otimização dos parâmetros eletroquímicos.....	102
4.18. Avaliação do efeito de matriz.....	101
5. Resultados e discussão.....	103
5.1. Oxidação da PTD, do PAF e a reação entre ambos.....	103
5.1.1. Monitoramento da oxidação da PTD por espectrometria de massas (MS/MS).....	103
5.1.2. Monitoramento da oxidação da PTD por espectrofotometria UV-Vis.....	107
5.1.3. Caracterização dos produtos de oxidação da PTD por espectrometria de infravermelho (IR).....	109
5.1.4. Caracterização dos produtos de oxidação da PTD por ¹ H-RMN.....	111
5.1.5. Reação de oxidação da PTD.....	113
5.1.6. Monitoramento da oxidação do PAF por espectrometria de massas (MS/MS).....	115
5.1.7. Monitoramento da oxidação do PAF por espectrofotometria UV-Vis.....	120
5.1.8. Caracterização dos produtos de oxidação do PAF por espectrometria de infravermelho (IR).....	121
5.1.9. Caracterização dos produtos de oxidação da PTD por ¹ H-RMN.....	126
5.1.10. Reação de oxidação da PTD.....	130
5.1.11. Monitoramento da reação entre a PTD e o PAF por espectrometria de massas (MS/MS).....	131
5.1.12. Monitoramento da reação entre a PTD e o PAF por espectrofotometria UV-Vis.....	140
5.1.13. Caracterização dos produtos da reação entre a PTD e o PAF por espectrometria de infravermelho (IR).....	143
5.1.14. Caracterização dos produtos de reação entre a PTD e o PAF por ¹ H-RMN.....	150
5.1.15. Reação entre a PTD e o PAF.....	153
5.2. Testes de mutagenicidade e toxicidade dos produtos formados pela reação de oxidação da PTD, do PAF e da reação entre ambos.....	154
5.3. Desenvolvimento da metodologia analítica para a determinação de PTD e PAF em amostras de águas e rejeitos de salão de cabeleireiros por CLAE/DAD e MS-MS.....	161
5.4. Comportamento eletroquímico da PTD e do PAF no GCE.....	169
5.4.1. Voltametria cíclica (CV).....	169

5.4.2. Voltametria de pulso diferencial (DPV).....	172
5.4.3. Voltametria de onda quadrada (SWW).....	175
5.5. Determinação eletroquímica da PTD e do PAF em fluídos biológicos.....	176
5.6. Comportamento de oxidação eletroquímica da queratina humana adsorvida no GCE (biossensor eletroquímico de queratina).....	179
5.7. Estudo eletroquímico da queratina humana desnaturada adsorvida no GCE...183	183
5.8. Estudo eletroquímico da interação da queratina capilar humana com PTD e PAF no biossensor eletroquímico de queratina.....	186
5.9. Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS).....	190
5.10. Funcionalização das NPM de grupos ácido carboxílico com L-cisteína.....	193
5.11. Caracterização das NPM-AC-LC.....	193
5.12. Comportamento eletroquímico da PTD e do PAF sobre as NPM-AC-LC.....	201
5.13. Otimização dos parâmetros eletroquímicos.....	204
6. Considerações Finais.....	207
7. Referências bibliográficas.....	209
Apêndice.....	231

1. Introdução

O cabelo é um componente muito importante do corpo dos mamíferos, pois é um revestimento externo que colabora para criar uma barreira de proteção do animal e o ambiente ao qual ele está inserido (1,2). Embora não possua uma função biológica vital nos seres humanos, os cabelos possuem significados psicológicos consideráveis, tendo papel fundamental na construção da imagem e na identificação corporal de homens e mulheres (1-5).

O comprimento, cor e estilo dos cabelos são imprescindíveis para a aparência física e auto-percepção, podendo ser modificados de acordo com o desejo e de como o indivíduo quer ser visto diante dos demais (5). Diferente de outros atributos físicos, a mudança nos cabelos podem ser facilmente realizadas, sem a necessidade de se recorrer a um procedimento cirúrgico (3,4,6). Talvez por esta razão, desde a antiguidade, os homens têm desenvolvido produtos e técnicas que buscam as mais diversas mudanças e alterações nas características físicas dos cabelos como: cor, textura e forma. (1,4)

O ser humano ao longo de sua existência sempre destinou parte de seus cuidados pessoais aos cabelos, o que pode ser comprovado pela imensa quantidade de produtos cosméticos e farmacêuticos criados, cujas funções vão desde uma simples limpeza, restauração de fios danificados, alterações das características físicas, até a remediação contra a queda, a calvície e demais doenças inerentes aos cabelos. Diante da vasta variedade de produtos destacam-se os corantes capilares, que tem como função primordial devolver e/ou alterar a pigmentação natural dos cabelos. (4,7)

As tinturas capilares são classificadas, de acordo com a origem, em tinturas vegetais, onde a tintura é obtida ou extraída de plantas ou parte delas (ex. henna, camomila e cinchona), em minerais ou metálicos, onde alguns minerais ou sais metálicos são utilizados para escurecer ou clarear gradualmente os cabelos (ex. nitrato de prata ou sais de chumbo), e em sintéticas, que são classificadas de acordo com a resistência à lavagem e pelo grau de permanência. (2,8-10)

As tinturas sintéticas capilares podem ser basicamente classificadas como: temporárias, semipermanentes e permanentes (2,4,8,11-13,16-18). Dentre estas, as tinturas permanentes são as mais utilizadas e representa ao redor de 80% dos corantes usados no mercado mundial, devido principalmente à sua durabilidade, versatilidade e facilidade de aplicação. (8,12,17)

O uso de corantes capilares sintéticos aumentou significativamente ao longo dos anos em todo o planeta, isto se deve ao fato do consumidor ter uma variedade cada vez maior de produtos de diferentes marcas, composições e colorações à sua disposição. As mulheres são as maiores consumidoras, onde atualmente mais de 50% das mulheres em todo o mundo fazem o uso de tinturas de cabelos sintéticas comerciais. Dentre os homens, acredita-se que pelo menos 25% dos homens em todo o planeta fazem regularmente o uso de tinturas de cabelos sintéticas comerciais. (11,14-21)

Nos Estados Unidos, aproximadamente 33% das mulheres com idade superior a 18 anos e mais de 10% dos homens com mais de 40 anos colorem seus cabelos (8,11,22,23). Dentro deste panorama, o Brasil não fica muito atrás. Uma pesquisa realizada pelo Target Group Index mostrou que cerca de 26% da população adulta utiliza com frequência tintura para os cabelos, sendo que desse total de pessoas, 85% é composto por mulheres e 15% por homens. (8)

O processo químico de tingimento dos cabelos com corantes permanentes é bastante complexo, envolvendo múltiplos componentes com diferentes funções e baseado em processos tecnológicos desenvolvidos e aprimorados há mais de 150 anos. Em um tingimento rotineiro, o processo é basicamente norteado por complexas reações oxidativas entre duas substâncias misturadas em meio alcalino e oxidante. (8,24-27)

Uma dessas substâncias utilizadas na composição da cor de corantes capilares permanentes é o intermediário primário, que também é denominado de agente precursor. O agente precursor consiste basicamente de aminas aromáticas orto e para-substituídas com grupos amino e/ou hidroxilas, tal como a *p*-fenilenodiamina (PFD), a *p*-toluenodiamina (PTD), o *p*-aminofenol (PAF) e seus derivados (2,11,13,23,27).

Outro componente utilizado na mistura é o agente acoplador ou modificador, onde são muito utilizados os derivados aromáticos meta-substituídos, tal como: *m*-fenilenodiaminas, os *m*-aminofenóis, resorcinol (RSN), naftol, dentre outros. Os acopladores são substâncias que tem a função de determinar a cor final da coloração, por meio da reação com a forma oxidada dos intermediários primários, em uma proporção molar aproximada de (1:1), seguida por outras reações de acoplamento oxidativo. (2,8,11,27)

Por fim, é utilizado um agente oxidante em meio alcalino. Preponderantemente é preferido o uso do peróxido de hidrogênio na presença de amônia. (4,8,27)

Diante desses componentes, o processo de tintura permanente ocorre com a mistura do intermediário primário e o agente acoplador em meio alcalino na presença de uma solução de

peróxido de hidrogênio. A mistura então é aplicada nos cabelos, onde os precursores, e os acopladores juntamente com o peróxido de hidrogênio difundem para o interior do fio de cabelo, onde após reações químicas específicas forma-se um composto colorido com alta massa molar que são absorvidos pelo córtex capilar. (4,8,27)

De modo geral, os compostos químicos presentes nas tinturas capilares sintéticas permanentes como precursores, acopladores, aditivos, entre outros são considerados, de certa forma, os compostos mais reativos da indústria cosmética, o que faz a formação da cor permanente um processo complexo e que envolve sequencialmente a oxidação do intermediário primário com vários acopladores. (8)

A tonalidade final da coloração depende principalmente da composição, da quantidade e da natureza dos produtos utilizados. Depende também do pH, do tempo, da temperatura de reação e da velocidade de difusão dos componentes para o interior do fio de cabelo. Deste modo, após um processo rotineiro de tintura, pode-se encontrar nas formulações de tinturas de cabelos diferentes produtos químicos imprescindíveis para desenvolvimento da cor, persistência e estabilidade, além de grande profusão de corantes com as mais diversas características. Assim, a tintura de cabelo é uma arte ditada pela cinética química de uma complexa reação e por mecanismos de difusão. (18,27)

Ao longo dos anos a PTD e o PAF veem sendo cada vez mais utilizados nas composições de tinturas capilares permanentes (8,25,28-30). Em alguns casos, como por exemplo no leste europeu, a PTD é utilizada em muitas formulações para substituir a PFD (8,28,29). Além disso, a PTD é também muito utilizada como intensificador de cor na produção de tintas para tatuagens de henna e síntese de alguns azo corantes, como o vermelho básico 2 e o marrom ácido 103. (28,30)

Atualmente, a classe das arildiaminas, a qual pertence a PFD, a PTD e seus derivados, tem preocupado cada vez mais as agências de saúde e de meio ambiente ao redor do mundo a respeito dos aspectos ambientais e toxicológicos (8,28). Isso faz que com que essas substâncias fiquem sujeitas a regras e regulamentos mais criteriosos e exigentes. A *The European Economic Community Cosmetics* determinou, em uma diretiva, valores limites de concentração máxima permitida de diversas fenilenodiaminas nas composições de corantes capilares permanentes e em tinturas de henna. Esses valores são de 6% para a PFD e 10% para a PTD, desde que esses produtos apresentem excesso de acopladores em sua composição. (28)

As tinturas capilares sintéticas apresentam relativa toxicidade, onde grande parte dos principais ingredientes que compõem suas formulações, como a PFD, a PTD e o PAF apresentam propriedades de toxicidade aguda moderadas (27), bem como riscos associados a alergias e dermatites. (8,27,31-33)

As aminas utilizadas como precursores podem ser facilmente oxidadas quando expostas, por exemplo, a luz solar ou ao oxigênio dissolvido no meio (28,34,35), podendo se polimerizar e formar subprodutos de alta toxicidade, como a Base de Bandrowski (BB), que é produzida pela oxidação e posterior polimerização da PFD. (8,28,36)

A presença dos acopladores na composição das tinturas capilares tem por função formar o corante de coloração desejada, e isso faz com que a formação de subprodutos oriundos da oxidação dos precursores seja atenuada. Porém, mesmo nas condições determinadas pelo fabricante, nem todo o precursor presente na formulação reage com o acoplador, de modo que uma certa quantidade desses subprodutos é formada (28). Portanto, um estudo das propriedades, do comportamento do mecanismo de reação, dos produtos e subprodutos que são gerados dessas aminas é de grande valia e extremamente necessários para o entendimento do processo de tingimento dos cabelos como um todo.

A maioria dos estudos com foco nos riscos ao meio ambiente e à saúde humana por estes corantes, seus precursores, acopladores, aditivos e produtos secundários formados são baseados nos corantes permanentes com uso da *p*-fenilamina, da PFD e de alguns aminofenóis (8,37). No entanto, pouco se sabe ainda a respeito desses compostos, o que é bastante preocupante, pois sabe-se que algumas aminas aromáticas usadas na preparação das formulações das tinturas sintéticas, ou formadas por biodegradação e/ou por degradação parcial dos corantes usados são substâncias biologicamente ativas e podem ser absorvidas percutaneamente (38-40), o que poderia produzir efeitos mutagênicos ou carcinogênicos (38-42). Todavia, a toxidade dos corantes de cabelos e os ingredientes usados na sua composição ainda é pouco investigada, com dados bastante conflitantes, principalmente em relação ao real risco aos consumidores. (9,11)

Além disso, poucos estudos também são encontrados com foco no monitoramento desses compostos, de seus produtos e subprodutos reacionais em amostras ambientais de águas de rejeito de salão de beleza, águas superficiais e água potável, e em amostras biológicas como sangue, urina e outros fluidos biológicos. Outro aspecto importante, e que precisa ser avaliado, é a formação dos produtos principais e secundários destas reações com outros compostos utilizados na composição das tinturas capilares, que também são pouco

estudados e podem ser formados durante o processo de tintura permanente. Isto poderia ser de alta relevância no entendimento da persistência, biotransformação, toxicidade, genotoxicidade, mutagenicidade e avaliação da presença dessas substâncias em amostras biológicas como sangue, urina e outros fluidos biológicos, e em amostras ambientais como efluentes de salões de cabeleireiros, água de captação de estações de tratamento de água bem como no meio ambiente como um todo, uma vez que esses efluentes são descartados no esgoto comum das cidades podendo contaminar os reservatórios de captação de água para abastecimento das cidades, ressaltando que as técnicas convencionais utilizadas para o tratamento de água não conseguem, de maneira efetiva, tratar esse tipo de resíduo. (43-45)

2. Revisão bibliográfica

2.1. Estrutura e morfologia do cabelo humano

Os pêlos e/ou cabelos são importantes componentes na estrutura fisiológica de um organismo animal (1,2). Presente exclusivamente nos corpos dos mamíferos, os pelos e/ou cabelos podem ser definidos como estruturas epidermais bastante especializadas. (2,7)

O cabelo é considerado a primeira barreira mecânica de proteção do corpo dos mamíferos contra agentes externos presentes no ambiente, protegendo o indivíduo principalmente contra as radiações solares e a abrasão mecânica. Além disso, os cabelos também atuam como isolante térmico, contribuem significativamente no aumento da superfície de evaporação do suor, auxilia nas funções nervosas e sensoriais cutâneas, e na regeneração epidérmica (1,2). Em especial, os pêlos presentes no interior das fossas nasais têm como função filtrar o ar inspirado, servindo como filtro de retenção de material particulado suspenso no ar, além de retardar o fluxo de ar para o sistema respiratório, podendo aquecer ou resfriar o ar inspirado para o interior do corpo (46). Nos seres humanos, além das funções biológicas, o cabelo tem um grande significado psicológico (1,2,5), participando da construção e no desenvolvimento da imagem corporal, comunicação e expressão de emoções (pelos das sobrancelhas), da estética e na autoidentificação dos homens e das mulheres. (2,3,4)

O cabelo consiste basicamente de uma raiz localizada na parte interna da derme e de uma haste projetada, em forma de tubo, para a parte externa da epiderme, conforme é mostrado na Figura 1. (8)

O folículo piloso ou capilar cresce longitudinalmente, de forma contínua e inclinada, dentro do canal pilárico ou poro (região que compreende desde a entrada do ducto da glândula

sebácea até a superfície da pele) até a parte externa da epiderme. Na parte inferior, o folículo piloso, Figura 1, apresenta uma região basal bastante dilatada, em formato de cebola, com um diâmetro maior em relação ao restante de sua estrutura, denominada de bulbo, que tem sua cavidade interna totalmente preenchida com um tecido conectivo denominado de papila dermal. (7,8,46)

A parte do folículo superior ao bulbo, Figura 1, que se estende através do canal pilárico, é denominada de haste. A haste do cabelo tem um formato cilíndrico e é bastante resistente as diferentes forças degenerativas como: fricção, tensão e radiação ultravioleta (46).

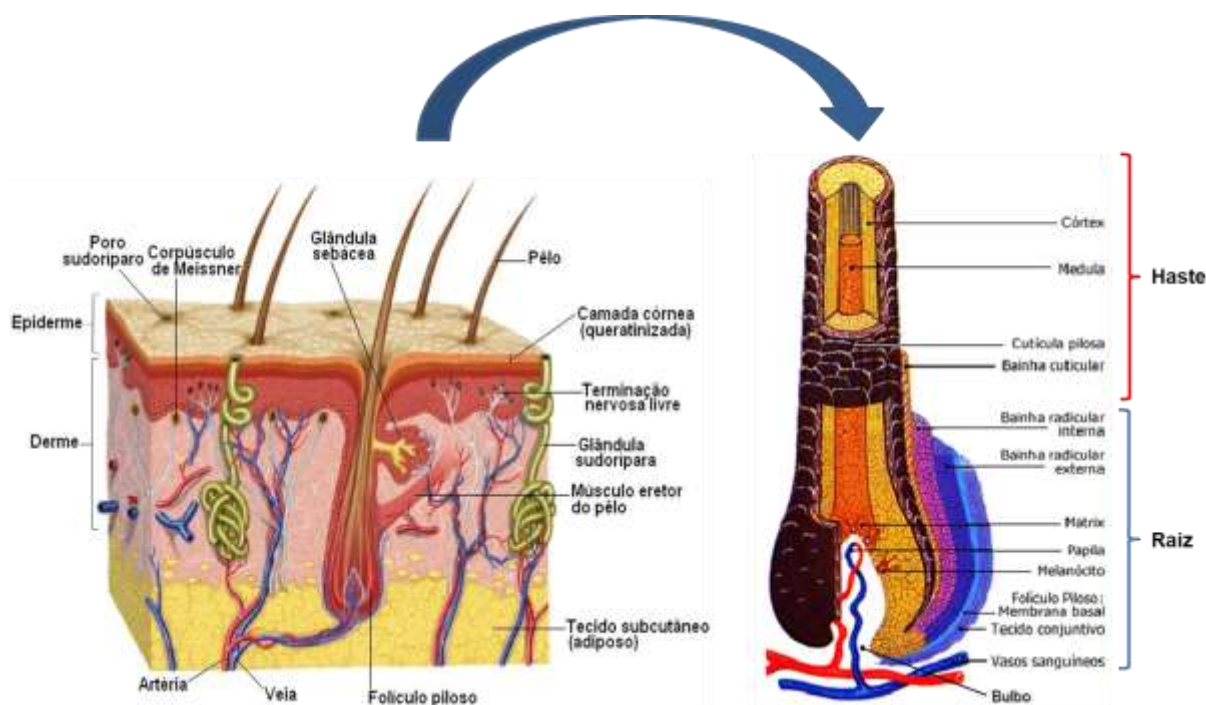


Figura 1. Estrutura tegumentar humana com uma unidade pilossebácea.

Fonte: Adaptado do site “Aula de Anatomia.com” (<https://www.auladeanatomia.com/novosite/sistemas/sistema-tegumentar>) (47), e do site “Tricologia” (https://www.tricologia.com.br/sobre_cabelos_2.asp) (48). Acessado dia 28/12/2019.

Os cabelos são formados basicamente por um conjunto organizado de células altamente queratinizadas e se divide em quatro camadas: medula, córtex, cutícula e complexo de membrana celular (Figura 1). (7,8,13,46)

A medula é a parte mais interna e fica localizada na parte central dos cabelos (Figura 1). Geralmente é encontrada em cabelos mais grossos, ou seja, com diâmetro maior, e ausentes cabelos mais finos (7,46). Basicamente, a medula é composta por células

queratinizadas e sua estrutura é formada por inúmeros vacúolos, poros e cavidades, com espaços inter e intracelulares cheios de ar (8,46), como pode ser observado em uma imagem de microscopia eletrônica de varredura (MEV), Figura 2, feita da medula do interior de um fio de cabelo. A medula capilar tem como função principal armazenar a melanina (proteína responsável por proporcionar coloração aos cabelos), produzida no bulbo, e não contribui com nenhuma propriedade química ou mecânica dos fio de cabelo (7,8,13,46). Todavia, a medula está diretamente relacionada a características como brilho e tons de coloração dos cabelos. (46)

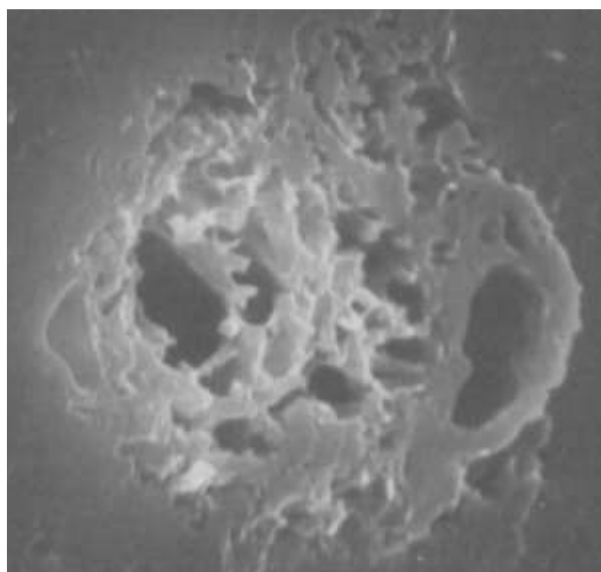


Figura 2. Imagem de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da medula porosa de uma seção transversal da fibra do cabelo.

Fonte: Imagem adaptada do livro Chemical and physical behavior of human hair, 2nd ed., Chap. 1, p. 1-38. (46)

O córtex é a camada superior a medula e constitui a parte mais volumosa dos cabelos (Figura 1). É formado por células fusiformes longas, dispostas longitudinalmente e altamente queratinizadas, denominadas de células corticais (Figura 3). (7,8,13,46)

As células corticais, Figura 3, apresentam aproximadamente 100 μm de comprimento e de 1 a 6 μm de espessura. Essas células contêm em seu interior pequenos grânulos ou partículas ovais ou esféricas, de 0,2 a 0,8 μm de diâmetro, com pigmentos, e apresentam pequenas cavidades alongadas próximo ao centro (46). As células corticais são formadas por subestruturas em forma de fuso, com diâmetro que varia de 0,1 a 0,4 μm , denominada macrofibrilas, que são constituídas por filamentos intermediários delgados altamente organizados denominados de microfibrilas, que tem um diâmetro de aproximadamente 70 Å,

que por sua vez são formadas por feixes de filamentos proteicos ordenados ao longo de um único eixo chamado de protofibrilas (Figura 3). (7,8,46).

No cabelo humano, as macrofibrilas apresentam-se compactadas em feixes com diâmetro aproximado de 2000 Å. Estes feixes estão cercados por uma matriz proteica pouco organizada e de alto teor de enxofre, conforme demonstrado na Figura 3. (7,46)

As protofibrilas são estruturas formadas por três cadeias proteicas α -helicoidais de α -queratina e possui um diâmetro de aproximadamente 20 Å. (7,46)

Toda estrutura do cabelo humano pode ser observada no esquema da Figura 3, e em imagens de MEV na Figura 4, que mostra detalhes da estrutura cortical do cabelo humano.

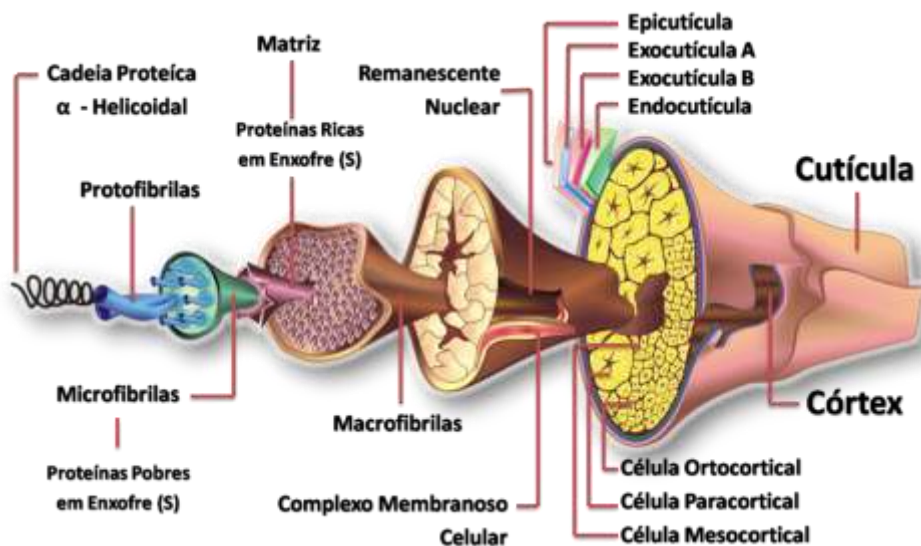


Figura 3. Estrutura do cabelo humano.

Fonte: Adaptado do site “Aula de Anatomia.com” (<https://www.auladeanatomia.com/novosite/sistemas/sistema-tegumentar>) (47), e site “Tricologia” (https://www.tricologia.com.br/sobre_cabelos_2.asp) (48). Acessado dia 30/12/2019.

Além disso, em cabelos que apresentam pigmentação, glânulos de melanina são encontrados e estão distribuídos longitudinalmente em todas as células corticais do córtex capilar. (7,46)

A cutícula, Figura 5, é a camada mais externa e resistente do fio de cabelo, e é a principal barreira de controle de penetração de diferentes compostos e agentes químicos para o interior da estrutura do fio de cabelo. Funcionando como uma espécie de peneira molecular, a cutícula tem como principal função proteger toda a estrutura do fio de cabelo (principalmente o córtex) contra ataques químicos e mecânicos. (7,8,46)

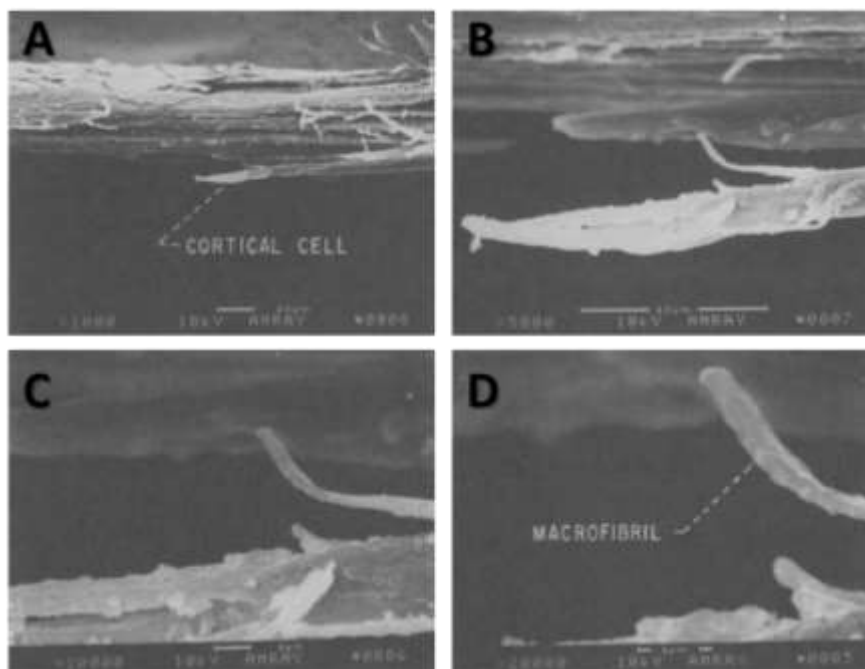


Figura 4. Imagens de MEV do interior do cortéx do cabelo humano aumentada 1.000 vezes (A), 5.000 vezes (B), 10.000 vezes (C) e 20.000 vezes (D).

Fonte: Imagens adaptadas do livro *Chemical and physical behavior of human hair*, 2nd ed., Chap. 1, p. 1-38. (46)

As células da cutícula, Figura 5, são translúcidas, não cristalinas, livres de pigmentação e estão ligadas na extremidade proximal (extremidade da raiz), apontando para a extremidade distal (extremidade da ponta) da fibra capilar como telhas em um telhado, apresentando uma estrutura de escamas com 6 a 10 camadas de espessura, de aproximadamente 0,5 a 1,0 μm de espessura e 45 μm de comprimento. No entanto, próximo da extremidade da raiz, a cutícula contém bordas lisas e ininterruptas, e não possui um sistema altamente organizado a nível molecular. (7,8,46)

A cutícula é altamente rica em enxofre, contendo uma porcentagem mais alta de cistina em relação as demais partes da fibra capilar e de outros aminoácidos que geralmente não são encontrados nos polipeptídeos α -helicodais. É dividida em quatro partes: epicutícula, exocutícula A, exocutícula B e endocutícula, conforme mostrado na Figura 3. (7,8,46)

A exocutícula, Figura 3, é parte que tem a maior concentração de enxofre em relação a endocutícula, possuindo um maior número de ligações cruzadas de dissulfeto (S-S). (7,8,46)

Cada célula da cutícula contém uma fina membrana externa com uma espessura de 25 Å, denominada de epicutícula (7,46). A epicutícula, Figura 3, é composta basicamente por ácidos graxos unidos por um material adesivo composto por uma camada fibrosa de proteína subjacente, conectada por ligações tio-éster de cisteína, de caráter hidrofóbico e bastante

resistente a condições extremas de álcalis, ácidos fortes, agentes oxidantes e redutores, e enzimas. (7,8,46)

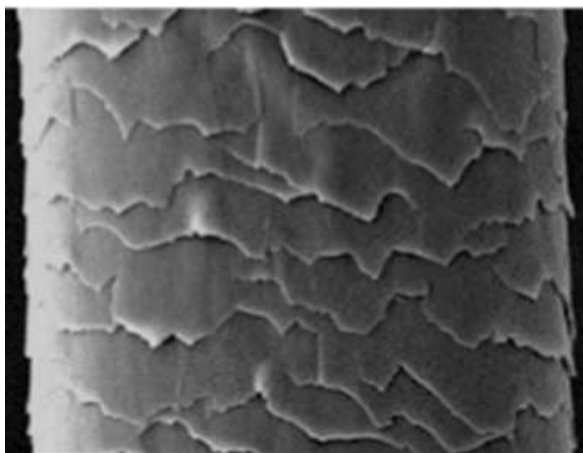


Figura 5. Imagem de MEV da cutícula do cabelo humano.

Fonte: Imagem adaptada do livro Chemical and physical behavior of human hair, 2nd ed., Chap. 1, p. 1-38. (46)

Abaixo da epicutícula, Figura 3, existem três camadas: a exocutícula A, que é uma camada resistente com alto teor de cistina ($> 30\%$); exocutícula B, também rica em cistina (aproximadamente 15%), e a endocutícula, com baixo teor de cistina (aproximadamente 3%). (46)

E finalmente, temos o complexo de membrana celular (Figura 3), que basicamente consiste de membranas celulares ligadas por um material adesivo (cimento). Essas estruturas juntas tem aproximadamente de 300 a $600 \text{ \AA}$ de espessura, e sua camada lipídica externa forma a epicutícula. A camada interna, denominada de cimento intercelular, está localizado entre as células da cutícula, consistindo de uma camada composta de proteínas com baixo teor de cistina ($< 2\%$), com cerca de 12% de aminoácidos básicos e 17% de aminoácidos ácidos. A estrutura das bicamadas lipídicas com as proteínas da membrana incorporadas sofrem alterações conforme os cabelos crescem, embora a matriz estrutural de células adjacentes às membranas permanece inalterada. Além disso, outras conexões celulares podem aparecer entre a cutícula e as células corticais. O complexo de membrana celular e a endocutícula são comumente referidas como regiões não-queratinosas, devido ao baixo nível de aminoácidos contendo enxofre. (8,46)

Um ser humano saudável possui em média de 100 a 150 mil fios de cabelos na cabeça, com um diâmetro que varia de 15 a $110 \text{ }\mu\text{m}$. Em média os cabelos crescem a uma taxa média de $15,2 \text{ cm}$ ao ano, com uma troca diária média de 100 fios. (46)

Existem basicamente três tipos de cabelos: cabelo lanugo ou primário, velos ou secundário e, terminal ou terciário. Os cabelos do tipo lanugo ou primário existem somente durante a vida intra-uterina, são extremamente finos, macios, relativamente longos e não pigmentados. Crescem em torno da 20ª semana de gestação e sua queda se dá entre a 32ª e 36ª semana. Posterior a queda do lanugo, crescem em praticamente todo o corpo os cabelos do tipo velos ou secundários, que são extremamente finos, curtos (comprimento menor que 1 cm) e com pouca ou quase nenhuma pigmentação. Por fim, desenvolvem-se os cabelos terminais ou terciários, normalmente mais longos e grossos comparados aos dois primeiros tipos, em todo o couro cabeludo, nas sobrancelhas, cílios, e na puberdade crescem nas axilas, região genital e no rosto dos homens (barba). (7,46)

O ciclo de vida de uma fibra capilar consiste de três estágios: anágeno (estágio de crescimento), catágeno (estágio de transição) e telogênio (estágio de repouso quando ocorre a troca do fio de cabelo), conforme é mostrado na Figura 6. Em um couro cabeludo saudável, aproximadamente 80% a 85% dos cabelos estão na fase anágena, 1% a 2% estão na fase catágena e 10% a 20% estão na fase telogênica. (46)

O estágio anágeno, Figura 6, é caracterizado por intensa atividade metabólica no bulbo capilar. Essa atividade geralmente dura de 4 a 6 anos, produzindo cabelos no couro cabeludo que podem crescer aproximadamente 100 cm de comprimento. (46)

O estágio catágeno, Figura 6, é um estágio de transição e pode durar várias semanas (2 a 4 semanas). Durante a fase catágena, a atividade metabólica diminui e a base do folículo migra para cima da pele em direção à superfície epidérmica. (46)

E por fim, o estágio telógeno ou de repouso, Figura 6, é quando o crescimento do cabelo para e a base do bulbo capilar se aproxima do nível do canal sebáceo. Um novo cabelo começa a crescer sob o folículo telógeno e empurra o folículo velho para cima, que acaba sendo liberado, ocasionando a troca do fio de cabelo em um processo que pode durar de 3 a 4 meses. (46)

Além disso, os cabelos terciários podem ser classificados em três tipos: cabelos lisos, ondulados, cacheados e crespos. (46)

Os cabelos lisos geralmente são mais finos, e em alguns casos por serem tão finos não apresentam medula. Sua estrutura física é formada principalmente por ligações de dissulfeto e ligações de hidrogênio horizontais (46), conforme pode ser observado na Figura 7A.

Os cabelos ondulados, cacheados e crespos apresentam fios mais grossos e um maior número de ligações de dissulfeto e ligações de hidrogênio, não só na posição horizontal, mas

também na posição vertical, o que faz com que fiquem nas suas respectivas formas ondulada, cacheada e crespa, respectivamente. Os Cabelos crespos, Figura 7B, tem um maior número de ligações de dissulfeto e ligações de hidrogênio laterais, seguido dos cabelos cacheados e por fim dos cabelos ondulados. Quando maior o número de ligações de dissulfeto e de ligações de hidrogênio laterais mais o cabelo apresentará uma forma enrolada. (46)

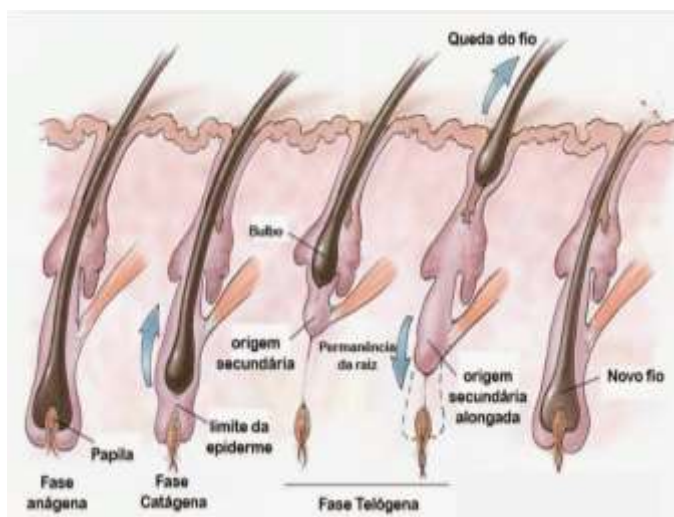


Figura 6. Estágios de crescimento do cabelo humano.

Fonte: Imagem adaptada do site “Cabelos e sonhos” (<https://www.cabelosesonhos.com/2015/03/quais-as-fases-de-crescimento-do-cabelo.html>). Acessado dia 03/01/2020. (49)

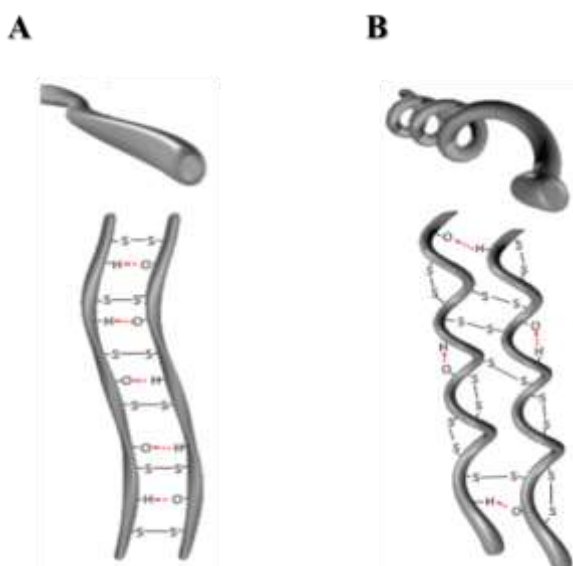


Figura 7. Estrutura física do cabelo liso (A) e do cabelo crespo (B).

Fonte: Imagem adaptada do site “De Química no cabelo” (<https://dequimicanocabelo.blogspot.com/p/blog-page.html>). Acessado dia 03/01/2020. (50)

Porém, não existem somente ligações de dissulfeto e ligações de hidrogênio nos cabelos. Outros tipos de ligações e interações intra e intermoleculares podem estar presentes e, de certa forma, também contribuem na forma física dos cabelos, como por exemplo ligações iônicas e forças de Van der Waals (46), conforme pode ser observado na Figura 8.

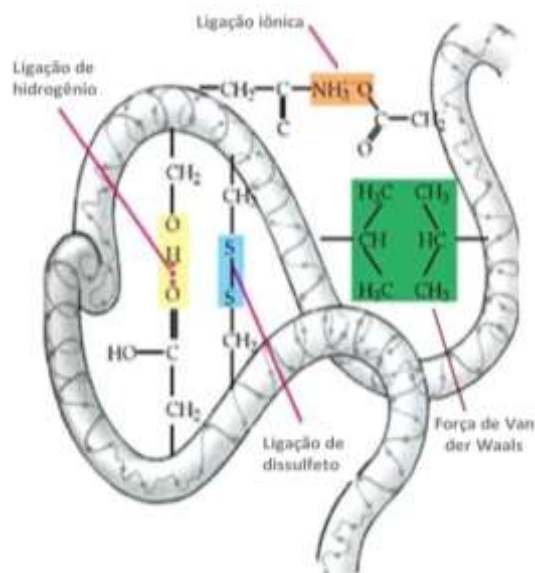


Figura 8. Ligações e interações intra e intermoleculares presentes nos fios de cabelos.

Fonte: Imagem adaptada do site “De Química no cabelo” (<http://dequimicanocabelo.blogspot.com/p/blog-page.html>). Acessado dia 03/01/2020. (50)

2.2. Coloração do cabelo humano

A coloração natural dos cabelos é controlada geneticamente e em geral está associada aos diferentes grupos raciais existentes. (13,46)

A melanina é uma proteína produzida pelos melanócitos, que estão localizados na parte inferior do bulbo capilar, Figura 1, e é responsável por dar pigmentação aos cabelos. Glânulos de melanina, com 1 μm de comprimento e 0,3 μm de diâmetro, são encontrados e estão distribuídos longitudinalmente em todas as células corticais do córtex capilar e na medula. (7,8,13,17,46)

Basicamente, o melanócito produz dois tipos de melaninas: a eumelanina, Figura 9A, que é responsável por dar pigmentação aos cabelos que variam do castanho ao preto, e a feomelanina, Figura 9B, que é responsável por dar pigmentação aos cabelos que variam do loiro ao ruivo. (7,8,13,17,46)

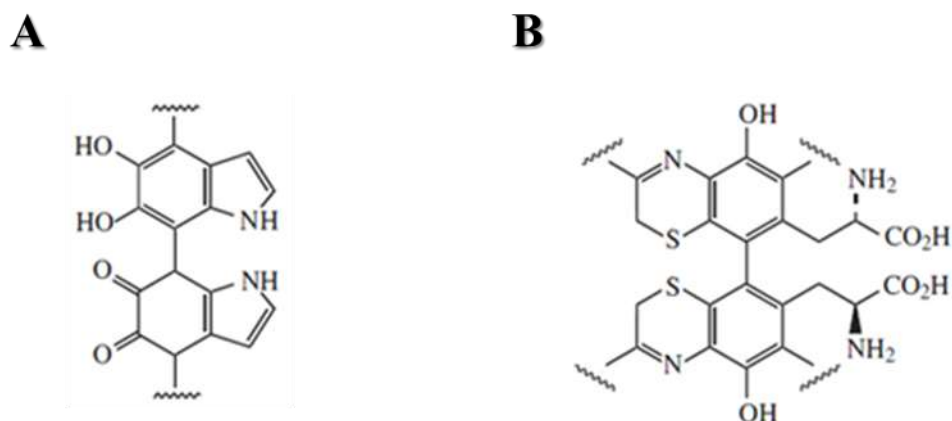


Figura 9. Estruturas moleculares da eumelanina (A) e da feomelanina (B).

Fonte: Imagem adaptada de MOREL, O. J. X.; CHRISTIE, R. M. Current trends in the chemistry of permanent hair dyeing. *Chemical Reviews*, v. 111, p. 2537-2561, 2011. (13)

Nos cabelos contém uma mistura dos dois pigmentos, e quanto maior a quantidade eumelanina mais escuro será o cabelo. Uma ampla gama de cores não decorre apenas das concentrações desses dois pigmentos, mas também o tamanho, a forma dos grânulos, os padrões de distribuição e as estruturas interferem na coloração (8,13). As cores naturais dos cabelos existem em um pequeno segmento de espaço de cores CIELAB (51), correspondendo a comprimentos de onda de absorção que variam de 586 a 606 nm, enquanto a luminosidade varia em uma ampla faixa de 2% a 90%. (13)

Embora os dois tipos de pigmentos tenham características distintas, as rotas biossintéticas estão intimamente relacionadas. Eles são formados a partir de uma série de reações enzimáticas, a partir do aminoácido tirosina (Esquema 1) como material de partida. Após a formação da dopaquinona, Esquema 1, há uma separação das vias biossintéticas, levando a formação dos dois tipos de melanina. (13)

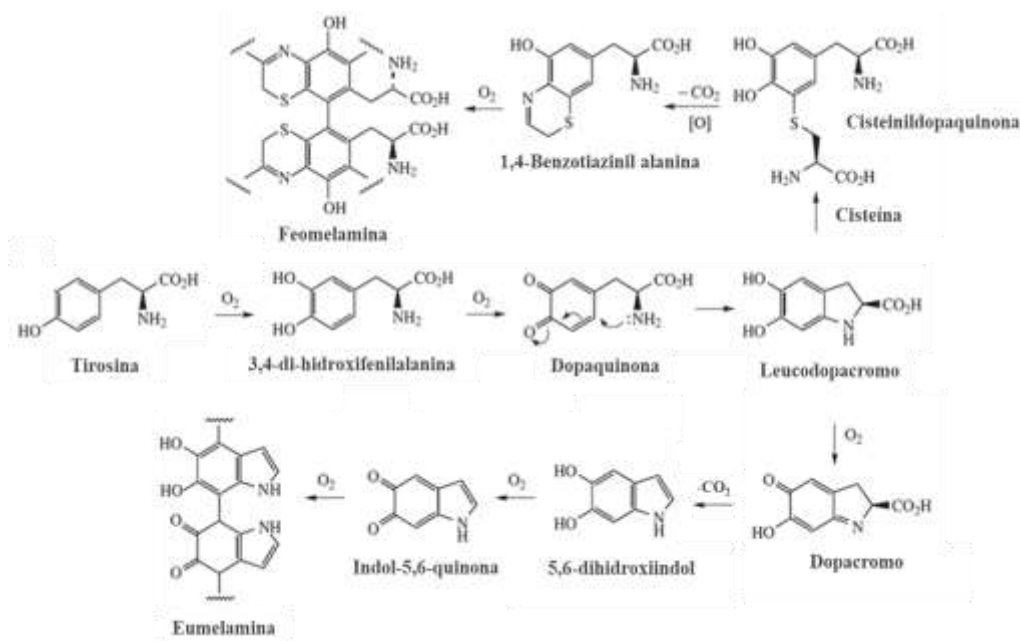
Conforme ilustrado no Esquema 1, a formação da eumelanina é realizada a partir da hidroxilação da tirosina, que é facilitada pela tirosinase. A tirosinase é uma enzima do tipo oxidase que contém quantidades vestigiais de cobre(I). A hidroxilação da tirosina forma o 3,4-dihidroxifenilalanina, que após uma oxidação, pela tirosinase, forma a dopaquinona. Após a formação da dopaquinona, ocorre uma ciclização formando o composto leucodopacromo. A oxidação do leucodopacromo formará o dopacromo, que após uma descarboxilação formará o 5,6-dihidroxiindol. Posteriormente, o 5,6-dihidroxiindol é oxidado e forma o indol-5,6-

quinona, que é um intermediário altamente reativo a partir do qual sucessivas polimerizações oxidativas leva à formação da eumelanina. (13)

A feomelamina também é derivado do leucodopacromo. Resumidamente, o Esquema 1 mostra que o leucodopacromo irá reagir com o aminoácido cisteína, por adição, para formar a cisteinildopaquinona. A cisteinildopaquinona sofre uma descarboxilação seguida de uma oxidação e forma o 1,4-benzotiazinil alanina, que após sucessivas polimerizações oxidativas leva à formação da feomelamina. (13)

Os mecanismos que conduzem as diferentes rotas biossintéticas, em direção à formação da eumelanina ou da feomelamina, são bastante complexos e permanecem ainda desconhecidos. Intermediários como a cisteinildopaquinona e seus metabólitos são encontrados no cabelo tanto de indivíduos eumelânicos, quanto em indivíduos feomelânicos, o que evidencia que o organismo tem a capacidade de produzir os dois tipos de melanina, sugerindo uma interação entre os dois caminhos. (13)

Embora a produção da melanina dos cabelos apresente alta complexidade de produção, o organismo necessita de somente duas espécies de melanina para produzir uma grande variedade de tons e cores aos cabelos, enquanto que para realizar o tingimento dos cabelos com corantes sintéticos, precisa-se de uma infinidade de compostos e corantes para se produzir uma variedade limitada de tons e cores, conforme veremos adiante. (13)



Esquema 1. Mecanismo de biossíntese da eumelanina e da feomelanina.

Fonte: Esquema adaptado de MOREL, O. J. X.; CHRISTIE, R. M. Current trends in the chemistry of permanent hair dyeing. Chemical Reviews, v. 111, p. 2537-2561, 2011. (13)

2.3. Composição química do cabelo humano

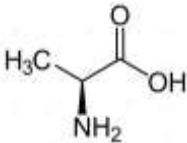
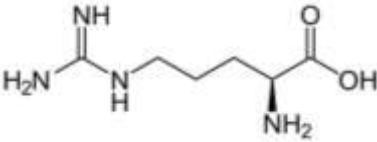
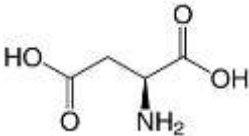
O cabelo humano é uma estrutura bastante complexa, formada por inúmeros componentes morfológicos que integram um sistema onde vários compostos agem simultaneamente. (7,13,46)

A estrutura formadora dos cabelos é composta por diferentes elementos químicos, dentre eles estão: carbono (45%), oxigênio (28%), nitrogênio (15%), hidrogênio (7%) e enxofre (5%). (46)

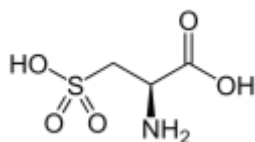
Basicamente, o cabelo humano é composto, dependendo do teor de umidade, em aproximadamente 65% a 95% de proteínas, 6% a 12% de água, 3% de lípidios estruturais e livres (colesterol, ácidos graxos, lípidos polares e ceramidas), pigmentos e oligoelementos (geralmente não livres, mas em combinação com cadeias laterais de proteínas ou com grupos de ácidos graxos ou lipídios). (7,8,46)

Por definição, as proteínas são estruturas poliméricas ou macromoléculas biológicas formadas por condensação de diferentes tipos de aminoácidos (46). O cabelo humano é formado basicamente por 21 tipos de aminoácidos (46). Os aminoácidos encontrados no cabelo humano natural, juntamente com suas estruturas e respectivas quantidades são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Aminoácidos encontrados no cabelo humano natural.

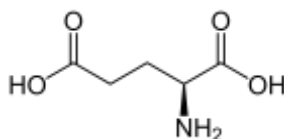
Aminoácido	Estrutura	Quantidade ($\mu\text{mol g}^{-1}$)
Alanina		314,0 – 384,0
Arginina		499,0 – 620,0
Ácido Aspártico		292,0 – 578,0

Ácido Cisteico



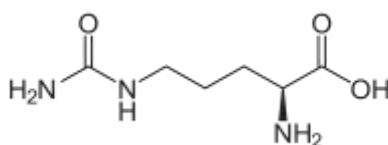
22,0 – 40,0

Ácido Glutâmico



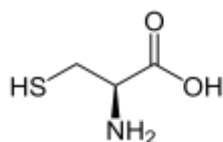
930,0 – 1036,0

Citrulina



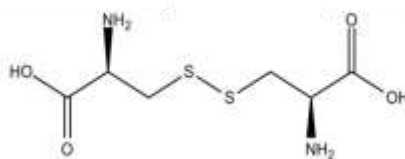
11,0

Cisteína



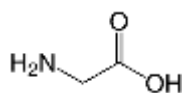
17,0 – 70,0

Cistina



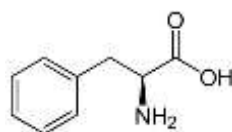
1380,0 – 1512,0

Glicina



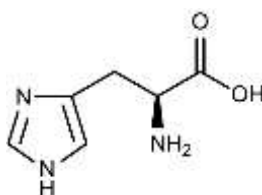
463,0 – 560,0

Fenilalanina



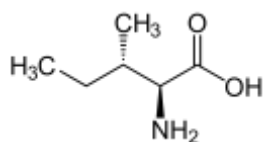
132,0 – 226,0

Histidina



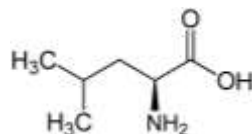
40,0 – 86,0

Isoleucina



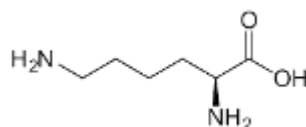
244,0 – 366,0

Leucina



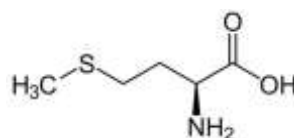
489,0 – 529,0

Lisina



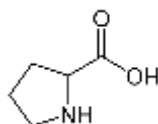
130,0 – 222,0

Metionina



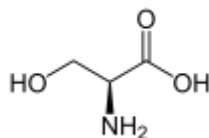
47,0 – 67,0

Prolina



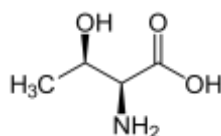
374,0 – 708,0

Serina



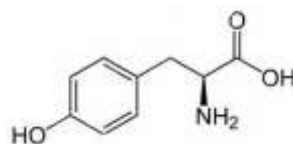
705,0 – 1091,0

Treonina



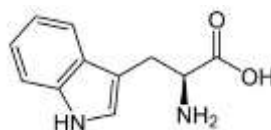
588,0 – 714,0

Tirosina



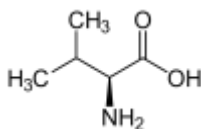
121,0 – 195,0

Tryptofano



20,0 – 64,0

Valina



470,0 – 513,0

Fonte: Tabela adaptada do livro *Chemical and physical behavior of human hair*, 2nd ed., Chap. 2, p. 39-68. (46)

As quantidades desses aminoácidos encontrados nos cabelos humanos podem sofrer variações, conforme pode ser observado na Tabela 1. Vários fatores podem alterar significativamente a quantidade desses compostos nos cabelos, dentre eles podemos destacar: o tipo de cabelo, sexo, idade, raça, genética e alimentação do indivíduo, além de patologias relacionadas aos cabelos, intemperismo (oxigênio atmosférico e radiação solar), coloração dos cabelos, e a modificação química dos cabelos com cosméticos (alisamento e tingimento). (46)

As quantidades dos aminoácidos presentes em toda a fibra capilar variam em cada parte dos cabelos. A cutícula, por exemplo, contém maiores quantidades de cistina, ácido cisteico, prolina, serina, treonina, isoleucina, metionina, leucina, tirosina, fenilalanina e arginina, e menores quantidades de triptofano e histidina em comparação ao restante da fibra capilar. Em geral, esses resultados mostram que as células cuticulares contêm uma porcentagem maior dos aminoácidos, que geralmente não são encontrados em polipeptídeos α -helicoidais no restante da fibra. Em compensação, pequenas quantidades de citrulina (aproximadamente $11,0 \mu\text{mol g}^{-1}$) são encontradas na fibra capilar inteira, enquanto que na cutícula é encontrada uma quantidade um pouco maior (cerca de $45,0 \mu\text{mol g}^{-1}$). (46)

O córtex compreende a maior parte da massa da fibra capilar. Portanto a quantidade de aminoácidos encontrados no córtex capilar é bastante próxima à quantidade encontrada em toda a fibra capilar. O córtex médio é bastante rico em cistina (embora exista menos cistina no córtex que na cutícula), aminoácidos diácidos, lisina e histidina em comparação a cutícula. (46)

Os dois principais componentes do córtex, as microfibrilas e a matriz, são muito diferentes em relação à composição química. As microfibrilas são ricas em leucina, ácido glutâmico e aminoácidos ácidos, que geralmente são encontrados em proteínas α -helicoidais. No entanto, pequenas quantidades de cistina, lisina e tirosina também são encontradas nas microfibrilas. Por outro lado, a matriz é rica em cistina, prolina e em aminoácidos ácidos. (46)

A queratina é a principal proteína que compõem os cabelos, a pele e as unhas. No cabelo humano, a queratina representa cerca de 70 a 85% do total de proteínas da fibra capilar, e apresenta um alto teor de enxofre, devido a presença de resíduos de cistina,

explicando o fato das microfibrilas presentes na matriz serem altamente ricas em cistina. (7,8,13,46,52)

A cistina é um aminoácido formado por duas moléculas de cisteína ligadas por uma ligação de dissulfeto. No entanto, nem todos os aminoácidos presentes na queratina são responsáveis pela formação de toda a cistina presente na matriz dos cabelos, onde somente cerca 10% dos resíduos de aminoácidos presentes na queratina são responsáveis pelas ligações de dissulfeto da cistina, e são essas ligações que conferem estabilidade química e física à queratina. (7,13,46,52)

Como qualquer outra proteína existente no organismo, a queratina também é um polímero formado por cadeias peptídicas oriundas da condensação, de quantidades um pouco menores, de praticamente todos os 20 aminoácidos que compõem a fibra capilar (7,13,46,52,53) (Tabela 1). A Tabela 2 mostra a composição (em porcentagem) dos aminoácidos que compõem a queratina do cabelo humano.

Tabela 2. Aminoácidos encontrados na queratina do cabelo humano natural.

Aminoácido	Composição (%)
Ácido Aspartico	3,9
Ácido Glutâmico	13,6
Alanina	2,8
Arginina	8,9
Cistina	18,0
Fenilalanina	2,4
Glicina	4,1
Histidina	1,2
Isoleucina	4,8
Leucina	6,4
Lisina	1,9
Melanina	1,6

Metionina	0,7
Prolina	4,3
Serina	10,6
Tirosina	8,5
Treonina	8,5
Triptofano	1,0
Valina	5,5

Fonte: Tabela adaptada de LANG, J. M.; LUCAS, C. C. The analysis of hair keratin: 1. Application of microbiological techniques to hydrolysates of human hair. *Biochemical Journal*, v. 52, n. 1, p. 84-87, 1952. (52)

Diante de todos os aminoácidos que compõem a estrutura da queratina (Tabela 2), apenas cinco tipos de aminoácidos são eletroativos (53-55): cisteína (56,57), tirosina (58-61), histidina (59,62), triptofano (59,60,63) e metionina (56,57).

No cabelo humano, existem dois tipos de queratina: a alfa-queratina (α -queratina) que tem aparece em maior quantidade e tem a forma de α -hélice, e a beta-queratina (β -queratina) que se apresenta na forma de folhas β -pregueadas (7). As estruturas da α -queratina e da β -queratina são mostradas na Figura 10.

A nível molecular, as fibras de α -queratina, Figura 10A, não são somente uma rede de cadeias polipeptídicas formadas exclusivamente por ligações de dissulfeto, mas também formadas por ligações de hidrogênio e interações de Van der Waals intra e intercadeias. No entanto, existem ainda interações coulombicas entre cadeias laterais básicas com os resíduos de aminoácidos de lisina, arginina e histidina, e ácidas com resíduos de aminoácidos do ácido aspártico e glutâmico. (7,46)

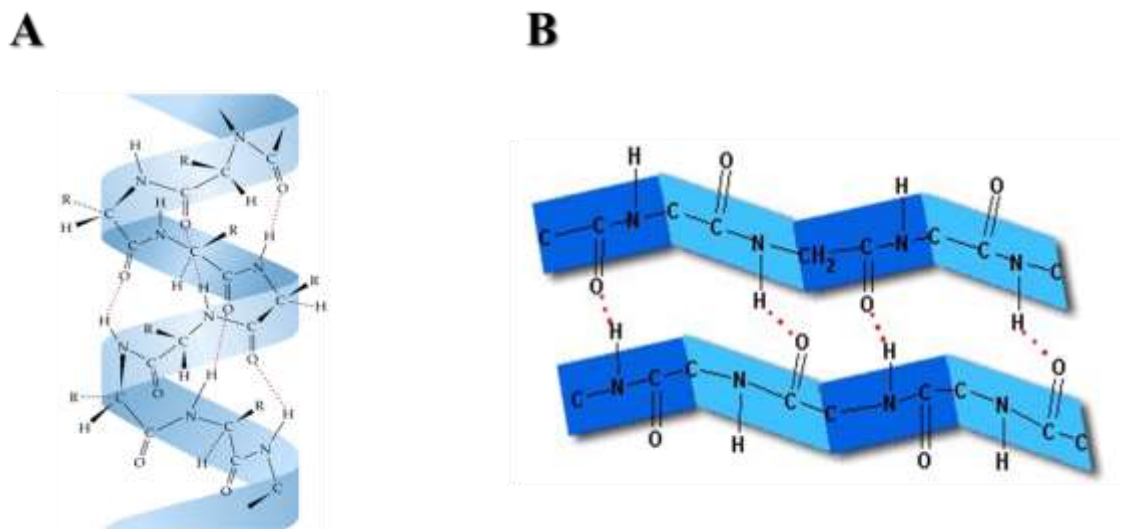


Figura 10. Estruturas moleculares da α -queratina (A) e da β -queratina (B).

Fonte: Imagens adaptadas do site “FCiências” (<https://www.fciencias.com/2014/07/31/queratina-molecula-da-semana/>). Acessado dia 03/01/2020. (64)

Todavia, as fibras da β -queratina são uma rede de cadeias polipeptídicas formadas quase que exclusivamente por ligações de hidrogênio (7,46), conforme pode ser observado na Figura 10B.

As fibras da queratina são formadas basicamente por regiões altamente organizadas (cristalinas) e outras pouco organizadas (amorfas). A região amorfa possui um alto teor de enxofre e conseqüentemente um maior número de ligações de dissulfeto e, é caracterizada pela liberdade de movimentos dos componentes moleculares que compõem a fibra da queratina, fazendo com que essa região tenha mais mobilidade e conseqüentemente menos ordenada, o que facilita a absorção de água e outras substâncias de tamanho molecular pequeno. A região cristalina, ao contrário da região amorfa, contém baixo teor de enxofre, é mais organizada e não permite uma liberdade tão alta de movimentos dos componentes moleculares. (7,46)

Outra característica importante da queratina é sua grande capacidade de absorver água. A forma com que a queratina absorve as moléculas de água ainda é pouco conhecida, no entanto, acredita-se que as moléculas de água são primeiramente ligadas pelos resíduos, principalmente ácidos, dos aminoácidos presentes na cadeia lateral da queratina. A essa camada de água ligada aos resíduos dos aminoácidos da cadeia lateral da queratina, liga-se a uma segunda camada de moléculas de por ligações de hidrogênio. Da mesma maneira, forma-

se a terceira e as demais camadas assim por diante, até que as moléculas de água estejam tão afastadas, da cadeia peptídica lateral da molécula de queratina, que possam ser consideradas como água livre. (7,46)

Em relação à medula, uma análise química completa ainda não foi relatada. Estudos da medula do cabelo humano são muito complicados, em detrimento da baixa solubilidade e da dificuldade em isolar esta parte da fibra capilar, uma vez que a medula está localizada no núcleo da fibra e está protegida pela cutícula e pelo córtex, que apresentam uma lenta taxa de difusão. No entanto, experimentos realizados com fibra de lã mostraram que a medula apresenta um baixo teor de cistina e grandes quantidades de aminoácidos ácidos e básicos em relação ao restante da fibra. (46)

Semelhante à medula, não há dados publicados em relação a composição química da epicutícula. Porém, em análises realizadas em fibra de lã, mostraram que a epicutícula é bastante rica em aminoácidos dicarboxílicos, ácido aspártico e ácido glutâmico. (46)

O complexo de membrana celular humano apresenta uma composição de 20% a 30% de ácidos graxos e 60% a 70% de proteína, sendo muito rico em lisina e com baixo teor de cistina (cerca de 2%). Acredita-se que o complexo da membrana celular seja do tipo lipídico e contenha quantidades significativas de colesterol livre, ácidos graxos livres e triglicerídeos. (46)

De acordo com a Tabela 1, é possível observar altas quantidades relativas de hidrocarbonetos, hidroxilas, amidas primárias, funções básicas de aminoácidos e de dissulfetos. Possivelmente, a alta quantidade de aminoácidos contendo hidrocarbonetos evidencia que as interações hidrofóbicas terão um papel importante na reatividade dos cabelos com produtos e ingredientes cosméticos, como por exemplo, os corantes de cabelos. (7,46)

Quantidades de lipídios aparecem tanto na parte externa (superfície), quanto na parte interna dos cabelos. Os lipídios internos são em parte lipídios livres e lipídios que compõem a estrutura do complexo de membrana celular. Os lipídios dos cabelos são semelhantes em composição aos lipídios encontrados no couro cabeludo, assim o couro cabeludo serve como um sistema de fornecimento lipídico contínuo para os cabelos, sendo produzidos e controlados hormonalmente por secreções andrógenas oriundas das glândulas sebáceas. (7,13,46)

A composição lipídica presente nos cabelos é derivada do sebo e consiste principalmente de ácidos graxos livres e gorduras neutras (ésteres, ceras, hidrocarbonetos e álcoois). Exames realizados em cabelos de homens adultos foram encontrados 56,1% dos

lipídios na forma de ácidos graxos livres e 41,6% como gorduras neutras. Além disso, ácidos graxos saturados e insaturados com cadeia composta de 5 a 22 átomos de carbono foram encontrados na gordura capilar humana. Todavia, fatores como sexo, raça, idade, tipo de cabelo e utilização de produtos cosméticos podem interferir na quantidade e no tipo de lipídios encontrados nos cabelos. (46)

Os cabelos oleosos diferem dos cabelos secos em relação a composição lipídica. Em indivíduos de cabelos secos, é predominantemente encontrado em sua composição lipídica o ácido octadecenóico (ácido oleico), enquanto que em indivíduos de cabelos oleosos o ácido 8-octadecenóico foi predominante. No entanto, a principal diferença entre os cabelos oleosos e os cabelos secos está nas características reológicas dos lipídios presentes no sebo. Por exemplo, indivíduos de cabelos lisos provavelmente tem uma maior proporção de ácidos graxos insaturados em relação aos saturados nos cabelos, isso faz com que o ponto de fusão do sebo fique menor, tornando-o mais fluido ou mais oleoso em relação aos indivíduos que possuem cabelos secos. (46)

Nos cabelos, o conteúdo mineral é geralmente muito baixo, menor que 1%. Independentemente da origem ou do tipo de cabelo, o principal conteúdo metálico dos cabelos provavelmente existe como parte integrante da estrutura da fibra, na forma de sais ou de complexos de coordenação nas cadeias laterais das proteínas ou dos pigmentos. (46)

O teor total de cinzas do cabelo humano é também relativamente baixo e varia entre 0,55% a 0,94%. Grande parte dos oligoelementos encontrados no cabelo humano veem principalmente do suor liberado pelos poros presentes no couro cabeludo, e os principais oligoelementos encontrados são: cálcio, magnésio, estrôncio, boro, alumínio, sódio, potássio, zinco, cobre, manganês, ferro, prata, ouro, mercúrio, cromo, chumbo, antimônio, titânio, tungstênio, vanádio, molibidênio, iodo, fósforo e selênio. Porém, a dieta, poluição do ar, irregularidades metabólicas e utilização de produtos cosméticos, como por exemplo shampoo, sabão e corante de cabelos podem interferir na composição e na quantidade desses oligoelementos. (46)

Características como a coloração dos cabelos podem interferir na composição mineral dos cabelos. Cabelos ruivos, por exemplo, apresentam um teor de ferro maior em comparação com cabelos de outras cores. (13,46)

Nos últimos anos, a análise de compostos nos cabelos veem se tornando uma ferramenta muito importante e poderosa em diagnósticos de intoxicação (por exemplo metais

pesados) e indicativos de algumas doenças como diabetes, Kwashiorkor, fibrose cística, fenilcetonúria e dislexia pela deficiência e excesso de alguns minerais. (46)

2.4. Tinturas de cabelos

O ser humano ao longo de sua existência sempre destinou parte de seus cuidados pessoais aos cabelos, o que pode ser comprovado pela grande quantidade de produtos cosméticos e farmacêuticos desenvolvidos. Diante desta vasta variedade de produtos disponíveis, destacam-se os corantes capilares que tem como objetivos devolver e/ou alterar a pigmentação natural dos cabelos. (4,7,43-45,66,67)

A mudança de coloração dos cabelos é um dos adornos mais antigos da história humana, com uma trajetória longínqua com diversas comprovações científico-históricas (8). No Egito foram encontradas múmias, de aproximadamente 4000 mil anos de idade, que tinham os cabelos tingidos com henna. No império romano, os homens utilizavam pentes embebidos em uma solução de sulfeto de chumbo e vinagre. Esta reação ocasionava a formação de acetato de chumbo, que era utilizado com o objetivo de escurecer gradualmente os cabelos grisalhos com uma coloração marrom escura. Outro método também utilizado pelos homens, no escurecimento dos cabelos grisalhos, era expor os cabelos à fumaça sulfurosa. Nesta mesma época, as mulheres utilizavam a lixívia (soda cáustica) para descolorir os cabelos. (8,11,37)

Outras evidências históricas retratam ainda o uso de diversos extratos de plantas no tingimento dos cabelos. A noqueira, por exemplo, era bastante usada para tingir os cabelos com a cor marrom. A camomila era utilizada para o tingimento com a cor amarela, e a henna combinada com índigo para o tingimento com a coloração preto escuro. (8,11,37)

O tingimento oxidativo dos cabelos tem sido praticado por mais de 150 anos e, evoluiu a partir da observação das propriedades da PFD pelo químico Dr. August Wilhelm Von Hofmann em 1863. A PFD é um composto incolor, que quando exposto a um ambiente oxidativo, por exemplo oxigênio atmosférico ou pelo uso de agente oxidante, produz um produto de coloração marrom aos cabelos (8,11,14,37). Mas, somente em 1883, com Monnet, surgiu a primeira patente relacionada à oxidação e o tingimento de cabelos humanos, utilizando novamente da PFD e da PTD como precursores de corantes capilares. Assim, com o conhecimento cada vez maior de sua potencialidade, a PFD passou a ser muito utilizada e fazer parte da composição de praticamente todos os produtos atuais destinados a coloração dos cabelos. (8,11,14-16,37)

Entre 1888 e 1897, os irmãos e químicos Hugo e Ernst Erdmann aumentaram ainda mais a gama de compostos que poderiam ser utilizados na coloração dos cabelos, dentre esses compostos podemos destacar o PAF e seus derivados, N-alkil e N-fenil-*p*-fenilenodiaminas, 4,4'-diaminodifenilamina e 1,5-diamino e 1,5-dihidroxinaftaleno. Suas patentes também são notáveis em relação as vantagens do uso de peróxido de hidrogênio como agente oxidante no processo de tingimento. (16,17)

No entanto, as tinturas de cabelos sintéticas só ganharam aceitação após a invenção da primeira marca comercial de corante de cabelo sintético, denominada Aureole[®], em 1909 por Eugène Schueller, químico e fundador da empresa L'Oreal[®]. Seguindo o mesmo caminho, o químico e fundador da empresa Clairol[®], revolucionou o mercado de corantes capilares, criando em 1931 um shampoo chamado Clairol[®], que tonalizava instantaneamente os cabelos e que foi utilizado por milhões de mulheres em todo o mundo. Shampoo, que mais tarde, em torno de 1950, passou por um processo de reformulação de sua composição e tornou o processo de tingimento dos cabelos mais eficiente e sem a necessidade do uso de agentes oxidantes. (8,18,19)

As tinturas de cabelos são classificadas de acordo com a origem em tinturas vegetais, minerais e sintéticas. (2,8-10,66)

As tinturas vegetais são obtidas ou extraídas de plantas ou de parte delas (ex. henna, camomila e cinchona). Essas tinturas, na sua grande maioria, não são tóxicas e tem um curto período de duração. (2,8-10)

As tinturas minerais ou corantes metálicos são obtidas de alguns minerais ou sais metálicos (ex. nitrato de prata ou sais de chumbo). No entanto, o procedimento de tingimento dos cabelos, com esses tipos de corantes, exige o uso diário e contínuo desses minerais e tem duração de somente algumas semanas ou até meses. Por serem compostas principalmente de sais de metais pesados, essas tinturas são potencialmente tóxicas e são incompatíveis com peróxido de hidrogênio. (2,8-10)

As tinturas capilares sintéticas, como o próprio nome nos diz, são obtidas artificialmente e são classificadas de acordo com a resistência à lavagem e pelo grau de permanência nos cabelos em corantes temporários, semi-permanentes e permanentes. (2,8,11-13,21,44,66)

As tinturas temporárias são bastante utilizadas pela indústria no tingimento de lã, seda, algodão, papel e alimentos. Por apresentarem baixa toxicidade aos seres humanos, algumas dessas tinturas são utilizadas também como corantes capilares. Os corantes temporários são

bastante utilizados pelas mulheres, principalmente com o objetivo de esconder cabelos grisalhos ou para obtenção de cores mais vibrantes aos cabelos. São comercializados na forma de shampoos, condicionadores, loções e géis com diferentes tonalidades de cor. (9,10,68)

Os corantes do tipo temporários são corantes básicos ou ácidos, de alto peso molecular, e altamente solúveis em água. Esse tipo de tintura capilar não necessita da abertura da cutícula, portanto o corante acaba não penetrando e não se difundindo para dentro da estrutura da fibra capilar (cortéx), e por isso não requer o uso de amônia e nem de agentes oxidantes, diferentemente dos corantes do tipo semi-permanente e permanente. Os corantes temporários ficam depositados na parte externa do fio de cabelo, mais precisamente na cutícula, por ligações iônicas ou forças e/ou interações intermoleculares fracas temporárias com os grupos terminais dos resíduos de aminoácidos presentes na fibra capilar, conforme é mostrado na Figura 11. Por esse motivo, sua coloração se mantém nos cabelos por alguns dias e é facilmente removida com uma simples lavagem dos cabelos. (9,10,68)

A Tabela 3 mostra a estrutura química de alguns corantes temporários ácidos e básicos utilizados no tingimento dos cabelos.

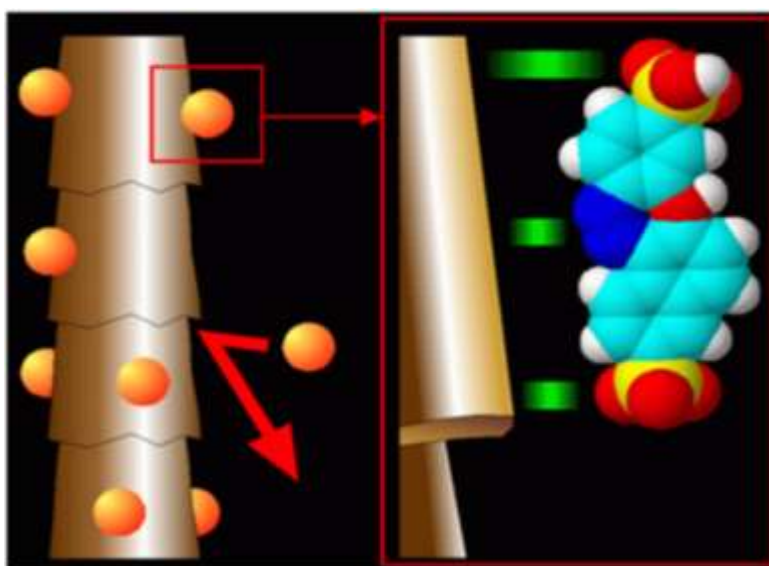


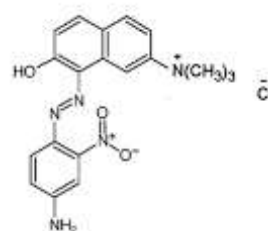
Figura 11. Fixação dos corantes capilares temporários na fibra capilar.

Fonte: Imagem adaptada do site “A química da beleza” (<https://www.quimicadabeleza.com/a-arte-de-colorir-os-cabelos/>). Acessado dia 22/01/2020. (69)

Tabela 3. Corantes temporários ácidos e básicos utilizados no tingimento dos cabelos.

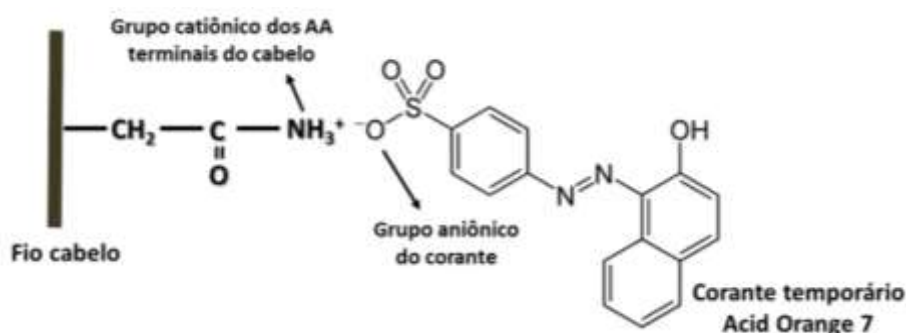
Nome do corante	Estrutura química
Acid Yellow 1	
Acid Yellow 3	
Acid Orange 7	
Acid Orange 87	
Acid Red 33	
Basic Blue 99	
Basic Brown 16	

Basic Brown 17



Fonte: Tabela adaptada de OLIVEIRA, R. A. G.; ZANONI, T. B.; OLIVEIRA, D. P.; UMBUZEIRO, G. A.; ZANONI, M. V. B. A química e toxicidade dos corantes de cabelo. Química Nova, v. 37, n. 6, p. 1037-1046, 2014. (8)

Os corantes ácidos, Tabela 3, são corantes aniônicos e sua fixação na fibra capilar é feita por ligações iônicas entre os grupos aniônicos presentes em sua estrutura e os grupos catiônicos dos resíduos de aminoácidos presentes na cutícula da fibra capilar (9,70). Como exemplo, o Esquema 2 ilustra a fixação do corante temporário ácido Acid Orange 7 na fibra do fio de cabelo.



Esquema 2. Mecanismo de fixação do corante temporário Acid Orange 7 na fibra do fio de cabelo.

Fonte: Autor.

Os corantes básicos (Tabela 3) são corantes catiônicos e se ligam às fibras do fio de cabelo por interações eletrostáticas dos grupos catiônicos presentes em sua estrutura e os grupos aniônicos dos resíduos de aminoácidos presentes na cutícula da fibra capilar (9,70). O Esquema 3 ilustra a fixação do corante temporário básico Basic Red 76, como exemplo do mecanismo de fixação dos corantes básicos na fibra do fio de cabelo.



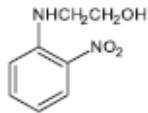
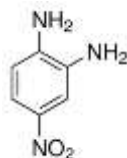
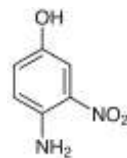
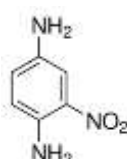
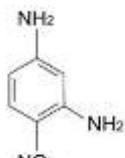
Esquema 3. Mecanismo de fixação do corante temporário Basic Red 76 na fibra do fio de cabelo.

Fonte: Autor.

Os corantes do tipo semipermanentes ou tonalizantes são os mais populares entre as mulheres, pois esse tipo de corante proporciona uma mudança rápida na tonalidade dos cabelos sem interferir drasticamente na alteração da cor. Como não há a presença de peróxido de hidrogênio em sua formulação, não é possível realizar o clareamento dos cabelos, mas é possível escurecer mais de três tons a cor natural dos cabelos. Responsáveis por uma parcela de 10% do mercado de corantes em todo o mundo, os corantes semipermanentes também são encontrados na forma de shampoos, loções e sprays com diferentes cores e tonalidades. (9,24,71)

Os corantes semipermanentes são corantes derivados de nitro compostos (principalmente nitrobenzeno), geralmente são caracterizados por nitroanilinas, nitrofenilenodiaminas e nitroaminofenóis (9,24). As tinturas semipermanentes, em sua grande maioria, possuem peso molecular baixo, e contém diferentes grupos auxocrômicos, que acentuam a coloração do grupo nitro (grupo cromóforo) presente na estrutura química do corante (9,24). Para a obtenção da coloração desejada, em algumas formulações são misturados de 10 a 12 corantes diferentes (9,71). No entanto, é possível encontrar em algumas formulações de corantes semipermanentes alguns corantes temporários ácidos e básicos que contêm grupamentos -COOH ou $\text{-SO}_3\text{H}$ em sua estrutura, como por exemplo o Acid Orange 7, Acid Violet 43, Basic Red 22 e o Basic Blue 47 (9,24,68). A Tabela 4 mostra a estrutura química de alguns compostos utilizados como corantes semipermanentes no tingimento dos cabelos.

Tabela 4. Compostos utilizados como corantes semipermanentes no tingimento dos cabelos.

Composto	Estrutura química
N-(2-hidroxietil)- <i>o</i> -nitroanilina	
4-nitro- <i>o</i> -fenilenodiamina	
4-amino-3-nitrofenol	
2-nitro- <i>p</i> -fenilenodiamina	
4-nitro- <i>m</i> -fenilenodiamina	

Fonte: Tabela adaptada de OLIVEIRA, R. A. G.; ZANONI, T. B.; OLIVEIRA, D. P.; UMBUZEIRO, G. A.; ZANONI, M. V. B. A química e toxicidade dos corantes de cabelo. Química Nova, v. 37, n. 6, p. 1037-1046, 2014. (8)

Aplicados sobre os cabelos, os corantes semipermanentes penetram superficialmente no córtex capilar e ficam fixados por interações polares fracas e interações de Van der Waals, conforme é mostrado na Figura 12. Isso faz com que a coloração permaneça por dias ou até semanas, dependendo da frequência em que os cabelos são lavados. Em média, os corantes semipermanentes suportam de 6 a 12 lavagens. (9,71)

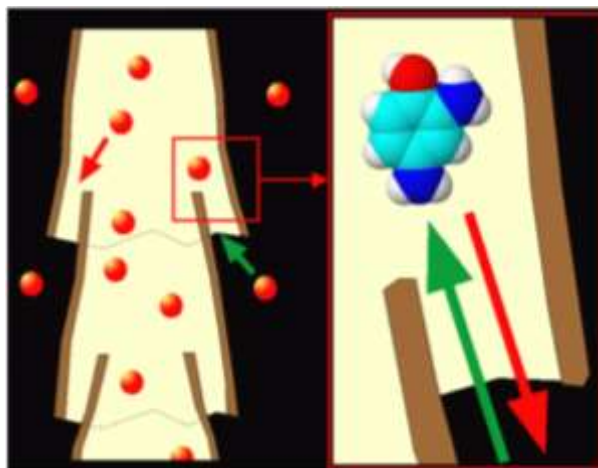


Figura 12. Fixação dos corantes capilares semipermanentes no interior da fibra capilar.

Fonte: Imagem adaptada do site “A química da beleza” (<https://www.quimicadabeleza.com/a-arte-de-colorir-os-cabelos/>). Acessado dia 22/01/2020. (69)

As tinturas de cabelos do tipo permanentes são as mais utilizadas em todo o mundo, representando cerca de 70 a 80% do mercado mundial de corantes. Isso é devido a sua versatilidade, facilidade de aplicação, maior durabilidade e maior opção de cores. (12,13,43,44,66)

O processo de tingimento dos cabelos com corantes permanentes é bastante complexo e envolve múltiplos componentes com diferentes funções. Em um tingimento rotineiro, o processo é norteado por complexas reações oxidativas entre duas substâncias misturadas em um meio alcalino e oxidante. Uma dessas substâncias é o intermediário primário ou precursor, que consiste de aminas aromáticas *orto* e *para*-substituídas com grupos amino e/ou hidroxilas, tais como a PFD, PTD, PAF e seus derivados. No entanto, a quantidade desses precursores nas tinturas de cabelos variam de acordo com a cor pretendida, entre 0,05% para tons mais claros e 1,5% para tons mais escuros. (2,9,11-13,21,25-27,43,44,66,72)

O agente acoplador ou modificador é outro componente utilizado na mistura, e dentre esses compostos destacamos muitos derivados aromáticos *meta*-substituídos, tal como *m*-fenilenodiaminas, *m*-aminofenóis, RSN, naftol e outros. Portanto, os acopladores são substâncias doadoras de elétrons e tem a função de determinar a cor final da tintura, por meio de reação com a forma oxidada dos precursores, em uma proporção molar aproximada de (1:1), seguido por outras reações de acoplamento oxidativo. (2,9,11-13,21,25-27,43,44,66,72)

Por fim, outra substância utilizada é o agente oxidante em meio alcalino. Preponderantemente é preferido o uso do peróxido de hidrogênio, porém podem ser utilizados em menor escala o peróxido de uréia, percarbonato de sódio ou perborato de sódio na

presença de amônia. O agente oxidante em meio alcalino tem a função de oxidar o agente precursor e os demais produtos intermediários formados na mistura, com a intenção de adquirir uma coloração específica desejada. Além disso, a presença do agente oxidante na composição das tinturas capilares permanentes tem ainda a função de clarear a melanina do fio de cabelo, fazendo com que os corantes permanentes sejam a única classe de tintura capilar que permite clarear os cabelos. (2,9,11-13,21,25-27,43,44,66,72)

A amônia é o agente alcalinizante mais utilizado, por ser um efetivo branqueador da pigmentação natural dos cabelos, por otimizar a velocidade de oxidação dos precursores, além de promover a tumefação e a abertura das cutículas, facilitando a absorção dos corantes e do peróxido de hidrogênio. Entretanto, outros agentes alcalinizantes são utilizados em diferentes formulações, como por exemplo a monoetanolamina e o aminometilpropanol. (2,9,11-13,21,25-27,43,44,66,72)

Diante desses componentes, o processo de tintura permanente ocorre com a mistura do precursor e do agente acoplador, em meio alcalino (pH entre 8 e 10), na presença de peróxido de hidrogênio. Essa mistura irá formar um creme, que é aplicado diretamente nos cabelos, fazendo com que os precursores e acopladores juntamente com o peróxido de hidrogênio sejam difundidos para o interior da fibra do fio de cabelo, onde após um período aproximado de 40 minutos, reações químicas específicas formam um composto colorido, de alta massa molar, que será absorvido pelo córtex capilar (2,9,11-13,21,25-27,43,44,66,72), conforme ilustrado na Figura 13. Um exemplo dessa reação, entre o precursor PFD e o acoplador RSN, em meio alcalino oxidativo pode observado no Esquema 4.

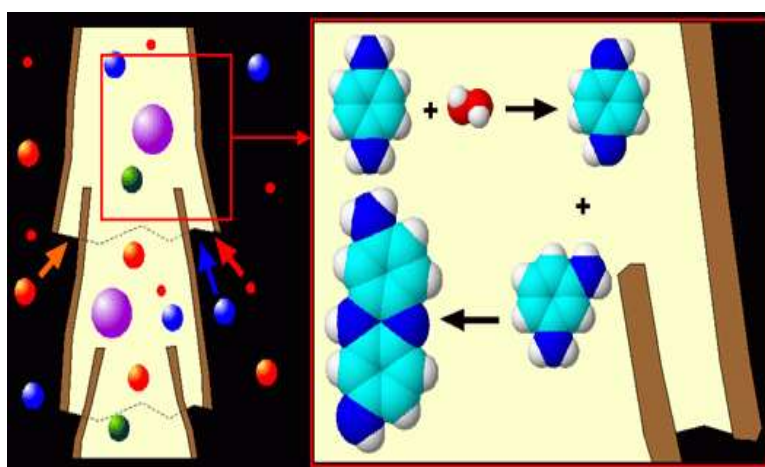


Figura 13. Fixação dos corantes capilares permanentes no interior da fibra capilar.

Fonte: Imagem adaptada do site “A química da beleza” (<https://www.quimicadabeleza.com/a-arte-de-colorir-os-cabelos/>). Acessado dia 22/01/2020. (69)

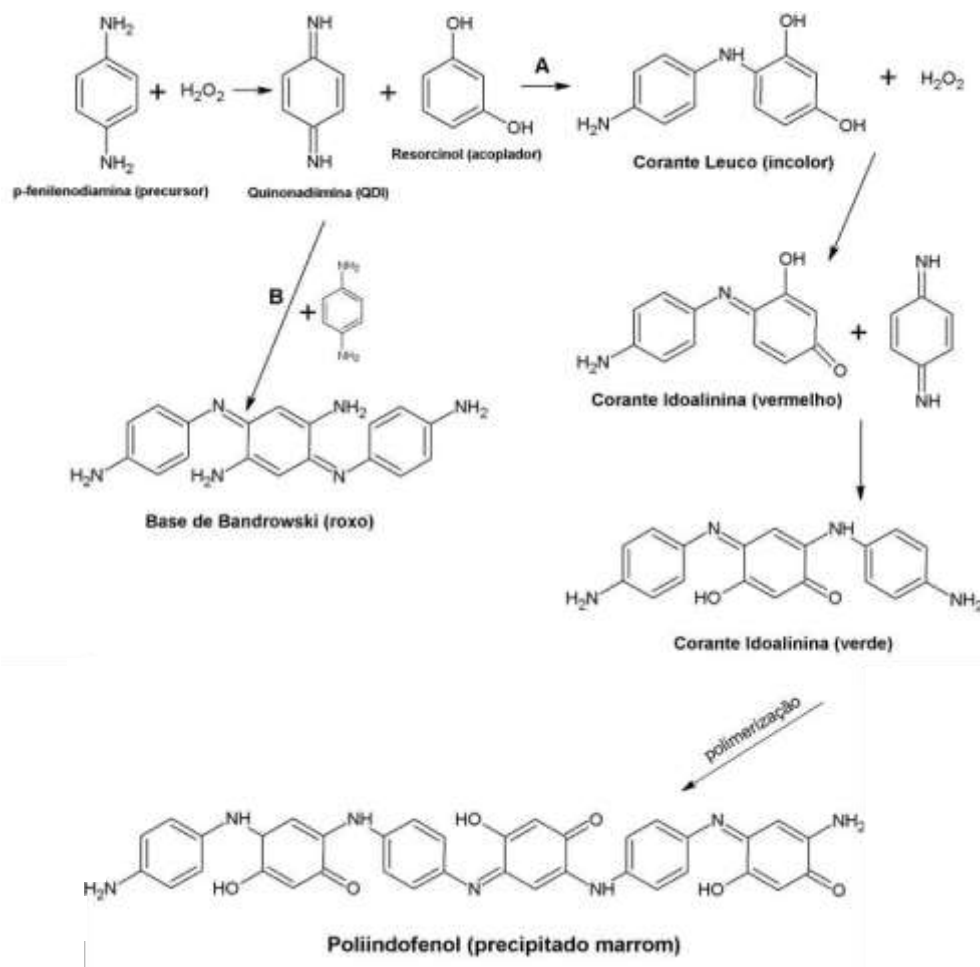
Um exemplo da reação de formação dos corantes permanentes, pelo precursor PFD e acoplador RSN, em meio alcalino oxidativo pode observado no Esquema 4. O Esquema 4 ilustra a reação entre o precursor PFD, oxidado por peróxido de hidrogênio em meio alcalino na presença do RSN como agente acoplador. Essas substâncias incolores reagem entre si formando compostos coloridos após a penetração no córtex capilar, proporcionando uma cor persistente e estável aos cabelos. Na primeira etapa da reação, rota “A” (Esquema 4), há a oxidação da PFD em quinonadiimina (QDI), que posteriormente reage com o acoplador nucleofílico (RSN) para formar o Corante Leuco, que é incolor. Este sofre uma oxidação e é convertido no Corante Idoalinina, que apresenta uma coloração vermelha, dentro do fio de cabelo. O Corante Idoalinina reage com uma molécula do intermediário primário QDI formando o Corante Idoalinina de coloração verde, que por sua vez continua polimerizando até a formação de uma grande cadeia polimérica (Poliindofenol). O Poliindofenol é caracterizado pela formação de um precipitado de coloração marrom, ao qual também propicia coloração idêntica aos cabelos. (8,24,26,27)

A presença dos acopladores na composição das tinturas capilares tem por função orientar a reação no sentido de formar o corante de coloração desejada, e isso faz com que a formação de subprodutos oriundos da oxidação dos precursores seja atenuada. Porém, mesmo nas condições determinadas pelo fabricante, nem todo o precursor reage com o acoplador, de modo que uma certa quantidade desses subprodutos é formada. (2,9,11-13,21,25-27,43,44,66,72)

As aminas utilizadas como precursores nas formulações dos corantes permanentes, podem ser facilmente oxidadas quando expostas a luz, oxigênio dissolvido no meio e a agentes oxidantes (ex. peróxido de hidrogênio), podendo se polimerizar e formar subprodutos de alta toxicidade, como pode ser observado na Rota “B” do Esquema 4, através da autooxidação e polimerização da PFD formando a BB, subproduto de coloração roxa altamente tóxico (8,24,26,27)

De modo geral, o tingimento dos cabelos com corantes permanentes é um processo complexo que envolve sequencialmente a oxidação de um ou mais precursores com um ou vários acopladores presentes nas formulações desses corantes. Neste tipo de coloração, o tempo de reação é de fundamental importância, pois o período de oxidação em um processo de tingimento rotineiro varia de 30 a 50 minutos. Além disso, o tingimento dos cabelos com esse tipo de tintura, deve ser realizada a temperatura ambiente, já que em altas temperaturas outros tecidos podem sofrer tingimento além dos cabelos. (8,11,24-27)

A tonalidade final da coloração depende da composição, quantidade e da natureza de todos os produtos utilizados. Depende ainda do pH, do tempo, temperatura de reação e da velocidade de difusão dos componentes para o interior da fibra do fio de cabelo. Assim, o tingimento dos cabelos com corantes permanentes é uma arte ditada pela cinética química de uma complexa reação e dos mecanismos de difusão envolvidos no processo. (8,27)



Esquema 4. Processo químico de tingimento dos cabelos e os principais produtos formados, pela reação química entre a PFD e o RSN, na presença de peróxido de hidrogênio e amônia.

Fonte: Esquema adaptado de OLIVEIRA, R. A. G.; ZANONI, T. B.; OLIVEIRA, D. P.; UMBUZEIRO, G. A.; ZANONI, M. V. B. A química e toxicidade dos corantes de cabelo. Química Nova, v. 37, n. 6, p. 1037-1046, 2014. (8)

2.5. Toxicidade, mutagenicidade, carcinogenicidade e genotoxicidade das tinturas de cabelos

A contaminação por corantes capilares ocorre principalmente por via de exposição dérmica no procedimento de tintura capilar. No processo de tingimento dos cabelos, os corantes são aplicados nos cabelos e entram em contato direto com o couro cabeludo, e parte das substâncias, intermediários de corantes e corantes propriamente ditos, que compõem as formulações de corantes capilares, podem penetrar na pele do couro cabeludo pelos poros e atingir a corrente sanguínea, contaminando os indivíduos que fazem o uso desses produtos. (27,38-40)

Muitos estudos, sobre a absorção percutânea de corantes capilares oxidativos e diretos em humanos, mostraram uma absorção variando de 0,21 a 1,77% da concentração inicial de corante capilar aplicada (27,40). Para a PTD, na pele humana, foi encontrada uma faixa de absorção percutânea de 2,06 a 3,56%. (27)

Após a absorção percutânea, parte desses compostos é metabolizada, principalmente por acetilação, na pele humana pela enzima N-acetiltransferase 1 (NAT1), que é encontrada predominantemente na pele dos mamíferos, e pela enzima N-acetiltransferase 2 (NAT2) encontrada no fígado (27,73,74). Para a PTD, os principais metabólitos encontrados são a N'-acetil-*p*-toluenodiamina e a N,N'-diacetil-*p*-toluenodiamina (75) e, para o PAF os principais metabólitos encontrados são o paracetamol e a fenacetina, mas é possível encontrar em quantidades menores outros metabólitos, tais como: *p*-aminofenol-*o*-glucuronídeo, sulfato de *p*-aminofenol, sulfato de paracetamol e glucuronídeo de paracetamol (33,76). No entanto, os metabólitos e as formulações dos compostos originais são encontrados no plasma sanguíneo e excretados (cerca de 80%) pela urina e pelas fezes. (27,39,74,75,77).

Diversos estudos mostram que as tinturas capilares podem provocar reações adversas. Os resultados dos testes de toxicidade aguda sugerem que grande parte dos principais ingredientes que compõem as formulações dos corantes permanentes, como os precursores e os acopladores, têm propriedades de toxicidade aguda que variam de moderadas a baixas. (27,31,32,43)

O PAF é um precursor bastante utilizado nas composições de muitas tinturas capilares permanentes comerciais (16,17,27,30-33,44,45,66). Testes toxicológicos realizados em ratos mostraram que o PAF é um agente nefrotóxico, causando necrose e inibição das atividades enzimáticas das microssomas e mitocôndrias dos rins (33,45,66,76,78-82). No mais, o PAF

pode causar metemoglobinemia (33,45,66,76,78-82), que é uma síndrome causada pelo aumento da concentração da metemoglobulina (forma oxidada da hemoglobina), que interfere e diminui a absorção e o transporte normal de oxigênio para as células, podendo acarretar uma asfíxia química e em até 60% dos casos pode levar o indivíduo a óbito (83,84). Provavelmente isso ocorre devido a capacidade do PAF de formar ligações covalentes com os grupos tióis (-SH) reativos da molécula da hemoglobina, transferindo elétrons para o oxigênio que acaba por oxidar a hemoglobina formando a metemoglobulina (83,84). Além disso, o PAF pode causar alergias, dermatites, erupção cutânea, agitação, dores de cabeça, convulsões, perda da consciência, irritação pulmonar, asma brônquica e danos no sangue, fígado, rins e cérebro (33,45,66,76,78-82). Embora os resultados dos testes tenham demonstrado que o PAF não é carcinogênico, ele pode trazer um potencial risco genotóxico, desde que a exposição seja constante. (45,66,85)

Alguns estudos realizados com acoplador RSN o correlacionaram como um desregulador endócrino, afetando principalmente a tireóide. (8,27,33,86)

O principal efeito adverso de doses de PFD, no homem e nos mamíferos superiores, é angioneurótico, ou seja, há a formação de edemas nos pulmões que provocam distúrbios respiratórios agudos. No mais, a PFD pode provocar gastrite, insuficiência renal, vertigem, tremores, convulsões, coma e rabdomiólise, que é a necrose do músculo esquelético, resultando em insuficiência renal aguda, bem como atrofia do nervo óptico (27,31,32). Além disso, outros testes indicam que precursores e acopladores, usados em tinturas permanentes, têm levantado preocupações para a saúde humana devido a riscos associados a alergias e dermatites (8,27,33,78). Em 2006, a PFD foi considerada pela Sociedade Americana de Alergia de Contato como o “alérgeno de contato do ano”. Na Alemanha e na França, por exemplo, a utilização da PFD foi proibida entre os anos de 1906 a 1980, onde posteriormente foi liberada por toda a Europa (27,78). Dados estatísticos descrevem a PFD como o 5º maior alérgeno entre os anos de 1985 e 1990, e como o 15º alérgeno mais frequente durante 1991 a 1996. (27,78)

A PTD, um derivado da PFD, é extremamente utilizado na composição de formulações de corantes capilares sintéticos comerciais, onde não diferentemente da PFD, apresenta também um claro potencial para induzir e desencadear processos alérgicos, segundo numerosos estudos realizados em animais e em humanos. Entre os anos de 1991 a 1996, a PTD foi descrita na Europa como sendo o 16º alérgeno mais frequente (27,78). Além de altamente alérgica, a PTD pode causar dermatites severas, infecções na pele, ematomas,

irritação nos olhos causando a opacidade das córneas, queratoconjuntivite, blefarite e úlceras estomacais. Além disso, pode causar hipoplasia, que é o desenvolvimento defeituoso ou incompleto de tecidos ou órgãos causados pela diminuição do número de células, pode provocar anemia aplásica, que ocorre quando a medula óssea não consegue produzir quantidades suficientes de glóbulos vermelhos, glóbulos brancos e plaquetas. No mais, a PTD é altamente genotóxica e mutagênica, principalmente após ser oxidada com peróxido de hidrogênio, e bastante tóxica à biota aquática com efeitos longos e duradouros. (27,28,30,44,66,78,87)

Uma alta taxa de alergia foi confirmada por uma análise recente dos relatórios de cosmetovigilância registrados, por quatro dos principais produtores de corantes capilares, em eventos indesejáveis atribuídos aos corantes de cabelos (78,88). No entanto, é cada vez mais reconhecido que a moda de arte corporal da "tatuagem temporária" com henna está cada mais difundida, particularmente entre os jovens de todo o mundo. As tintas usadas para esse tipo de tatuagem contém em sua formulação doses altas de PFD, que podem desempenhar um papel importante na alergia ao contato com corante capilar. (78,89,90)



Figura 14. Processo alérgico provocado por corante capilar permanente* (A), por doses de PFD** (B) e em tatuagem de henna*** (C).

Fontes: * Imagens adaptadas do site “R7” (<https://recordtv.r7.com/hoje-em-dia/videos/adolescente-quase-fica-cega-apos-passar-tintura-nas-sobrancelhas-14102018>). Acessado 24 janeiro 2020; (91)

** Imagem adaptada de BRANCACCIO, R. R.; BROWN, L. H.; CHANG, Y. T.; FOGELMAN, J. P.; MAFONG, E. A.; COHEN, D. E. Identification and quantification of para-phenylenediamine in a temporary black henna tattoo. *American Journal of Contact Dermatitis*, v. 13, n. 1, p. 15-18, 2002. (92)

*** Imagens adaptadas do site “Yahoo” (<https://br.noticias.yahoo.com/reacao-tatuagem-de-henna-destroi-braco-de-crianca-073859783.html>). Acessado 24 jan. 2020. (93)

Os compostos químicos encontrados nas tinturas capilares sintéticas permanentes, como precursores, acopladores, aditivos e entre outros são considerados, de certa forma, os compostos mais reativos da indústria cosmética, o que torna o processo de tingimento dos cabelos bastante complexo [11,21]. Isso faz com que o potencial toxicológico dessas tinturas não seja só de responsabilidade dos compostos puros utilizados nas composições desses produtos, mas também pelos produtos secundários e subprodutos gerados pela oxidação de precursores e acopladores durante o processo de tingimento dos cabelos.

Um exemplo clássico é a formação da BB pela da oxidação da PFD. Além de ser um subproduto indesejado no processo de tingimento dos cabelos, a formação da BB tem suscitado grande preocupação, uma vez que alguns autores indicam que a BB é forte sensibilizante, potente alergênico e atua na perda dos cabelos, além de ser altamente genotóxica, mutagênica e carcinogênica. (78,79,94,95)

O potencial de carcinogenicidade dos ingredientes utilizados nas formulações de corantes capilar atraiu a atenção de toxicologistas e epidemiologistas por muitas décadas, dado que os ingredientes utilizados na composição desses corantes pertencem a classe das arilaminas, que inclui conhecidos compostos carcinógenos em humanos, como a benzidina, 4-aminobifenilo e a 2-naftilamina. A atividade carcinogênica de algumas arilaminas foi reconhecida já no final do século XIX, produzindo uma incidência aumentada de câncer de bexiga em trabalhadores ocupados na indústria de corantes. (78)

Embora algumas arilaminas sejam conhecidas como cancerígenas em humanos e outros mamíferos, muitas substâncias dessa grande classe química não possuem atividade carcinogênica. No entanto, dado o alto potencial de carcinogenicidade das arilaminas, o potencial cancerígeno das tinturas de cabelos e seus ingredientes tem sido uma grande preocupação e investigado por diversas indústrias do ramo e diversos organismos governamentais como a Agência Internacional para a Pesquisa sobre Câncer (IARC) da Organização Mundial da Saúde (OMS) e por pesquisadores independentes do Programa Nacional de Toxicologia dos Estados Unidos. (78,96,97)

Nos primeiros testes, realizados em 1975 por Ames e colaboradores (98), para a avaliação da genotoxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade dos corantes capilares e dos ingredientes utilizados nas formulações desses corantes (precursores e acopladores), sugeriram que quase 90% desses ingredientes foram mutagênicos no teste com *Salmonella typhimurium*, e representam um alto risco de carcinogenicidade para os consumidores. (78,98)

Diversos estudos mostraram uma correlação no aumento da incidência de alguns tipos de cânceres e diversas doenças com a utilização de corantes capilares, dentre eles podemos destacar: câncer de pulmão, pâncreas, colo do útero, colorretal, pele, trato digestivo superior, tireóide, bexiga urinária, Doença de Hodgkin e leucemia. (8,22,99,100-103)

Um estudo caso-controle, desenvolvido por Gago-Dominguez e colaboradores (102), relatou um aumento da incidência de câncer de bexiga urinária em mulheres usuárias de tinturas de cabelos. Em uma segunda publicação, os mesmos autores sugeriram que o aumento do risco de câncer de bexiga em usuários de tintura de cabelo estavam principalmente associados à enzima NAT2 (103). A enzima NAT2 é considerada uma enzima chave responsável pela desintoxicação de arilaminas no fígado, diminuindo o fenótipo acetilador exposto ocupacionalmente pelas arilaminas carcinogênicas, e com isso podendo estar associada a um maior risco de desenvolver câncer de bexiga (104). No entanto, dado que as tinturas de cabelos e seus ingredientes têm principalmente contato com a derme, elas podem ser primeiramente acetilados pela enzima NAT1 na pele. Assim, é provável que a NAT2 desempenhe um papel menor, se houver, na desintoxicação, ativação, na mutagenicidade e carcinogenicidade dos corantes capilares e de seus ingredientes quando em contato com a pele. (40)

Nos últimos anos, potenciais problemas reprodutivos, e efeitos adversos devido à exposição ocupacional a corantes capilares e outras substâncias presentes em salões de cabeleireiro foram investigados. A maioria desses estudos investigou parâmetros de reprodução, nascimentos prematuros, prevalência de baixo peso de recém nascidos e de bebês em idade gestacional. Alguns estudos sugeriram um aumento no número de recém nascidos com baixo peso na prole de cabeleireiros da Suécia, Finlândia e Estados Unidos. (105-112)

No entanto, um estudo realizado em cabeleireiros do sexo masculino, entre os anos de 1960 e 1998 na Suécia, registrou uma correlação entre os corantes de cabelos e o aumento da incidência de câncer do trato digestivo superior, pulmão e colorretal. Já com relação a cabeleireiros do sexo feminino, verificou-se um aumento do risco de desenvolver câncer de pulmão, pâncreas, colo do útero e pele, principalmente no couro cabeludo e pescoço, que são locais onde há maior contato das tinturas de cabelo. (8,100)

Em um estudo de caso-controle, Zheng e colaboradores (113) não encontraram qualquer correlação com risco de câncer de mama associado ao uso de corantes capilares. Resultados semelhantes também foram observados por Cook e colaboradores. (114)

Demais estudos foram realizados correlacionando usuários e cabeleireiros que têm contato com corantes capilares com o desenvolvimento de câncer de bexiga. Os resultados obtidos mostraram que pessoas que tingem seus cabelos pelo menos uma vez por mês, por um período de um ano, têm 1,9 vezes mais chances de desenvolverem câncer de bexiga. Usuários que tingem seus cabelos pelo menos uma vez por mês, por um período de quinze anos ou mais, têm 3,3 vezes mais chances de desenvolverem esse tipo de câncer. Na mesma pesquisa foi descoberto que profissionais que tem contato rotineiro com corantes capilares, por dez anos ou mais, têm 5 vezes mais chances de desenvolverem câncer de bexiga. (27)

Pesquisas realizadas no Japão, com relação ao uso de tinturas de cabelos e o desenvolvimento de síndrome mielodisplásica tiveram resultados negativos, e não tiveram detectado nenhum risco aumentado com relação ao uso de tinturas de cabelos. (8,115)

Desta forma, a correlação entre o risco do desenvolvimento de diferentes tipos de cânceres e o uso regular de tinturas capilares ainda não está bem estabelecida, considerando as discrepâncias entre os estudos publicados até o momento (8). Em uma revisão publicada em 2010, Nohynek e colaboradores mostraram, em diferentes estudos realizados, que não houve evidências suficientes que comprovem que a exposição ocupacional ou ocasional à tinturas de cabelos causem algum efeito tóxico na reprodução humana. (78)

Todavia, a literatura ainda é bastante escassa, quanto à toxicidade dos corantes capilares aos seres humanos, devido à dificuldade de associação entre estes e as alterações fisiológicas específicas. Em geral, as pesquisas são realizadas inicialmente em condições muito específicas e na maioria das vezes não retratam as condições reais do uso das tinturas de cabelos. Assim, a maioria dos trabalhos envolve apenas o estudo dos precursores e acopladores separadamente, e não dos corantes formados após reação específica entre ambos, ou dos outros tipos de corantes básicos e ácidos usados nas formulações de tinturas temporárias e dos corantes do tipo semipermanentes.

2.6. Métodos analíticos desenvolvidos e utilizados na quantificação e no monitoramento de corantes capilares em diversas matrizes

A utilização, produção e venda de corantes capilares cresceu vertiginosamente nos últimos anos em virtude da popularização, desenvolvimento tecnológico, criação de novas formulações com maior poder de fixação, durabilidade, diversidade de cores e tonalidades,

segurança e por preços mais acessíveis, o que faz movimentar ainda mais o mercado multimilionário de cosméticos. (8,12,21,44)

O aumento do consumo de corantes de cabelos e a necessidade de controle exigem que o processo de fabricação seja baseado em práticas rigorosamente controladas, para obter um produto padronizado com características físico-químicas satisfatórias, a fim de minimizar os riscos e os efeitos colaterais oferecidos aos usuários por esses produtos. (66)

Os corantes capilares são regulados, por normas bem definidas, por diversas agências reguladoras em todo o mundo. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é a responsável pela autorização para a comercialização de produtos cosméticos, fiscalização das empresas que fabricam esses produtos, verificação do processo de produção e das técnicas e métodos empregados para o controle de qualidade desses produtos. De acordo com a ANVISA, antes de um produto ser lançado no mercado, a segurança deve ser avaliada pelo próprio fabricante ou importador por meio de diversos ensaios toxicológicos como: toxicidade sistêmica aguda, corrosividade, irritação dérmica, sensibilização cutânea, absorção e penetração cutânea, mutagenicidade, genotoxicidade, toxicidade subaguda e subcrônica, irritação ocular, irritação de mucosas, efeitos tóxicos induzidos pela radiação ultravioleta (fototoxicidade e fotoalergia), carcinogenicidade, toxicidade do desenvolvimento e reprodução (teratogenicidade), toxicocinética e toxicodinâmica. (8,117)

Para este fim, métodos analíticos capazes de detectar e quantificar corantes de cabelo e seus derivados em diversas matrizes ambientais e de fluídos biológicos são importantes tanto para monitorar contaminação ambiental quanto para a proteção da saúde humana. (8,66)

Nos últimos anos, muitos estudos mostraram a presença de traços de corantes, precursores e acopladores nos ecossistemas aquáticos (44,45,118-125). Em um trabalho recente, Vacchi e colaboradores (123) relataram ter encontrado os corantes Azul Disperso 291, Azul Disperso 373, Laranja Disperso 30, Vermelho Disperso 1, Violeta Disperso 93 e Amarelo Disperso 3, na faixa de concentração de 0,01 a 6,81 $\mu\text{g L}^{-1}$, oriundos de efluentes de uma estação de tratamento de águas residuais, em amostras a montante e a jusante da água do Rio Piracicaba e no afluente do Rio Quilombo (ambos localizados no estado de São Paulo).

Umbuzeiro e colaboradores (121) relataram que os efluentes do processo de tingimento com corantes, que possuíam aminas aromáticas e compostos nitro-aromáticos em sua composição, foram responsáveis pela atividade mutagênica observada nas águas do Rio Cristal, que está localizado na região metropolitana da cidade de São Paulo.

Para isso, diversas técnicas analíticas têm sido utilizadas. A técnica de cromatografia

líquida de alta eficiência (CLAE) é uma das ferramentas analíticas mais utilizadas para separação, detecção e quantificação de substâncias orgânicas em diferentes matrizes, operando com fase móvel adequada e com métodos de detecção que podem oferecer seletividade, sensibilidade e exatidão de análise. Com o avanço tecnológico, a disponibilidade dos métodos de detecção acoplados a CLAE é enorme, podendo ser utilizados detectores tais como: fotométricos (UV-Vis e arranjo de diodos (DAD)), fluorescência, índice de refração, eletroquímico e espectrometria de massas. A alta detectabilidade e separação dos componentes da amostra dependem principalmente da seleção apropriada do detector e da coluna cromatográfica, respectivamente. (44,45,66,126-128)

Narita e colaboradores (129) determinaram simultaneamente 7 aminofenóis (dentre eles o PAF), RSN e PFD em formulações comerciais de tinturas de cabelo por CLAE com detecção eletroquímica utilizando eletrodo de ouro. Os compostos foram separados em uma coluna de fase reversa C18, por eluição isocrática, com uma fase móvel composta de tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 4,5) : metanol (90 : 10% (v/v)) e vazão de 0,8 mL min⁻¹. Os limites de detecção obtidos foram na faixa de 15 a 40 pg, com um potencial aplicado de 0,95 V *versus* Ag/AgCl. Desvios padrões relativos foram compreendidos na faixa de 2,5% a 6,2%, dependendo do composto.

Rastogi (130) desenvolveu uma metodologia analítica para determinação de diferentes precursores (entre eles a PTD) e acopladores, de corantes capilares permanentes, em formulações comerciais de tinturas de cabelo por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (CLAE/DAD). Os compostos foram separados em uma coluna de fase reversa RP-amide C16, com eluição por gradiente, e fase móvel composta de tampão fosfato 0,025 mol L⁻¹ (pH 6,0), contendo 0,1 % (v/v) de sal sódico do ácido heptanossulfônico: acetonitrila, e vazão de 1,0 mL min⁻¹. Boas recuperações foram obtidas com a metodologia analítica proposta.

Bessegato e colaboradores (43) determinaram simultaneamente PFD, RSN e BB em amostras de efluente de salão de cabeleireiros, recolhidos após o processo de tingimento dos cabelos com corantes capilares permanentes, por CLAE/DAD. Os compostos foram separados em uma coluna de fase reversa C18, utilizando eluição por gradiente, e uma fase móvel composta de tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 5,6):metanol a uma vazão de 0,8 mL min⁻¹. Na amostra avaliada foi encontrada uma concentração de 0,058 ± 0,02 mg L⁻¹ de PFD e 4,52 ± 0,17 mg L⁻¹ de RSN.

Mohamed e colaboradores (131) determinaram simultaneamente PFD e seus principais metabolitos (N-acetil-*p*-fenilenodiamina e N,N-diacetil-*p*-fenilenodiamina), em amostras de sangue de cadáveres, por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE-MS/MS). Os compostos foram separados em uma coluna de fase reversa C18, utilizando eluição por gradiente, e uma fase móvel composta de ácido fórmico 0,1% (v/v) : acetonitrila a uma vazão de 1,0 mL min⁻¹. Nas amostras de sangue avaliadas, quantidades consideráveis tanto de PFD quanto de seus metabólitos foram encontradas.

Métodos eletroquímicos também vêm sendo desenvolvidos no monitoramento de corantes, precursores e acopladores de corantes capilares. Nesse sentido, destaca-se o desenvolvimento de eletrodos quimicamente modificados, que são capazes de permitir a identificação e a quantificação de diferentes analitos, simultaneamente ou não, de forma rápida, específica e precisa em baixas concentrações e em matrizes complexas. (12,44,66,132)

As infinitas possibilidades de modificação de eletrodos permitem o desenvolvimento dos mais variados sensores para atender a demanda nas mais diversas áreas, principalmente em aplicações ambientais, onde tanto a indústria quanto os órgãos de vigilância ambiental, necessitam de sensores para análise quantitativa ou diferencial de inúmeros rejeitos industriais e domésticos, tais como precursores de corantes capilares permanentes, que são compostos orgânicos considerados poluentes emergentes (12,44,66,132,133). Estes eletrodos são frequentemente preparados pela modificação de um substrato condutor para produzir um eletrodo adequado para uma determinada função (134), inibindo ou favorecendo alguns processos, levando a maior seletividade e sensibilidade de análise. Isto pode ocorrer devido a alguns processos eletroquímicos, como a aceleração do processo de transferência de elétrons, acumulação preferencial, ou barrar espécies indesejadas por permeação seletiva. (135)

Nessa linha, Hudari e colaboradores (12) determinaram simultaneamente PFD e RSN, em amostras de formulações comerciais de tinturas de cabelo e água de torneira, utilizando um sensor voltamétrico simples e econômico, constituído de um eletrodo de carbono vítreo (GCE) revestido por compósitos de nanotubos de carbono de múltiplas paredes modificados com quitosana (MWNTs–CHT/GCE). A modificação do eletrodo de carbono vítreo na metodologia proposta aumentou a densidade de corrente em 10% para a PFD e 70% para o RSN em relação ao eletrodo não modificado. A curva de calibração mostrou linearidade entre 0,55 e 21,2 mg L⁻¹ com limites de detecção de 0,79 e 0,58 mg L⁻¹ para PPD e RSN, respectivamente, e recuperação nas amostras em torno de 97%.

Yin e colaboradores (132) utilizaram um eletrodo de carbono vítreo modificado com um filme composto de grafeno e quitosana, para determinar PAF em amostras de água e comprimidos de paracetamol. A modificação do eletrodo de carbono vítreo com grafeno e quitosana aumentou a densidade de corrente, e um limite de detecção de $5,7 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ foi obtido para o PAF na metodologia proposta.

Outras técnicas analíticas também foram utilizadas para determinação de precursores, acopladores e corantes em diferentes matrizes ambientais e biológicas. Dentre elas podemos destacar a cromatografia gasosa acoplada a diversos detectores (136-138), eletroforese capilar (139) e espectrofotometria UV-Vis (140).

Neste contexto, diante da alta utilização das tinturas capilares permanentes e do escasso relato de investigação sobre a avaliação do mecanismo de reação, ação citotóxica, mutagenicidade e monitoramento de agentes precursores, é altamente pertinente investigar, identificar e monitorar os produtos principais e secundários produzidos pela oxidação da PTD, do PAF e da reação entre ambos com vistas a mimetizar as tinturas permanentes de cabelo em meio alcalino de tampão amônio (pH 8,0), na presença e ausência de peróxido de hidrogênio como agente oxidante. Para isto pretende-se utilizar métodos espectrofotométricos na região do UV-Vis e do infravermelho (IR) médio, espectrometria de massas (MS/MS), espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H -RMN) e técnicas eletroquímicas.

Além disto, é importante a avaliação da toxicidade/mutagenicidade desses produtos, bem como, desenvolver metodologias analíticas para determinação da PTD e do PAF, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos e utilizando métodos eletroquímicos, para o monitoramento e quantificação em amostras de efluente de salão de cabeleireiros, coletados após o tingimento de cabelos com corantes permanentes, águas superficiais e de estações de tratamento de água e matrizes biológicas. Para isso, é proposto o desenvolvimento de um método cromatográfico, a construção de um sensor eletroquímico utilizando eletrodo de carbono impresso modificado com nanopartículas magnéticas de magnetita funcionalizadas com grupos carboxílicos e L-cisteína. E por fim, entender como os compostos alvos desse estudo, a PTD e o PAF, interagem com a queratina e os aminoácidos presentes nos fios de cabelo humano, pela construção de um biossensor baseado na modificação de um eletrodo de carbono vítreo com queratina de cabelo humano.

3. Objetivos

O objetivo do presente trabalho é buscar informações sobre os mecanismos de reação envolvendo a oxidação da PTD, do PAF e da reação entre ambos, identificando os principais produtos em condições oxidativas que mimetizam as tinturas permanentes de cabelos, na presença e ausência de peróxido de hidrogênio como agente oxidante, e propor novos métodos analíticos para monitoramento dos precursores e produtos gerados em águas residuárias.

Dentro dos objetivos específicos pretende-se:

- Identificar os principais subprodutos gerados na oxidação da PTD, PAF e da reação entre ambos, utilizando métodos espectrofotométricos na região do UV-Vis e do infravermelho médio, espectrometria de massas, espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e técnicas eletroquímicas;
- Avaliar a toxicidade e a mutagenicidade desses produtos usando *Daphnia* e o método de AMES, repectivamente;
- Desenvolver e/ou aplicar métodos cromatográficos por CLAE/DAD e métodos eletroanalíticos para determinação de PTD, PAF e seus subprodutos em amostras de efluente de salão de cabeleireiros, amostras de água coletadas antes e após o tratamento em estação de tratamento de água (ETA) e, amostras biológicas;
- Propor a construção de um sensor eletroquímico utilizando eletrodo de carbono impresso modificado com nanopartículas funcionalizadas com grupos carboxílicos e L-cisteína;
- Investigar o comportamento voltamétrico da queratina presente nos fios de cabelos humanos e sua interação com os compostos alvo desse estudo, a PTD e o PAF usando técnicas eletroanalíticas.

4. Parte experimental

4.1. Reagentes e equipamentos

Todos os reagentes usados neste trabalho foram de grau analítico e utilizados sem purificação prévia. Todas as soluções aquosas foram preparadas utilizando água ultrapura do sistema Milli-Q, Millipore (condutividade $\leq 0.10 \mu\text{S cm}^{-1}$). Os padrões de *p*-toluenodiamina (97,0%), *p*-aminofenol (98,0%), ácido bórico (99,0%), hidróxido de sódio (98,0%) e L-cisteína (97,0%), ureia (para biologia molecular, 98,0%), dodecilsulfato de sódio (98,5%), hexacianoferrato de potássioII (99,98%), hexacianoferrato de potássioIII (99,0%) e tris(2-

carboxietil)fosfina (98,0%) foram obtidos da Sigma-Aldrich. Os reagentes acetato de amônio (99,5%), hidróxido de amônio (28,0 – 30,0%), peróxido de hidrogênio (30,0% (v/v) (100 volumes)), sulfato de sódio decaidratado (99,0%), cloreto de cálcio hexaidratado (99,0%), tetraborato de sódio decaidratado (99,0%), cloreto de amônio (99,8%), cloreto de potássio (98,5%), cloreto de sódio (99,5%), ácido clorídrico (32,0%), dihidrogenofosfato de sódio (99,0%) e dihidrogenofosfato de potássio (99,5%) foram obtidos da Merck. Ácido acético glacial (100,0%), metanol (99,9%), clorofórmio (99,9%), acetonitrila (99,9%) e ácido fórmico (88,0%), todos grau HPLC, foram obtidos da J. T. Baker. Acetato de etila (99,9%) foi obtido da Mallinckrodt. Ácido fosfórico (85,0%) foi obtido da Synth. Acetato de sódio trihidratado (100,0%) e hidrogenofosfato dissódico dihidratado (99,9%) foram obtidos da Analar Normapur. Soluções de tampão amônio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 8,0 foram preparadas pela mistura de 50,0 mL de hidróxido de amônio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, 250,0 mL de acetato de amônio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ e posterior diluição com água ultrapura. Soluções de tampão acetato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 5,6 foram preparadas pela mistura de 48,0 mL de ácido acético $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, 452,0 mL de acetato de amônio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ e posterior diluição com água ultrapura até o volume de 2000,0 mL. Para estudo do comportamento eletroquímico da PTD, PAF, queratina e sua interação com os precursores de corantes capilares, soluções de eletrólitos suporte: HCl/KCl (pH 1,0 - 2,0), tampão acetato (pH 3,0 - 5,0), tampão fosfato (6,0 - 8,0), tampão bórax (pH 9,0 - 11,0) e NaOH/KCl (pH 12,0) foram preparadas em água ultrapura a uma concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Para o preparo das soluções tampão Briton-Robinson (tampão BR) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, a pHs variando de 2,0 a 10,0; foram preparadas a partir da mistura de 12,5 g de ácido bórico, 12,3 mL de ácido fosfórico e 11,5 mL de ácido acético glacial, posteriormente diluída com água ultrapura até o volume de 1000,0 mL, onde todos os reagentes ficaram com uma concentração final de $0,2 \text{ mol L}^{-1}$. Após o preparo da solução tampão BR, volumes dessa solução tiveram o pH desejado acertado com a adição de volumes de uma solução de hidróxido de sódio $3,0 \text{ mol L}^{-1}$. Por fim, foi adicionado água ultrapura, para que a solução de tampão BR ficasse com uma concentração final de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

4.2. Oxidação da PTD, do PAF e a reação entre ambos

Soluções de PTD e PAF na concentração de $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ em tampão amônio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 8,0, foram submetidas à oxidação na presença e ausência de 0,1% (v/v) de peróxido de hidrogênio para a PTD e 0,05% (v/v) de peróxido de hidrogênio para o PAF. A oxidação da PTD e do PAF foi monitorada por espectrometria de massas MS/MS e espectrofotometria

UV-Vis, por um período de 180 minutos (3 horas), com obtenção de espectros a cada 30 minutos, na presença e ausência de luz ambiente. Os produtos de reação foram caracterizados por espectroscopia na região do infravermelho (IR) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H -RMN).

A reação entre a PTD e o PAF também foi avaliada em proporção estequiométrica de 1:1, respectivamente, em tampão amoniacal $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 8,0, na presença e ausência de luz ambiente e de 1,0% (v/v) de peróxido de hidrogênio. O monitoramento da reação foi realizado por espectrometria de massas MS/MS e espectrofotometria UV-Vis, por um período de 180 minutos (3 horas), com obtenção de espectros a cada 30 minutos, na presença e ausência de luz ambiente. De maneira semelhante ao monitoramento da oxidação da PTD e do PAF, os produtos de reação foram caracterizados por espectroscopia na região do infravermelho (IR) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H -RMN).

4.3. Produtos de oxidação da PTD, do PAF e da reação entre ambos

A separação dos compostos obtidos pela oxidação da PTD, do PAF e da reação entre ambos foi realizada por cromatografia de camada delgada (CCD) usando placas de sílica gel $20 \times 20 \text{ cm}$ DC-Fertigfolien ALUGRAM Xtra Sil G/UV254 de Macherey-Nagel. Para isso, soluções de PTD, de PAF e de ambos juntos em proporção estequiométrica de 1:1, respectivamente, foram preparadas na concentração de $1000,0 \text{ mg L}^{-1}$ em tampão amônio a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 8,0, na presença e na ausência de 1,0% (v/v) de peróxido de hidrogênio. Em seguida uma quantidade dessas soluções foram adicionadas nas placas de sílica com auxílio de um capilar de vidro.

A separação cromatográfica foi realizada em um vaso de vidro de fase móvel constituído de clorofórmio, acetato de etila e metanol como fase móvel na composição de 6:2:2 (v/v/v), respectivamente. Os produtos formados a partir de soluções recém preparadas e em soluções com intervalos de tempo de 3 horas foram avaliados tanto na presença como na ausência de luz ambiente e peróxido de hidrogênio.

Após a realização da corrida cromatográfica, as placas de sílica foram reveladas em uma câmara escura equipada com uma lâmpada UV-Vis. Os respectivos produtos formados e revelados na câmara escura foram extraídos da sílica com $10,0 \text{ mL}$ de uma mistura de solventes composta por clorofórmio, acetato de etila e metanol a 6:2:2 (v/v/v), respectivamente e sujeitos a sonicação à temperatura ambiente durante 5 minutos. Finalmente,

os extratos dos produtos formados foram filtrados em papel de filtro e os solventes foram totalmente evaporados.

4.4. Monitoramento da PTD, do PAF e da reação entre ambos

Medidas espectrofotométricas na região do visível e do ultravioleta (200 a 800 nm) foram realizadas num espectrofotômetro Hewlett-Packard 8453 UV-Vis utilizando uma cubeta de quartzo de 1,0 cm. O monitoramento da solução anterior (descrita na seção 4.2) foi realizada por um período de 3 horas com a obtenção de espectros a cada 30 minutos.

Os produtos separados por CCD foram ressuspensos em 1,0 mL de clorofórmio e analisados por espectrometria de infravermelho usando um espectrômetro Bruker, modelo VERTEX, com transformada de Fourier equipado com detector tipo DLaTGS, na faixa de 400 a 4000 cm^{-1} .

Para monitorar a formação dos produtos a partir da oxidação da PTD, do PAF e da reação entre ambos, medidas de espectrometria de massas foram realizadas em um espectrômetro de massas 3200 QTRAP (ESI - Trap Quadrinole Linear ESI-MS/MS) da AB SCIEX, no modo de ionização por eletropulverização positiva ($[M+H]^+$). Para isso, experimentos completos de varredura que variaram de 100 a 900 Da foram realizados para a reação em solução e para os produtos isolados por CCD. As amostras dos produtos foram solubilizadas em 1,0 mL de metanol, e 100,0 μL dessas amostras foram diluídas em 900,0 μL de acetonitrila e água ultrapura na proporção de (1:1) (v/v) contendo 0,1% (v/v) de ácido fórmico. As análises foram realizadas via infusão direta no espectrômetro de massas, por uma seringa automática em um fluxo de 10,0 $\mu\text{L min}^{-1}$. Os parâmetros da fonte de ionização utilizados foram: electrospray 5500 V, gás de cortina (CUR) 10 psi, gás nebulizador de 15 psi, potencial de depleção (DP) 35 V, potencial de entrada (EP) 10 V, potencial de saída de colisão (CXP) 30 V e energia de colisão (CE), que variou de 15 a 30 V.

As medidas de ressonância magnética nuclear de hidrogênio foram realizadas com tubo de quartzo de 3,0 mm de diâmetro em um equipamento Bruker, modelo Avance III HD 600 Hz. Para isso, os produtos isolados por CCD foram solubilizados em 200,0 μL de metanol tetradeuterado e depois transferidos para o tubo de vidro.

4.5. Testes de mutagenicidade e toxicidade dos produtos formados pela reação de oxidação da PTD, do PAF e da reação entre ambos

A avaliação da mutagenicidade e da toxicidade dos produtos formados pela oxidação da PTD, do PAF e da reação de ambos foi desenvolvida em parceria com o grupo de pesquisa Prof^a. Dr^a. Gisela de Aragão Umbuzeiro, Docente da Faculdade de Tecnologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), campus da cidade de Limeira - SP.

Os testes de mutagenicidade e toxicidade foram realizados apenas para os produtos principais e finais, uma vez que na literatura a avaliação toxicológica e mutagênica da PTD e do PAF é conhecida, porém não há relatos a respeito dos produtos formados pelas reações desses compostos.

Para a realização dos testes para os produtos e subprodutos de reação estudados, derivado da BB (produto final da oxidação da PTD), trímero e tetrâmero (produtos finais da oxidação do PAF) e dos produtos precipitados e solúveis formados através da reação de ambos, soluções de PTD e de PAF foram preparadas em uma concentração de 1000,0 mg L⁻¹ em tampão amônio 0,1 mol L⁻¹ a pH 8,0, com 1,0% (v/v) de peróxido de hidrogênio. A reação entre a PTD e o PAF foi realizada na mesma condição anterior na proporção estequiométrica de (1:1), respectivamente. Os produtos precipitados formados tanto na reação de oxidação do PAF quanto na reação com a PTD foram retirados por filtração com papel de filtro quantitativo e, posteriormente recolhidos e secos com nitrogênio. Os demais produtos formados na reação de oxidação da PTD, do PAF e da reação entre ambos foram isolados e extraídos pela técnica de extração líquido-líquido com três frações de 10,0 mL de clorofórmio, e posteriormente secados por evaporação do solvente com nitrogênio.

Os testes de mutagenicidade foram conduzidos utilizando uma versão miniaturizada do ensaio de micro suspensão *Salmonella*/microsoma desenvolvido por Zwarg e colaboradores (141). O teste foi realizado em microplacas de 12 poços contendo agar mínimo, onde a amostra de teste e as bactérias foram pré-incubadas com e sem ativação metabólica (mistura S9) por 90 minutos. Quatro réplicas de cada concentração foram testadas e o número de revertentes por poço é contado após 66 horas.

A cepa *Salmonella enterica* serovar Typhimurium YG1041 foi selecionada para este estudo devido à sua alta sensibilidade a nitroarenos e aminas aromáticas (142). As amostras foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) e testadas nas concentrações de 0,1, 1,0 e 10,0 µg mL⁻¹. Todos os meios e a mistura S9 foram preparados com base nos procedimentos

descritos por Mortelmans e Zeiger (143). A mistura S9 a 5% foi preparada utilizando o S9 de fígado de rato induzido por Aroclor 1254, obtido da Moltox - EUA. Os controles negativos consistiram de DMSO e os controles positivos foram incluídos. Utilizamos 4-nitro-o-fenilenodiamina a $20,0 \text{ ng mL}^{-1}$ sem S9 e 2-aminoantraceno a $0,3 \text{ ng mL}^{-1}$ com S9. A toxicidade foi avaliada pela inspeção cuidadosa do fundo dos poços com o auxílio de um estereomicroscópio.

Os dados foram analisados no programa Salanal e consistiram em uma análise estatística ANOVA seguida do teste ad hoc de Tukey. Resultados de ANOVA com $p < 0,05$ indicam uma resposta positiva. Os dados também foram analisados para um modelo linear de truncamento de regressão linear do tipo Bernstein, onde $p > 0,05$ indica que o modelo tinha um bom ajuste (144). A potência mutagênica do composto foi expressa em Concentração Efetiva Mínima (CEM₂), que é a concentração que dobrou o número de revertentes espontâneos, calculada com base na regressão linear.

Os testes de toxicidade foram realizados para a mistura de todos os produtos e para os produtos solúveis em água (sem os produtos precipitados), obtidos da reação entre a PTD e o PAF em meio alcalino oxidante, a partir da toxicidade aguda em *Daphnia*. A *Daphnia similis* é cultivada no LAEG - Laboratório de Ecotoxicologia Genotoxicidade da Faculdade de Tecnologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). A cultura foi mantida em meio MS a $20 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 6,0 a 9,0; dureza, 40,0 a 48,0 mg L^{-1} expressos em CaCO_3 , com (16:8) luz/escuridão e intensidade leve de 1000 lux (145). Os organismos são alimentados diariamente com algas verdes *Raphidocelis subcapitata* (10^6 células org^{-1}). Experimentos preliminares foram realizados com duas repetições seguidas de testes definitivos usando três repetições. Em cada repetição de cinco organismos de neonatos, 6-24 horas de idade, foram expostos à substância em tubos de plástico (10,0 mL) durante 48 horas à $20 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, com uma intensidade de luz de 1000 lux sob fotoperíodo (16:8 de luz/escuridão), sem alimentação.

Após o período de exposição de 48 horas, o número de organismos imobilizados foram contados. Os testes são considerados válidos se a taxa de imobilização fosse inferior a 10% no grupo de controle negativo (145). Os testes de sensibilidade são rotineiramente realizados com cloreto de sódio (NaCl). As amostras foram testadas em experimentos de resposta de concentração em escala logarítmica. O tampão utilizado para preparar as amostras (tampão amônio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 8,0) também foi avaliado para verificar sua possível interferência nos resultados de toxicidade. A concentração efetiva (EC₅₀) foi estimada como base nas experiências de resposta à concentração e expressa em porcentagem (%).

4.6. Determinação de PTD e PAF, em amostras de águas e rejeitos de salão de cabeleireiros, por CLAE/DAD e MS/MS

A determinação de PTD e PAF em amostras de água e de efluente de salão de cabeleireiros, foram realizadas por CLAE/DAD usando um cromatógrafo Shimadzu, modelo SCL-10AVP.

As amostras de água foram coletadas em 9 pontos diferentes da represa, e da estação de tratamento de água (após o processo de tratamento), na cidade de São José do Rio Preto – SP. Os pontos escolhidos para coleta das amostras de água da represa, foram os mesmos pontos que a companhia de água local utiliza para a coleta de amostras para análises e, para o controle da qualidade da água da represa (realizado mensalmente) que é utilizada para o abastecimento da cidade. A coleta das amostras de água desses pontos foram realizadas em companhia de um técnico da companhia de água local.

A captação de água na cidade de São José do Rio Preto – SP é feita em 2 diferentes pontos da represa, que fica situada no interior e, se estende até os arredores, da cidade. A represa é reponsável por cerca de 30% do abastecimento total diário de água da cidade e, o restante do abastecimento de água é realizado por poços perfurados em vários pontos da cidade.

Resumidamente, o tratamento de água na cidade de São José do Rio Preto – SP é realizado de forma convencional e semelhante a de inúmeras cidades brasileiras e do exterior.

Primeiramente a água coletada passa por uma rede que contém grades de contenção, para a remoção de sujeira e, de material particulado de grande volume, que esteja presente na água. Após passar por essas grades, a água é bombeada até um aerador para remoção de compostos orgânicos voláteis, que possam dar mal cheiro e gosto ruim à água. Posterior a etapa e aeração, é adicionado hipoclorito de sódio (que funciona como agente desinfetante), cloreto de férrico (que funciona como agente coagulante) e cal (para controle do pH) à água. A água é agitada, em baixa rotação por algumas horas, em tanques que contém hélices e pás, para a mistura dos produtos adicionados e para a coagulação da sujeira presente na água. Após a o processo de mistura e coagulação, a água é submetida a um processo de decantação, em vários decantadores, para remoção de grande parte da sujeira presente na água que coagulou. Posterior ao processo de decantação a água é filtrada em grandes filtros, que recheados por brita, cascalho, areia e carvão, para a limpeza e remoção do restante da sujeira que não ficou retida nos decantadores. Por fim, é adicionado novamente hipoclorito de sódio e

o pH da água é corrigido, conforme as normas estabelecidas pela legislação brasileira vigente, e água já limpa, tratada e pronta para o consumo é distribuída, por bombas, para diferentes pontos da cidade.

A amostra de efluente de salão de cabeleireiros foi coletada após o tingimento dos cabelos com tintura comercial, de coloração preta, que continha PTD e PAF em sua composição. Em um salão de cabeleireiros da cidade de Araraquara – SP, foi realizado o processo de tingimento dos cabelos. Para isso, o *kit* da tintura foi aplicada nos cabelos, previamente lavados com shampoo, onde permaneceu por um período de 45 minutos, conforme as instruções dadas pelo fabricante. Após o tempo de 45 minutos, foi realizado o tingimento dos cabelos, que posteriormente foram lavados com água até a remoção completa do excesso de corante que não ficou fixado nos cabelos. O resíduo produzido pelo processo de remoção e lavagem dos cabelos foi coletado, armazenado e levado para o laboratório para ser analisado.

As amostras de água e do efluente de salão de cabeleireiros foram coletadas em frascos de vidro adequadamente lavados de acordo com as diretrizes da Associação Americana de Saúde Pública (APHA) (Associação Americana de Saúde Pública, 1998) e da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos). As amostras foram protegidas da luz durante o transporte e armazenadas sob refrigeração a -5 °C, e analisadas até 48 horas após a coleta.

Para as análises, um volume de 300,0 mL das amostras de água (represa e da estação de tratamento) e 50,0 mL de amostra de efluente de salão de cabeleireiros foram tratados antes das análises.

As amostras coletadas foram centrifugadas a 12.000 rpm por 5 minutos, e os sobrenadantes foram coletados e filtrados à vácuo em filtros de 0,47 e 0,20 µm. Subsequentemente, as amostras foram acidificadas com ácido acético até pH 2,5 e eluídas em cartuchos de extração em fase sólida, de permuta catiônica Oasis MCX 6cc, da marca Waters.

Após eluição das amostras, os cartuchos foram lavados, com 2,0 mL de uma solução aquosa de 2,0% (v/v) de ácido acético, para a retirada de compostos que não ficaram retidos nos cartuchos. O conteúdo retido nos cartuchos foi recuperado com 4,0 mL de uma solução de hidróxido de amônio a 5,0% (v/v) em metanol. Os conteúdos recuperados foram secos por evaporação com nitrogênio. Posteriormente à extração, as amostras foram solubilizadas em 1,0 mL da mesma solução utilizada como fase móvel e injetadas diretamente no cromatografo.

A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna de fase reversa Phenomenex Kinetex C18 (150×4,6 mm, 5 µm, 100 Å), conectada a um protetor de coluna Phenomenex Kinetex C18 (1 cm × 4,6 mm, 5 µm, 100 Å).

As análises foram realizadas, em modo isocrático, nas condições ótimas de fase móvel composta de tampão acetato 0,01 mol L⁻¹ (pH 5,6):acetonitrila 98:2 (v/v), respectivamente, fluxo 1,0 mL min⁻¹, temperatura da coluna 40 °C, volume de injeção de 20,0 µL e comprimento de onda a 236 nm. Todas as análises foram feitas em triplicatas e as concentrações foram determinadas pelo método de adição padrão.

Com o objetivo de verificar e detectar a presença dos produtos de oxidação da PTD, do PAF e da reação entre ambos, a amostra de resíduo de corante capilar permanente também foi analisada, após o tratamento de amostra descrito anteriormente, por espectrometria de massas sob as mesmas condições de análise descritas na seção 4.4.

4.7. Estudo do comportamento eletroquímico e os mecanismos de transferência eletrônica da PTD e do PAF

O estudo do comportamento eletroquímico e quantificação em amostras de soro fetal bovino e urina artificial, estudo oxidativo da queratina e sua interação com os precursores de corantes capilares permanentes PTD e PAF, foram desenvolvidos durante o Estágio de Pesquisa no Exterior (Doutorado Sanduíche) – BEPE, pelo período de 10 meses, no Laboratório de Electroanálise e Corrosão, localizado no Instituto Pedro Nunes, ligado ao Departamento de Química - Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra (UC) – Coimbra - Portugal, sob a supervisão da Prof^a. Dr^a. Ana Maria Coelho Ferreira de Oliveira Brett.

Os experimentos de voltametria cíclica (CV) foram obtidos usando um incremento potencial de 2,0 mV em diferentes taxas de varredura. As medidas de voltametria de pulso diferencial (DPV) foram obtidas utilizando uma amplitude de pulso de 50,0 mV, largura de pulso de 100,0 ms, incremento de potencial de 2,0 mV e velocidade de varredura de 5,0 mV s⁻¹.

Para as medidas de voltametria de onda quadrada (SWW) foi utilizada uma amplitude de pulso de 50,0 mV, frequência 25,0 Hz e incremento de potencial 2,0 mV, correspondendo a uma velocidade de varredura efetiva de 50,0 mV s⁻¹.

As medições foram feitas usando um sistema convencional de três eletrodos, em uma célula eletroquímica de 2,0 mL (eDAQ, Europa). Foram utilizados um eletrodo de trabalho de carbono vítreo (GCE) ($d = 1,0$ mm), um contra-eletrodo de fio de platina (Pt) e um eletrodo de referência de Ag/AgCl ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$ KCl).

Antes de cada medição, o GCE foi lavado com etanol e água ultrapura. Depois, a superfície do GCE foi polida com spray de diamante (tamanho de partícula 3,0 mm) (Kemet, Reino Unido) e enxaguada novamente com água ultrapura. Após o pré-tratamento mecânico, o GCE foi colocado no eletrólito de suporte do tampão apropriado e três voltamogramas de pulso diferencial foram registrados na faixa de 0,0 a 1,5 V, a uma velocidade de varredura de $5,0 \text{ mV s}^{-1}$, até a obtenção de um sinal estável. Este procedimento foi repetido antes de cada medição eletroquímica até a estabilização do sinal.

4.8. Determinação eletroquímica da PTD e do PAF em fluidos biológicos

A PTD e o PAF foram quantificados em amostras de fluidos biológicos de soro fetal bovino (simulando o plasma sanguíneo humano) e de urina artificial (simulando a urina humana), por adição e recuperação. Uma alíquota de 250,0 μL de soro fetal bovino (Sigma-Aldrich) foi diluída para 0,5 mL com água ultrapura e depois fortificada com $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de PTD e de PAF.

A amostra de urina artificial foi preparada em laboratório pela solubilização de 0,29 g NaCl, 0,16 g KCl, 0,16 g $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,32 g $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 0,14 g KH_2PO_4 , 0,10 g NH_4Cl e 2,50 g uréia em 100,0 mL de água ultrapura, de acordo com o procedimento descrito por Hudari e colaboradores (148). Posteriormente, a amostra também foi fortificada com $10,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de PTD e de PAF.

Para a análise eletroquímica, 60,0 μL das amostras fortificadas com PTD e PAF de soro fetal bovino e de urina artificial, sem qualquer tratamento prévio, foram adicionadas em uma célula eletroquímica contendo 1,0 mL de eletrólito suporte de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 7,0, levando a uma concentração final de PTD e de PAF de $6,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. Por fim, a quantificação foi realizada por DPV, na faixa de potencial de 0,0 a 0,5 V. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

4.9. Comportamento de oxidação eletroquímica da queratina humana adsorvida no GCE (biossensor eletroquímico de queratina)

O comportamento eletroquímico oxidativo da queratina humana foi investigado na faixa de pH 1,0 - 12,0 por DPV. Para isso, um filme de multicamadas espesso de queratina humana nativa foi adsorvido na superfície do GCE, depositando três gotas de 5,0 μL de uma solução de proteína de queratina humana recombinante a 0,01 mg mL^{-1} , a fim de simular o fio de cabelo humano. Posterior à adição de cada gota da solução de queratina, a superfície do GCE foi seca sob um fluxo constante de nitrogênio.

Após o filme de multicamadas espessa de queratina humana estar completamente seco e adsorvido na superfície do eletrodo, o GCE foi imerso na célula eletroquímica, contendo apenas o eletrólito de suporte do tampão apropriado por 5 minutos, para permitir a hidratação da queratina humana nativa adsorvida. Somente após a hidratação da queratina adsorvida na superfície do GCE as medições de DPV foram realizadas.

As medições da espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) foram feitas aplicando frequências na faixa de 60,0 kHz a 0,1 Hz, com sete valores de frequência por década, e um distúrbio sinusoidal do quadrado médio da raiz (r.m.s.) com amplitude de 10,0 mV. As medições do EIS foram realizadas com potencial de ponto médio, $E_{\text{ap}} = + 0,25 \text{ V}$ (potencial definido por experimentos de voltametria cíclica), em $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, a uma concentração de $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, em eletrólito suporte de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} , a pH 8,0. Por fim, os espectros de EIS foram analisados pela instalação de um circuito elétrico equivalente do tipo Randles, utilizando o software ZView (Scribner Associates, EUA).

4.10. Estudo eletroquímico da queratina humana desnaturada adsorvida no GCE

O comportamento eletroquímico oxidativo do filme de multicamadas espesso de queratina humana desnaturada, adsorvida na superfície do biossensor eletroquímico de queratina, foi investigado por DPV. A película de multicamadas espessa de queratina humana foi preparada de acordo com o procedimento descrito na Seção 4.9. Posteriormente, o eletrodo foi incubado em 500,0 μL de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} a pH 8,0, e em diferentes soluções de agentes desnaturantes de uréia a 6,0 mol L^{-1} , SDS a 33,3 mmol L^{-1} , e o agente redutor TCEP a 10,0 mmol L^{-1} , durante 30, 60, 90 e 120 minutos. A concentração dos agentes desnaturantes e

redutores foram escolhidas de acordo com os protocolos de procedimentos eletroforéticos amplamente aplicados para desestabilizar e desdobrar estruturas proteicas. (149)

Após o período de incubação, o biossensor eletroquímico de queratina com o filme múltiplo espesso de queratina humana desnaturada adsorvida, foi retirado da solução e lavado com água deionizada, para remover o excesso de solução desnaturante. Após, o biossensor foi imerso na célula eletroquímica contendo apenas eletrólito suporte de tampão de fosfato 0,1 mol L⁻¹ a pH 8,0, para as medições de DPV.

Os voltamogramas de controle de pulso diferencial foram obtidos para garantir que os sinais obtidos fossem exclusivamente devidos aos efeitos dos agentes desnaturantes ou redutores na estrutura da queratina. Para obter os voltamogramas de controle de pulso diferencial, o biossensor eletroquímico de queratina foi incubado em cada agente desnaturante e redutor pelos mesmos períodos de tempo e condições experimentais descritas anteriormente. Além disso, as medidas de controle de DPV do filme multicamadas espesso de queratina humana nativa, adsorvido no biossensor eletroquímico de queratina, incubado apenas em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ a pH 8,0, também foram realizadas nos mesmos períodos de tempo e de maneira semelhante à descrita anteriormente.

4.11. Estudo eletroquímico da interação da queratina capilar humana com a PTD e o PAF no biossensor eletroquímico de queratina

O comportamento eletroquímico da interação entre o filme multicamadas espesso de queratina humana, adsorvido na superfície do biossensor eletroquímico de queratina, com os precursores PTD, PAF e ambos juntos foram investigados por DPV. Para isso, o filme multicamadas espesso de queratina humana foi preparado de acordo com o procedimento descrito na Seção 4.9. Posteriormente, o biossensor de queratina foi imerso e incubado em soluções de $2,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ dos precursores separados e depois juntos na mesma concentração e na proporção de (1:1), em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ a pH 8,0, por 30, 60, 90 e 120 minutos.

Após o período de incubação, o eletrodo foi removido da solução e lavado com água ultrapura para remover moléculas de precursores que não interagiram com a queratina. Posteriormente, o eletrodo foi colocado na célula eletroquímica, contendo apenas 500,0 µL do eletrólito de suporte de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ a pH 8,0, onde foram realizadas medições de DPV.

As experiências de controle foram realizadas e o filme multicamadas espesso de queratina humana, adsorvido na superfície do GCE, também foi incubado em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ a pH 8,0, nas mesmas condições e pelos mesmos períodos de tempo.

4.12. Aquisição e apresentação de dados eletroquímicos

Para melhor identificação e visualização dos picos de oxidação e redução, os voltamogramas de pulso diferencial apresentados foram subtraídos e corrigidos em relação à linha de base, utilizando a média móvel do procedimento, com uma janela de 5,0 mV, incluída no software utilizado (IviumSoft). No entanto, esse tratamento matemático em alguns casos reduz o pico de corrente máxima em até 10%, em comparação com a curva não tratada (66). Portanto, devido a essa redução dos valores atuais, esse tratamento matemático foi aplicado apenas para uma melhor apresentação e identificação dos picos nos voltamogramas originais, e todas as correntes de pico apresentadas foram medidas a partir dos voltamogramas originais não tratados.

4.13. Construção do suporte magnético para eletrodo impresso

O suporte magnético para eletrodo impresso foi desenvolvido em uma impressora de três dimensões, da marca 3D Cloner, modelo ST, com o auxílio do grupo de pesquisa do Prof. Dr. Paulo Clairmont Feitosa de Lima Gomes, Docente do Departamento de Química Analítica, do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) de Araraquara - SP.

O suporte magnético foi projetado com o auxílio do programa computacional FreeCAD e posteriormente interfaceado com a impressora 3D para impressão da peça, conforme mostrado na Figura 1. A impressão do suporte foi realizada usando filamento polimérico de ácido polilático (PLA) da marca Esun. Posteriormente foi fixado um ímã de neodímio de 0,4 cm de diâmetro e 0,3 cm de espessura na região circular demarcada (Figura 15).

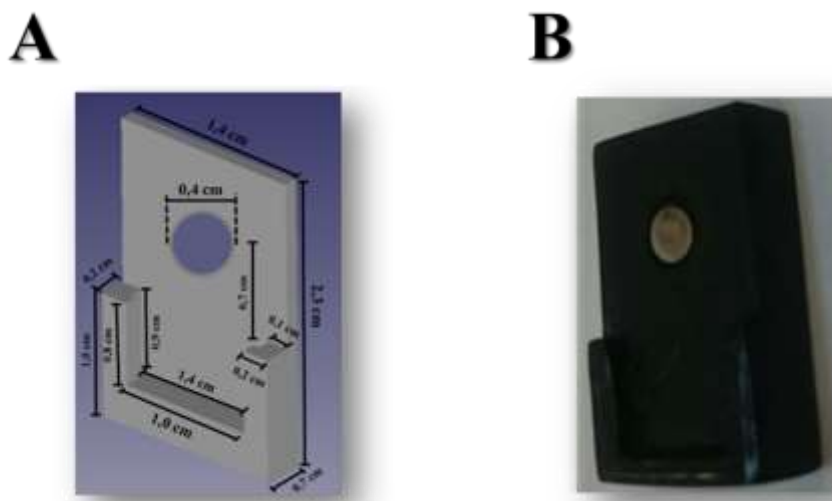


Figura 15. Desenho do suporte magnético e suporte magnético impresso em impressora 3D.

Fonte: Autor.

4.14. Funcionalização das nanopartículas magnéticas (NPM) de grupos ácido carboxílicos com L-cisteína

As NPM foram adquiridas, já funcionalizadas com grupos ácido carboxílico, da Dynabeads em uma suspensão aquosa de concentração de $10,0 \text{ mg mL}^{-1}$. Posteriormente, as NPM foram funcionalizadas com L-cisteína pela adaptação da metodologia descrita por Rehana e colaboradores (150), em uma proporção de concentração de (1:5) de nanopartículas : solução de L-cisteína. Para isso, $500,0 \text{ }\mu\text{L}$ da solução de nanopartículas modificadas com grupos ácido carboxílico (NPM-AC) com concentração de $10,0 \text{ mg mL}^{-1}$ foram colocadas em um eppendorf, onde posteriormente foram adicionados $500,0 \text{ }\mu\text{L}$ de uma solução de $50,0 \text{ mg mL}^{-1}$ de L-cisteína. Após a adição da solução de L-cisteína, a mistura foi submetida à homogeneização em um homogeneizador rotacional de amostras sob baixa rotação por 48 horas. Após 48 horas de reação, as NPM foram lavadas duas vezes com água ultrapura para retirada do excesso de L-cisteína que não reagiu com os grupos ácido carboxílico, obtendo assim nanopartículas magnéticas funcionalizadas com grupos ácido carboxílico e L-cisteína (NPM-AC-LC). Por fim, as NPM-AC-LC foram suspensas em água ultrapura e utilizadas nas análises.

4.15. Caracterização das NPM-AC-LC

As NPM-AC-LC foram caracterizadas por espectroscopia de infravermelho, por meio de reflexão atenuada (ATR), utilizando um espectrômetro Bruker, modelo VERTEX, com

transformada de Fourier equipado com detector tipo DLaTGS, no intervalo de número de onda de 400 a 4000 cm^{-1} . A comprovação do sucesso da funcionalização das nanopartículas magnéticas com L-cisteína foi realizada comparando-se os espectros de infravermelho, obtidos das NPM-AC-LC, com espectros de IR obtidos para as NPM-AC. Para as análises de IR, as NPM foram secas em dessecador e analisadas diretamente.

Medidas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas em um microscópio eletrônico de varredura de canhão de emissão de elétrons por efeito de campo (MEV-FEG) da marca Jeol, modelo JSM-7500F. Espectros de energia dispersiva de raios X (EDX) das NPM-AC-LC foram obtidos a fim de analisar as espécies químicas presentes. Análises de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e microscopia eletrônica de alta resolução (HR-TEM) foram realizadas em um microscópio eletrônico de transmissão da marca PHILIPS, modelo CM 200 SUPER TWIN.

Análises de difração de raios X foram realizadas em difratômetro da marca RIGaku-Rotalex, modelo Dmax/2500PC, com radiação $\text{Cu K}\alpha$ (1,5406 Å) e monocromador de grafite. O difratograma obtido foi comparado com o padrão de difração reportado na ficha catalográfica do ICSD (Inorganic Crystal Structure Database).

4.16. Comportamento eletroquímico da PTD e do PAF com as NPM-AC-LC

Medidas de voltametria cíclica foram obtidas, com velocidade de varredura de 50,0 mV s^{-1} , em uma cela eletroquímica de 10,0 mL, em um sistema contendo o eletrodo impresso, da marca DropSens, modelo DS 110, acoplado ao suporte magnético e conectado por um cabo adaptador para eletrodo impresso a um potenciostato/galvanostato da marca Metrohm AUTOLAB, modelo PGSTAT 30, acoplado a um microcomputador. O software GPES foi utilizado para obtenção, interpretação e armazenamento dos dados eletroquímicos.

As NPM funcionalizadas foram depositadas sobre o eletrodo de trabalho através de uma ponteira de pipetador automático de plástico, e mantidas por atração magnética do ímã de neodímio fixado no suporte, conforme é mostrado na Figura 16. Após a deposição das NPM, o eletrodo foi submerso em solução de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de PTD e de PAF em 10,0 mL de eletrólito suporte tampão BR a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,0.

Após o tempo de deposição controlado do analito na superfície do eletrodo modificado com as NPM, iniciou-se o registro das curvas de oxidação eletroquímica, sob fluxo de nitrogênio de 15 minutos.

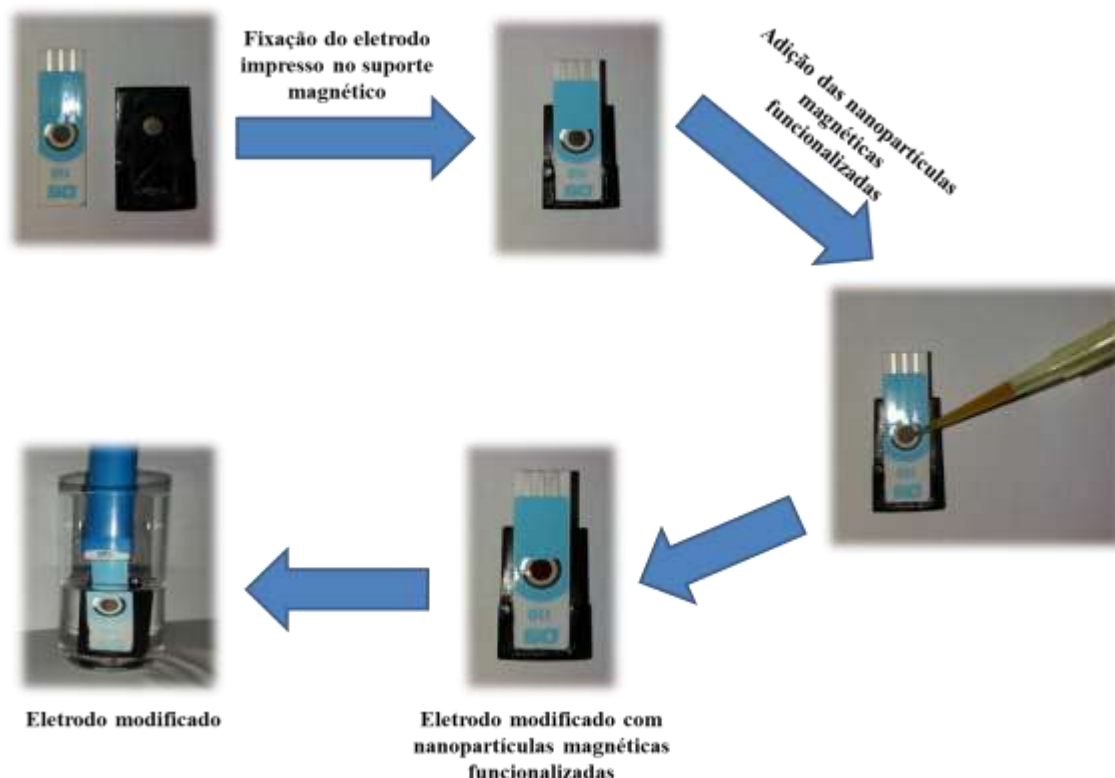


Figura 16. Procedimento de fixação do eletrodo de carbono impresso no suporte magnético, deposição das NPM-AC-LC sobre o eletrodo e montagem da célula eletroquímica.

Fonte: Autor.

4.17. Otimização dos parâmetros eletroquímicos

O efeito do tempo de acúmulo espontâneo dos analitos sobre a superfície do eletrodo modificado com as NPM-AC e NPM-AC-LC foi investigado por CV, no intervalo de tempo de 1 a 5 minutos de exposição dos analitos, em uma concentração de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de PTD e PAF, em 10,0 mL de eletrólito suporte tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 4,0. Foi avaliada também a influência da agitação e sem agitação do sistema usando uma barra de agitação magnética.

O efeito da concentração das NPM-AC-LC depositadas na superfície do eletrodo impresso foi investigado registrando-se voltamogramas cíclicos, em concentrações de NPM-AC-LC que variaram de 0,5 a $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$.

O efeito do volume de NPM-AC-LC depositadas na superfície do eletrodo impresso foi investigado registrando-se voltamogramas cíclicos em volumes que variaram de 10,0 a 70,0 μL . Todos os experimentos nestas etapas foram feitos em triplicata.

5. Resultados e discussão

5.1. Oxidação da PTD, do PAF e a reação entre ambos

5.1.1. Monitoramento da oxidação da PTD por espectrometria de massas (MS/MS)

A oxidação da PTD foi monitorada por espectrometria de massas em tampão amônio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 8,0, na presença e na ausência de peróxido de hidrogênio a 1,0% (v/v). A Figura 17 ilustra o espectro de massas obtido para $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ de PTD em tampão amônio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 8,0, após 3 horas de reação na ausência de peróxido de hidrogênio (oxigênio dissolvido).

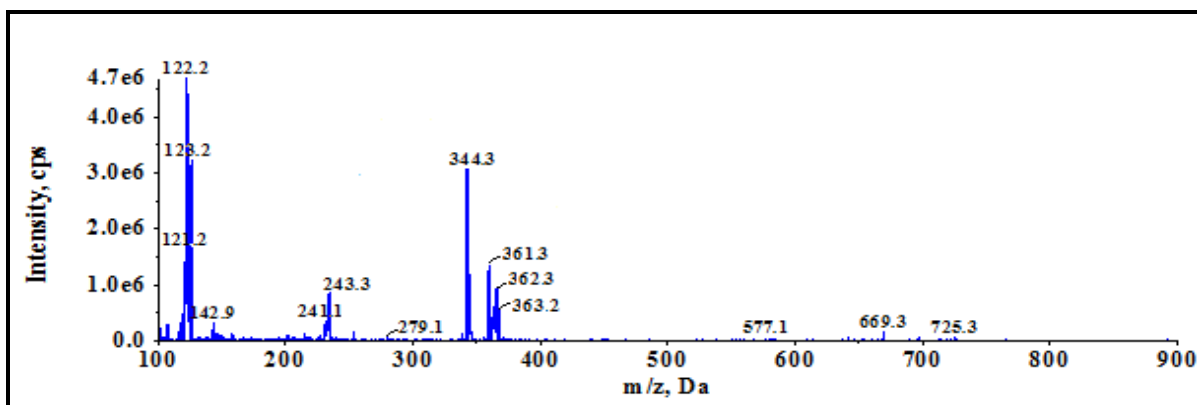


Figura 17. Espectro de massas obtido para $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ de PTD em tampão amônio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 8,0, após 3 horas de reação na ausência de peróxido de hidrogênio.

Fonte: Autor.

O espectro de massas obtido (Figura 17) apresentou íons de razão *massa/carga* (m/z) 123,2 referente a PTD, e íons de m/z em 121,2 e 122,2 referentes ao derivado da quinonadiimina e do intermediário radical semi-quinonadiimina, respectivamente. Experimentos de MS/MS dos íons com m/z 123,2; 122,2 e 121,2 foram realizados. O espectro de íons do fragmento de m/z 123,2 mostrou como íons do fragmento principal m/z 108,2, referente à perda de um grupo metila ($\cdot\text{CH}_3$, 15 Da); m/z 106,0, referente à perda de (NH_3 , 17 Da) e m/z 81,0 referente à perda de ($\text{C}_2\text{H}_3\text{N}_1$, 42 Da) (Figura 1AP, disponível no apêndice). O espectro de íons do fragmento de m/z 122,2 mostrou como íons do fragmento principal m/z 107,0, referente à perda de um grupo metila ($\cdot\text{CH}_3$, 15 Da); m/z 105,4, referente à perda de

(NH₃, 17 Da) e m/z 91,7 referente à perda de ($\cdot$ C₁H₃N₁, 29 Da) (Figura 2AP, disponível no apêndice).

O espectro de íons do fragmento de m/z 121,2 mostrou como íons do fragmento principal m/z 106,1, referente à perda de um grupo metila ($\cdot$ CH₃, 15 Da); m/z 93,2, referente à perda de (C₁H₂N₁, 28 Da) e m/z 67,1 referente à perda de ($\cdot$ C₃H₄N₁, 54 Da) (Figura 3AP, disponível no apêndice).

Entretanto, a presença dos íons m/z 241,2 e 243,2 foi detectada e pode ser atribuída a produtos derivados da difenilamina e sua forma oxidada, respectivamente. Experimentos MS/MS de íons m/z 243,2 e 241,2 também foram realizados, entretanto o espectro de m/z 241,2 não foi obtido devido à sua baixa intensidade. O espectro de íons do fragmento de m/z 243,2 mostrou como íons do fragmento principal m/z 228,3, referente à perda de um grupo metila ($\cdot$ CH₃, 15 Da); m/z 211,2, referente à perda de (NH₃, 17 Da) e m/z 122,2 referente à perda do derivado quinonadiimina ($\cdot$ C₇H₉N₂, 121 Da) (Figura 4AP, disponível no apêndice).

Além disso, foi observado um pico do íon com m/z 361,3, que pode ser atribuído a um produto similar à BB (12), contendo três substituintes metila, produzido pela polimerização da PTD. O pico detectado com m/z 344,3 foi atribuído à molécula derivada da BB após perder 17,0 Da, referente à eliminação de NH₃. Essa confirmação foi obtida após o experimento de íon precursor e de íon fragmento de m/z 361,3 (Figuras 5AP e 6AP, respectivamente, disponível no apêndice). O espectro de íons precursores mostrou como íon principal m/z 361,3, confirmando m/z 344,3 como um íon de fragmento, ao invés de uma detecção de produto. O espectro MS/MS apresentou como fragmento os íons m/z 346, referente à perda de ($\cdot$ CH₃, 15 Da), m/z 344, referente à perda de NH₃, e m/z 241 referente à perda de ($\cdot$ C₇H₈N₂, 120 Da). Os íons m/z 362,2 e 363,3 são atribuídos a um radical trímero e o trímero formados, respectivamente, antes de formar os outros derivados da BB. Estes experimentos confirmam a proposta de estruturas para os produtos de oxidação detectados e estão resumidos na Tabela 5 (páginas 106 e 107).

O espectro de massas obtido para a solução padrão de PTD na presença de peróxido de hidrogênio a 0,1% (v/v) após 3 horas de reação, Figura 18, apresentaram os mesmos produtos, exceto o derivado do radical semi-quinonadiimina (m/z 122,2), a forma oxidada de difenilamina (m/z 241,2), o radical trímero (m/z 362,2) e o trímero (363,3). Estes resultados comprovaram uma reação de oxidação mais rápida e efetiva na presença de peróxido de hidrogênio em comparação ao oxigênio dissolvido.

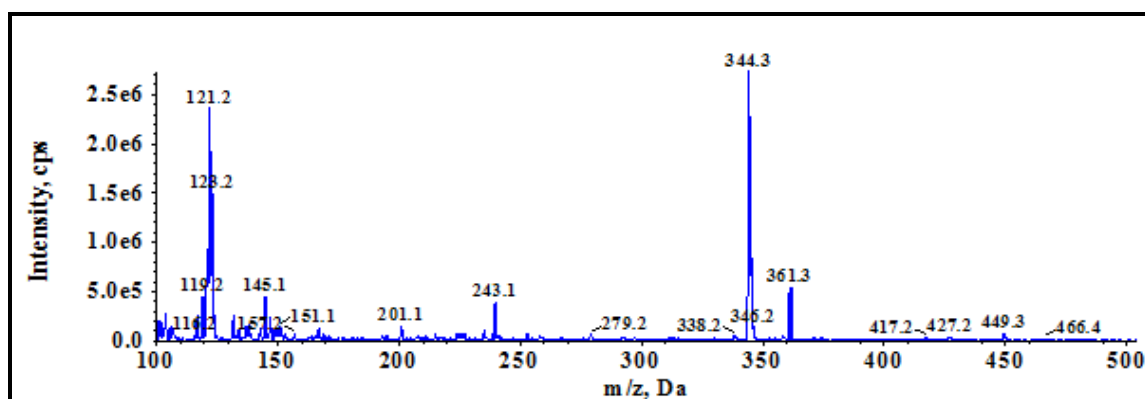


Figura 18. Espectro de massas obtido para 10,0 mg L⁻¹ de PTD em tampão amônio 0,1 mol L⁻¹ a pH 8,0, após 3 horas de reação, na presença de peróxido de hidrogênio a 0,1% (v/v).

Fonte: Autor.

A CCD foi realizada para a separação dos principais produtos formados. Após 3 horas de reação na presença e na ausência de peróxido de hidrogênio, duas manchas de compostos com coloração castanho claro e roxa com ($R_f \times 100$) de 16 e 29, respectivamente, foram observadas nas placas de CCD. Os produtos foram extraídos e analisados conforme descrito anteriormente nas seções 4.3 e 4.4, respectivamente.

O composto castanho escuro, ($R_f \times 100$) de 16, foi identificado como sendo uma quantidade restante de PTD que ainda não foi totalmente oxidada. O mesmo resultado foi observado no experimento com o padrão de PTD aplicado nas mesmas condições. O espectro de massas obtido para o composto castanho escuro, Figura 19, apresentaram os íons m/z 123,2, referente a PTD, e m/z 122,2, referente ao radical semi-quinonadiimina.

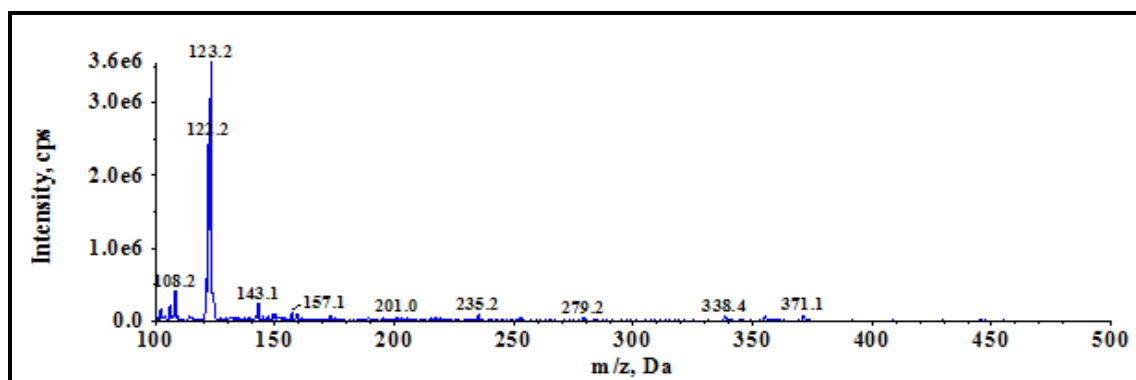


Figura 19. Espectro de massas obtido para o produto de coloração castanho escuro.

Fonte: Autor.

O espectro de massas obtido para o composto de coloração roxa, Figura 20, apresentou os íons m/z 361,3; referente ao derivado da BB, e m/z 344,3 como um íon fragmento da molécula do derivado da BB, que corresponde à perda de (NH_3 , 17 Da), como descrito anteriormente.

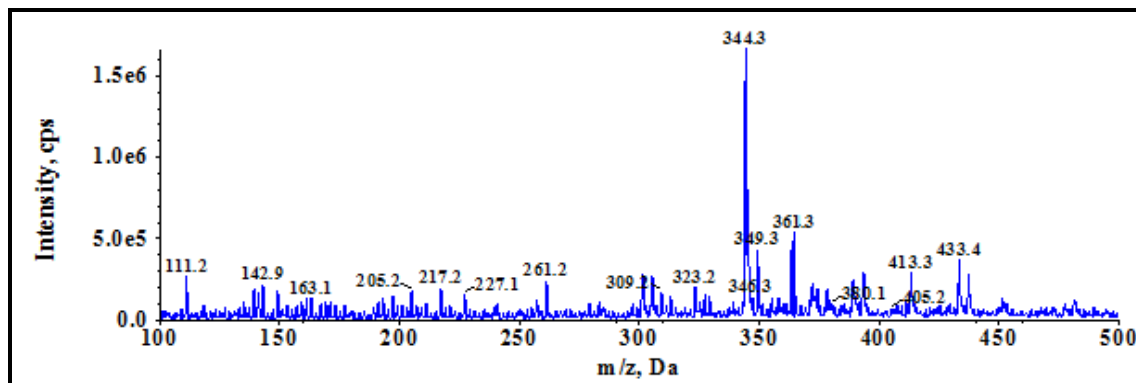
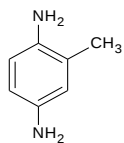
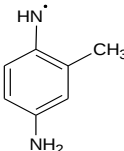
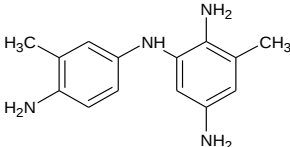
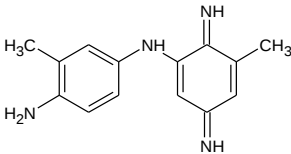
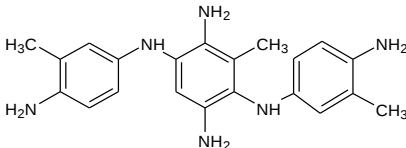
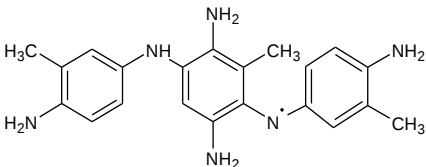
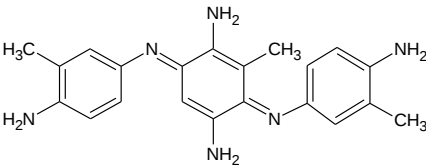


Figura 20. Espectro de massas obtido para o produto de coloração roxo.

Fonte: Autor.

Tabela 5. Estruturas propostas dos compostos detectados por MS/MS, durante a oxidação da PTD, em tampão amônio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 8,0, na presença e na ausência de peróxido de hidrogênio.

Composto	Massa Molecular (g mol^{-1})	Experimental (m/z) [M+H] ⁺	Íon Fragmento (m/z)
PTD			
	122,2	123,2	108,2 106,0 81,0
Derivado do radical Semi-quinonadiimina			
	121,2	122,2	107,0 105,4 91,9
Derivado da Difenilamina			
	242,3	243,2	228,3 211,2 122,2

Derivado da Difenilamina (forma oxidada)			
	240,2	241,2	-
Trímero			
	362,2	363,2	-
Radical Trímero			
	361,2	362,2	-
Derivado Base de Bandrowski			
	360,5	361,3	346,1 344,3 241,2

Fonte: Autor.

5.1.2. Monitoramento da oxidação da PTD por espectrofotometria UV-VIS

A Figura 21 apresenta os espectros de absorção UV-Vis obtidos para 10,0 mg L⁻¹ de PTD, em tampão amônio 0,1 mol L⁻¹ a pH 8,0, em atmosfera de oxigênio dissolvido (A) e 0,1% (v/v) de peróxido de hidrogênio (B) no período de 3 horas.

Inicialmente, na Figura 21A, a PTD apresentou duas bandas de absorção nos comprimentos de onda de 250 nm e 309 nm. Ambas as bandas diminuem em função do tempo concomitantemente com a formação de novas bandas em torno de 263 nm, referente a formação de algum intermediário de reação ao qual não foi possível identificar (provavelmente o derivado do radical semiquinonadiimina ou o derivado da difenilamina (dímero)), e bandas em 371 e 510 nm, referentes a formação do derivado da BB. Estes resultados são indicativos de que a PTD é facilmente oxidada e pouco estável em tampão amônio, que é comumente utilizado no processo de tingimento dos cabelos.

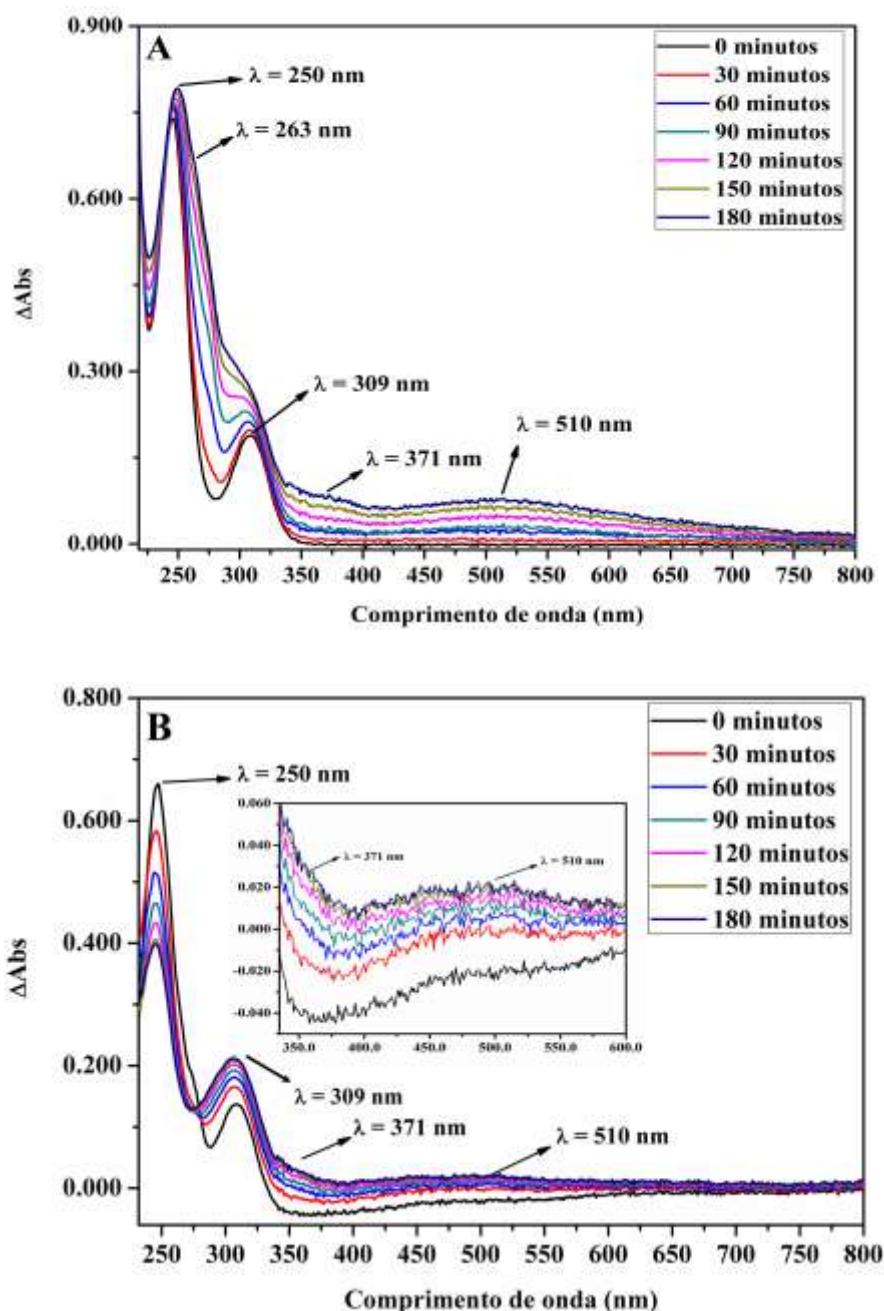


Figura 21. Espectros de absorção UV-Vis em $10,0\text{ mg L}^{-1}$ de PTD em $0,1\text{ mol L}^{-1}$ de tampão amônio a pH 8,0: (A) oxigênio dissolvido e (B) peróxido de hidrogênio 0,1% (v/v). Inserção: Espectro de absorção UV-Vis aumentado na faixa de 350 a 600 nm (B).

Fonte: Autor.

A Figura 21B exibiu inicialmente as mesmas bandas em 250 e 309 nm. No entanto, quando a PTD foi submetida a 1,0% (v/v) de peróxido de hidrogênio, a banda em 250 nm diminuiu com o tempo, concomitantemente com o aumento da banda em 309 nm e a formação das bandas em 371 e 510 nm, que estão associados à formação do derivado da BB.

Isso pode ser uma indicação de que a cinética da reação de oxidação é mais rápida na presença de peróxido de hidrogênio, uma vez que há um maior consumo da PTD e dos intermediários da reação. Experiências repetidas tanto na presença como na ausência de luz não mostraram diferenças significativas no comportamento oxidativo e nos espectros UV-Vis da PTD (dados não mostrados), sugerindo que a reação química não é influenciada por fotólise.

A Figura 22 mostra os espectros de UV-Vis obtidos em metanol para os produtos de coloração castanho escuro e roxa separados por CCD. Os espectros apresentaram efeito batocrômico, uma vez que foram obtidos em um solvente diferente, com diferente polaridade, dos espectros obtidos nas Figuras 21A e 21B. Porém, os espectros mesmo com o efeito batocrômico apresentaram bandas muito próximas aos produtos observados nos espectros das Figuras 21A e 21B, relacionando às bandas obtidas com a formação dos produtos propostos.

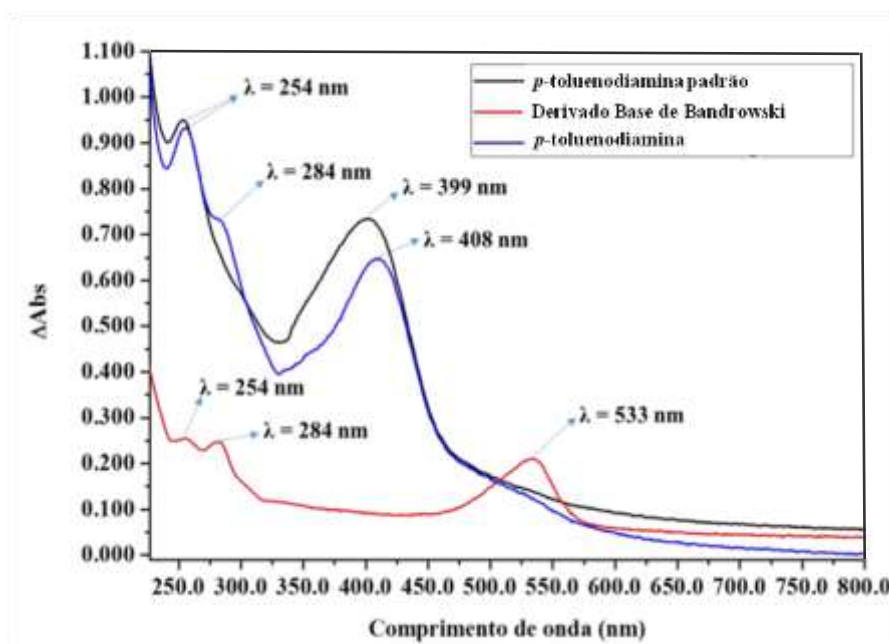


Figura 22. Espectros de absorção UV-Vis, obtidos em metanol, para o padrão de PTD e os produtos formados pela oxidação da PTD em tampão amônio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 8,0 isolados por CCD.

Fonte: Autor.

5.1.3. Caracterização dos produtos de oxidação da PTD por espectrometria de infravermelho (IR)

O espectro de IR obtido para o produto de cor castanha escura, Figura 23, apresentou duas bandas de intensidade fraca, características de estiramento de ligação de amins

primárias N-H em aproximadamente 3207 e 3359 cm^{-1} , com o aparecimento de um ombro pequeno em 3450 cm^{-1} , característico de amins primárias. Também é possível observar duas bandas de intensidade média, de estiramento de ligação C-H, característico de carbono alifático, mais precisamente de um carbono primário de metila em 2853 e 2920 cm^{-1} . Outras bandas de intensidade fraca em 1406, 1504, 1631 e 1657 cm^{-1} , características de estiramento de ligações C=C de carbono aromático foram observadas. Uma banda de intensidade média em 1213 cm^{-1} , característica de estiramento de ligação C-N, e outra banda de alta intensidade em 742 cm^{-1} , característica da vibração de ligações N-H de amins primárias e secundárias também foram observadas. Finalmente, foi observada uma banda de intensidade média em 668 cm^{-1} , característica do estiramento da ligação C-Cl do solvente usado para a solubilização (clorofórmio) (151). O espectro de IR obtido para o padrão PTD (dados não mostrados), extraído da placa de sílica, mostrou comportamento similar. Portanto, estes resultados corroboram que a estrutura proposta para o produto de cor castanho escuro seja a PTD.

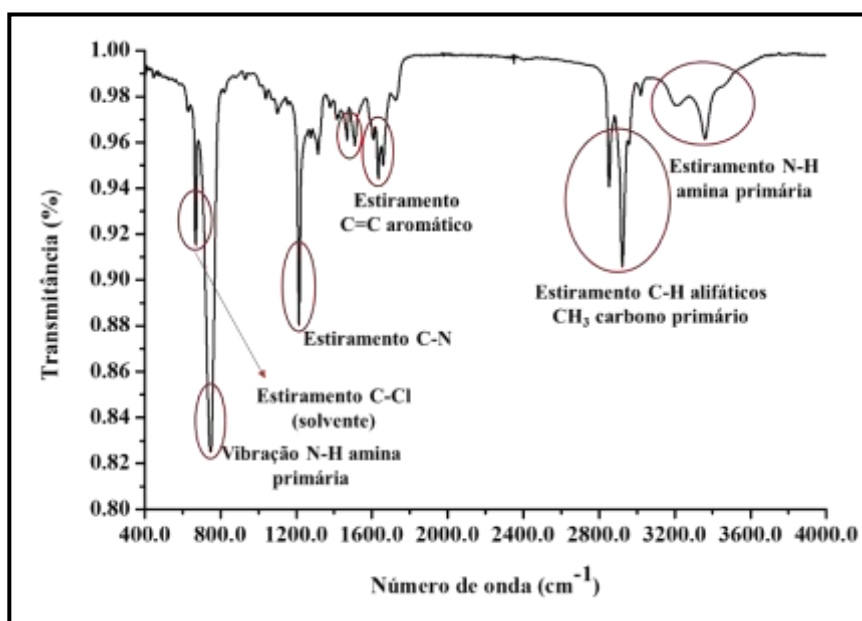


Figura 23. Espectro de IR, obtido em clorofórmio, para o produto de coloração castanho escuro.

Fonte: Autor.

No espectro de IR obtido para o produto de coloração roxa, Figura 24, foi observado duas bandas de intensidade fraca, características de estiramento de ligação N-H de amins primárias, em aproximadamente 3198 e 3367 cm^{-1} , com o aparecimento de um pequeno ombro em 3458 cm^{-1} , característico de amins primárias e secundárias. Duas bandas de

intensidade média, características de estiramento de ligação C-H de carbono alifático, mais precisamente de carbono primário de grupamento metila, em 2852 e 2924 cm^{-1} . Outras bandas de intensidade fraca, características de estiramento de ligações C=C de carbono aromático em 1412, 1419, 1621 e 1640 cm^{-1} , foram observadas. Uma banda de intensidade baixa foi observada em 1658 cm^{-1} , característica de estiramento de ligação C=N de imina. Uma banda de intensidade média em 1217 cm^{-1} , característica de estiramento de ligação C-N, e outra banda de alta intensidade em 739 cm^{-1} , característica da vibração da ligação N-H de amins primárias e secundárias. Finalmente, uma banda de intensidade média em 668 cm^{-1} , característica do estiramento da ligação C-Cl do solvente usado para a solubilização (clorofórmio) (151). Estes resultados confirmam que a estrutura proposta para o produto de cor roxa é o derivado da BB.

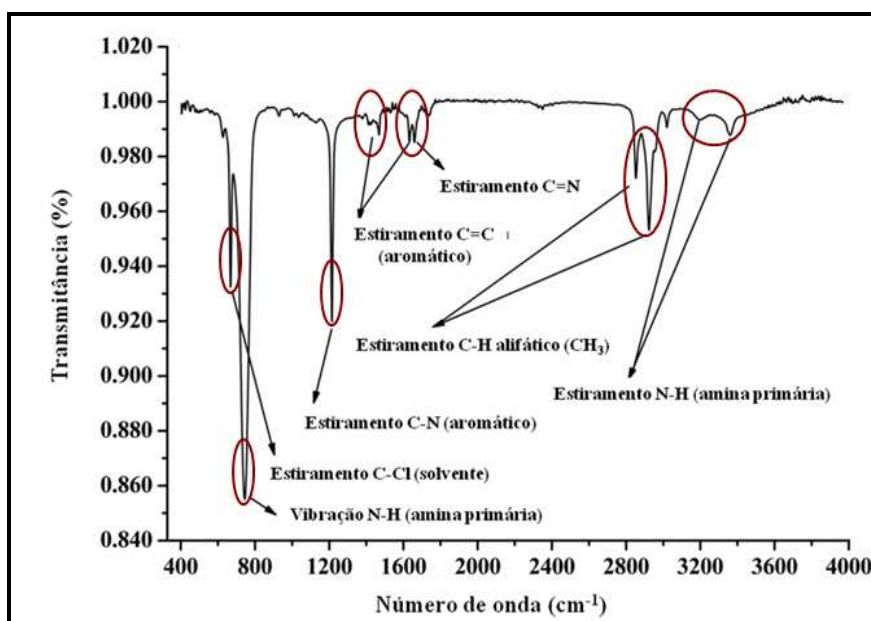


Figura 24. Espectro de IR, obtido em clorofórmio, para o produto de coloração roxa.

Fonte: Autor.

5.1.4. Caracterização dos produtos de oxidação da PTD por ^1H -RMN

O espectro de ^1H -RMN obtido para o produto de coloração castanho escuro, Figura 25, mostra na região do espectro, próximo a 2,1 ppm, a presença de um pico singlete de intensidade média, característico de grupamento metil ligado a anel aromático, que integrado refere-se a 3 hidrogênios (inserção na Figura 25). Também foram observados picos na região entre 7,7 e 8,0 ppm, referentes a hidrogênios ligados a anel aromático, marcados como "HA", "HB" e "HC" na molécula de PTD inserida no espectro de ^1H -RMN (Figura 25). Como o pico

dubleto está em torno de 7,9 ppm, ele pode ser atribuído ao hidrogênio "HA", referindo-se a um acoplamento em orto com o hidrogênio "HC", uma vez que ele aparece um pouco mais deslocado em relação aos outros picos. O pico dubleto na região de aproximadamente 7,75 ppm pode ser atribuído ao hidrogênio "HB", que está acoplado em meta com o hidrogênio "HC", estando menos deslocado em relação aos demais picos. Finalmente, dois picos dubletos próximos a 7,85 ppm, atribuídos ao hidrogênio "HC", referem-se a um acoplamento em orto com o hidrogênio "HA" e um acoplamento em meta com o hidrogênio "HB" (151). O espectro de ^1H -RMN obtido para o padrão de PTD (dados não mostrados) extraído da placa de sílica mostrou conformação semelhante. Portanto, estes resultados confirmam que a estrutura proposta para o produto de cor castanho escuro é a PTD.

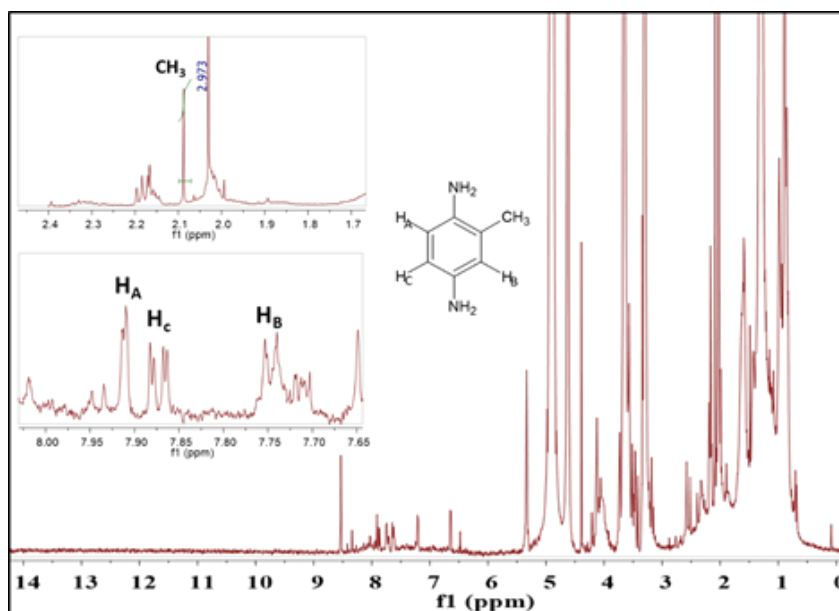


Figura 25. Espectro de ^1H -RMN obtido para o produto de coloração castanho escuro em metanol deuterado. Inserção: Espectro de ^1H -RMN aumentado na faixa de 7,6 a 8,0 ppm, na faixa de 1,7 a 2,4 ppm e estrutura molecular da PTD.

Fonte: Autor.

O espectro de ^1H -RMN obtido para o produto de coloração roxa, Figura 26, mostra na região do espectro, em 1,9 ppm, a presença de um pico singlete de intensidade forte, muito característico de grupo metil ligado a anel aromático, que integrado, refere-se a 9 hidrogênios, e pode assim ser atribuído aos 3 grupos metilas da molécula do derivado da BB (inserção na Figura 26). Também são observados picos na região entre 7,7 e 8,0 ppm referentes a hidrogênios ligados a anel aromático, marcados como "HA", "HB", "HC" e "HD" na molécula

do derivado da BB inserido no espectro de ^1H -RMN (Figura 26). Como o pico dubleto está em torno de 7,9 ppm, ele pode ser atribuído ao hidrogênio "HA", referindo-se a um acoplamento orto com o hidrogênio "HC", uma vez que ele parece um pouco mais deslocado em relação aos outros picos. O pico dubleto, na região de aproximadamente 7,75 ppm, pode ser atribuído ao hidrogênio "HB", que está acoplado em meta com o hidrogênio "HC", estando menos deslocado em relação aos demais picos. Dois picos dubletos, próximos a 7,9 ppm, atribuídos ao hidrogênio "HC", referem-se a um acoplamento em orto com o hidrogênio "HA" e um acoplamento em meta com o hidrogênio "HB". Finalmente, um singlete perto de 7,5 ppm referente ao hidrogênio "HD" (151). Portanto, estes resultados confirmam que a estrutura proposta para o produto de cor roxa é o derivado da BB.

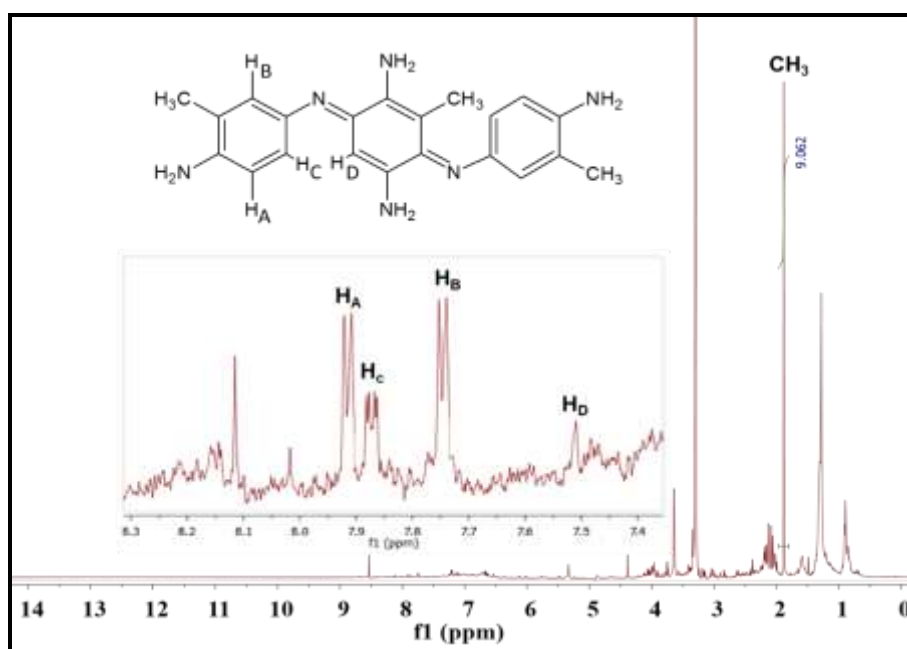


Figura 26. Espectro de ^1H -RMN obtido para o produto de coloração roxa em metanol deuterado. Inserção: Espectro de ^1H -RMN aumentado na faixa de 7,4 a 8,3 ppm e estrutura molecular do derivado da BB.

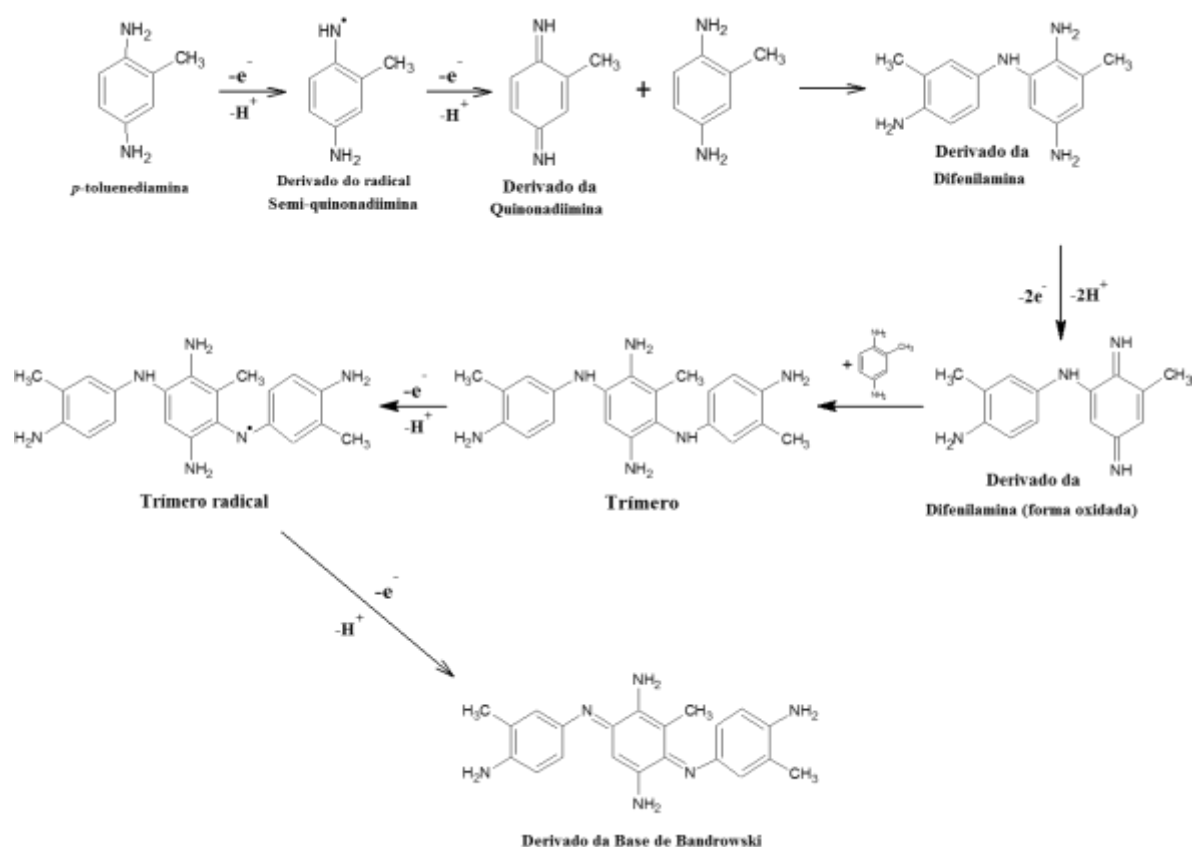
Fonte: Autor.

5.1.5. Reação de oxidação da PTD

Levando em consideração todos os estudos realizados neste trabalho, juntamente com os alguns estudos disponíveis na literatura (13,44,66,152), o mecanismo de oxidação da PTD, em meios oxidantes, é proposto no Esquema 5.

Em meio amoniacal contendo oxigênio dissolvido, a oxidação da PTD foi bastante rápida. O primeiro passo envolve a desprotonação de um dos grupos amino da molécula de PTD, formando o intermediário radical semi-quinonadiimina. Provavelmente esta desprotonação também ocorre pela contribuição de alguma hidroxila livre no meio e subsequente gerando o intermediário quinonodiimina (Esquema 5). A reação destes derivados com uma molécula de PTD forma dímeros e posteriormente trímeros, e sua forma oxidada é designada como derivado da BB (Esquema 5).

A reação de oxidação na presença de peróxido de hidrogênio ocorre de forma semelhante a oxidação realizada somente com oxigênio dissolvido, porém a PTD é oxidada diretamente ao derivado quinonodiimina. Dímeros e trímeros são formados, onde posteriormente ocorre a formação do derivado da BB, de forma mais rápida comparada ao meio de oxigênio dissolvido, uma vez que não foram detectados alguns compostos intermediários.



Esquema 5. Representação esquemática da reação de oxidação da PTD, em meio alcalino, na presença e na ausência de peróxido de hidrogênio.

Fonte: Autor.

5.1.6. Monitoramento da oxidação do PAF por espectrometria de massas (MS/MS)

A oxidação do PAF foi monitorada por espectrometria de massas em tampão amônio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 8,0, na presença e na ausência de peróxido de hidrogênio a 1,0% (v/v). A Figura 27 ilustra o espectro de massas obtido para $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ de PAF em tampão amônio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 8,0, após 3 horas de reação na ausência de peróxido de hidrogênio (oxigênio dissolvido).

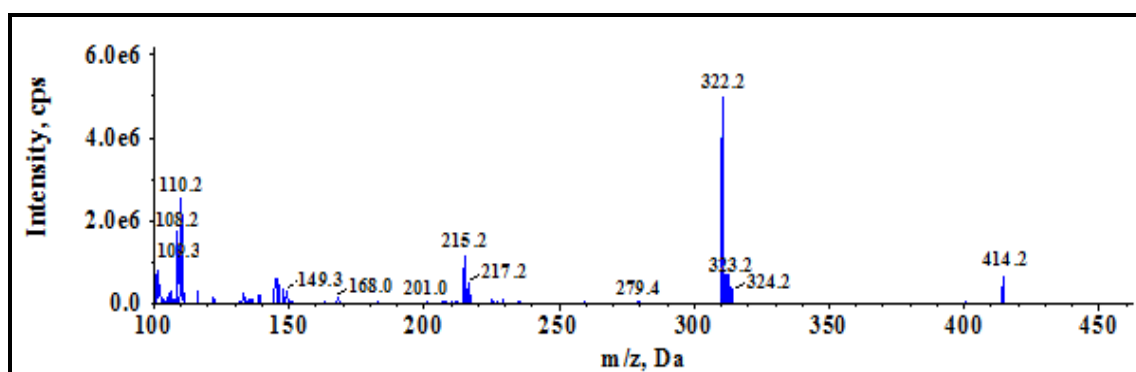


Figura 27. Espectro de massas obtido para $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ de PAF em tampão amônio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 8,0 após 3 horas de reação na ausência de peróxido de hidrogênio.

Fonte: Autor.

O espectro de massas obtido, Figura 27, apresentou íons de razão *massa/carga* (m/z) de 110,2, referente ao PAF e íons de m/z 108,2 e 109,3 referentes ao derivado intermediário quinonaimina e ao radical semi-quinonaimina, respectivamente.

Experimentos MS/MS dos íons de m/z 110,2; 109,3 e 108,2 foram realizados. O espectro de íons fragmento de m/z 110,2 mostrou como íons do fragmento principal, os íons de m/z 108,2 referente à perda de (H_2O , 18 Da); m/z 93,1, referente à perda de (NH_3 , 17 Da) e m/z 82,1 referente à perda de ($\text{C}_1\text{H}_2\text{O}$, 30 Da) (Figura 7AP, disponível no apêndice). O espectro de íons fragmento de m/z 108,2 mostrou como íons do fragmento principal, os íons m/z 80,1 referente à perda de (CO , 28 Da); m/z 54,1, referente à perda de ($\text{C}_3\text{H}_2\text{O}$, 54 Da) e m/z 53,0 referente à perda de ($\text{C}_3\text{H}_5\text{N}$, 55 Da) (Figura 8AP, disponível no apêndice).

Entretanto, a presença dos íons de m/z 217,2 e 215,2 foi detectada e pode ser atribuída a produtos formados da reação do derivado do radical intermediário quinonaimina com uma molécula de PAF e de sua forma oxidada, respectivamente. Experimentos MS/MS dos íons de

m/z 215,2 e 217,2 também foram realizados. O espectro de íons fragmento de m/z 215,2 mostrou como íons do fragmento principal, os íons m/z 198,0 referente à perda de (NH_3 , 17 Da); m/z 197,2 referente à perda de (H_2O , 18 Da) e m/z 109,1 referente à perda do derivado radical quinonaimina ($\text{C}_6\text{H}_4\text{N}_1\text{O}_1$, 106 Da) (Figura 9AP, disponível no apêndice). O espectro de íons fragmento de m/z 217,2 (Figura 10AP, disponível no apêndice) mostrou como íons do fragmento principal, os íons de m/z 200,2, referente à perda de (NH_3 , 17 Da); m/z 199,2 referente à perda de (H_2O , 18 Da) e m/z 111,1 referente à perda do derivado radical quinonaimina ($\text{C}_6\text{H}_4\text{N}_1\text{O}_1$, 106 Da).

Além disso, foram observados três picos de íons com m/z 324,2, 323,2 e 322,2 que podem ser atribuídos ao trímero, ao radical desse trímero e ao trímero em sua forma oxidada, respectivamente. O espectro MS/MS para o íon de m/z 322,2 foi obtido, porém para os íons m/z 324,2, 323,2 não foi possível obter o espectro MS/MS, pela baixa intensidade de ambos. O espectro MS/MS para o íon de m/z 322,2 (Figura 11AP, disponível no apêndice) apresentou como fragmentos os íons de m/z 305,0, referente à perda de (NH_3 , 17 Da), m/z 294,0, referente à perda de (CO , 28 Da) e m/z 214,2, referente à perda do derivado da quinonaimina ($\text{C}_6\text{H}_5\text{N}_1\text{O}_1$, 107 Da).

Por fim, foi observado um pico com m/z 414,2 que pode ser atribuído a um precipitado (tetrâmero) formado pela oxidação do PAF. O espectro de MS/MS para o íon de m/z 414,2 (Figura 12AP, disponível no apêndice) foi obtido e apresentou como fragmento os íons de m/z 397,4, referente à perda de (NH_3 , 17 Da), m/z 386,1, referente à perda de (CO , 28 Da) e m/z 306,2, referente à perda do derivado do radical semi-quinonaimina ($\text{C}_6\text{H}_6\text{N}_1\text{O}_1$, 107 Da). Estes experimentos confirmam a proposta de estruturas para os produtos de oxidação detectados e resumidos na Tabela 6 (páginas 119 e 120).

Os espectros de massas obtidos para a solução de PAF na presença de peróxido de hidrogênio a 1,0% (v/v), nas mesmas condições experimentais, Figura 28, apresentaram os mesmos produtos, exceto o derivado do radical semi-quinonadimina (m/z 108,2), dímero (m/z 217,2) e o radical trímero (m/z 323,2). Estes resultados comprovaram uma reação de oxidação mais rápida e efetiva na presença de peróxido de hidrogênio em comparação com a oxidação realizada somente com oxigênio dissolvido.

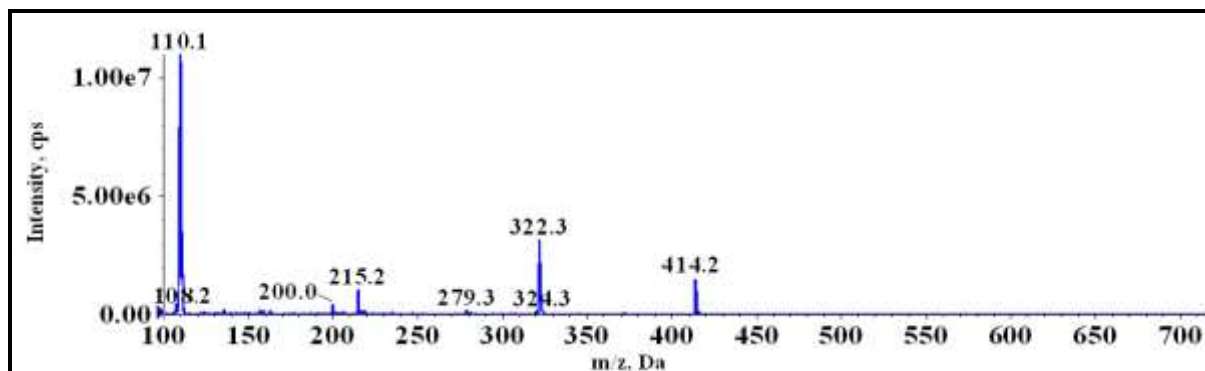


Figura 28. Espectro de massas obtido para 10,0 mg L⁻¹ de PAF em tampão amônio 0,1 mol L⁻¹ a pH 8,0 após 3 horas de reação na presença de peróxido de hidrogênio a 1,0% (v/v).

Fonte: Autor.

A CCD foi utilizada para separar e identificar os principais produtos formados. Os produtos foram extraídos e analisados conforme descrito anteriormente nas seções 4.3 e 4.4. Após 3 horas de reação as amostras geraram três manchas com compostos de coloração castanho claro, castanho escuro e rosa com ($R_f \times 100$) de 21, 31 e 49, respectivamente. O composto de coloração castanho claro foi identificado como sendo o PAF que ainda não foi totalmente oxidado. O mesmo resultado foi observado no experimento realizado com o padrão de PAF aplicado nas mesmas condições. O espectro de massas obtido para o composto de coloração castanho claro, Figura 29, apresentou o íon de m/z 110,2, referente ao PAF, conforme descrito anteriormente.

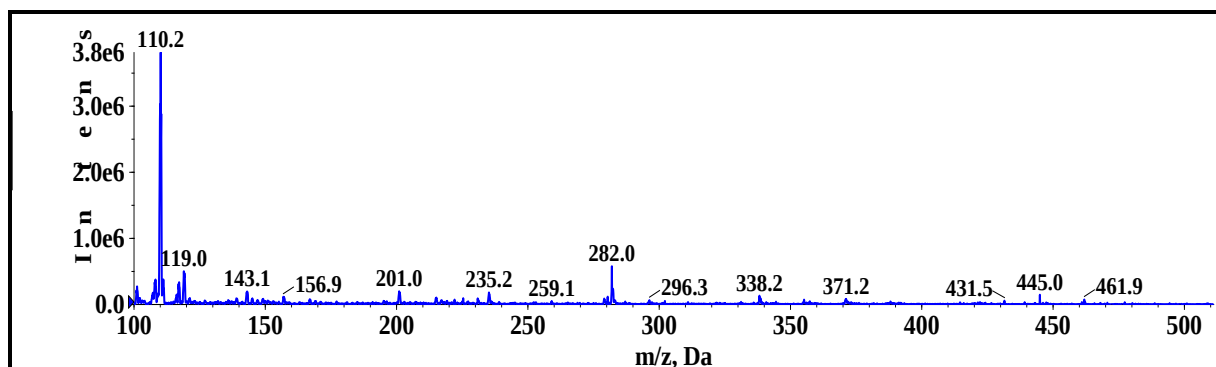


Figura 29. Espectro de massas obtido para o produto de coloração castanho claro.

Fonte: Autor.

O espectro de massas obtido para o composto de coloração castanho escuro, Figura 30, apresentou o íon de m/z 217,1 referente ao dímero não oxidado e, o íon de m/z 215,2 referente ao dímero na sua forma oxidada. Ambos formados pela polimerização do PAF, conforme descrito anteriormente.

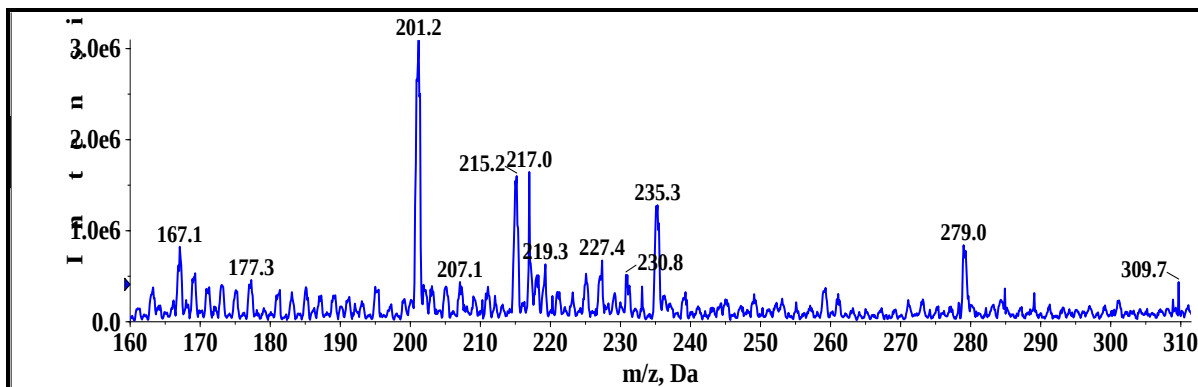


Figura 30. Espectro de massas obtido para o produto de coloração castanho escuro.

Fonte: Autor.

O espectro de massas obtido para o composto de coloração rosa, Figura 31, apresentou o íon de m/z 322,2, referente ao trímero formado pela polimerização do PAF, também descrito anteriormente.

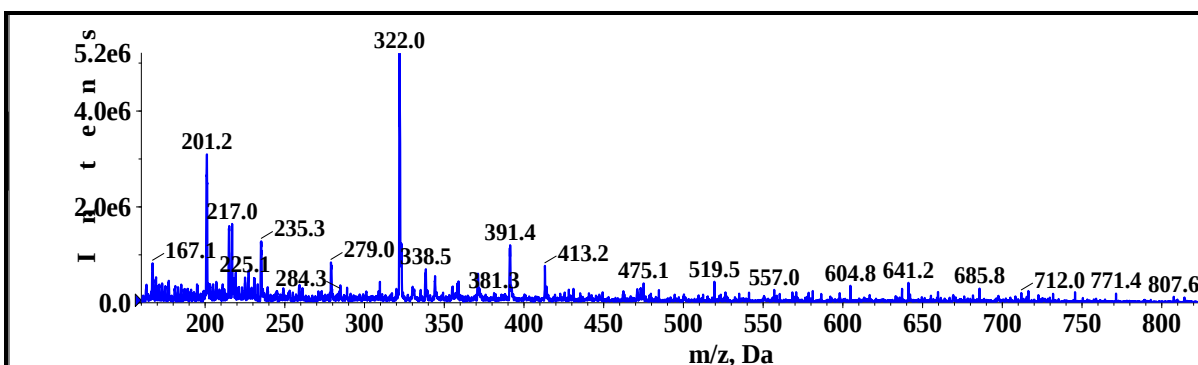
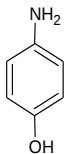
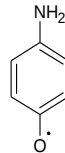
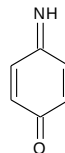
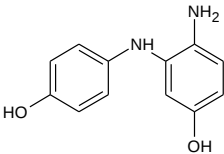
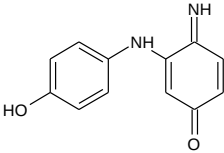
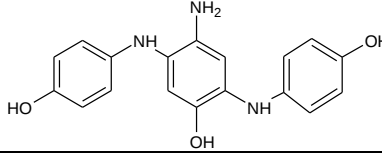
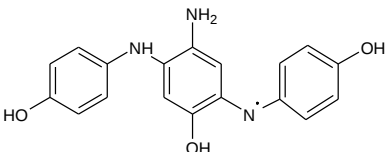
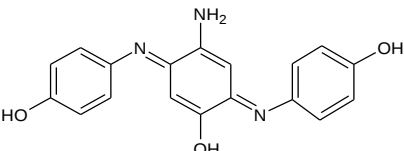
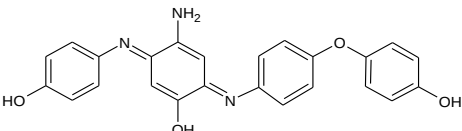


Figura 31. Espectro de massas obtido para o produto de coloração rosa.

Fonte: Autor.

Tabela 6. Estruturas propostas dos compostos detectados por MS/MS durante a oxidação do PAF, em tampão amônio 0,1 mol L⁻¹ a pH 8,0, na presença e na ausência de peróxido de hidrogênio.

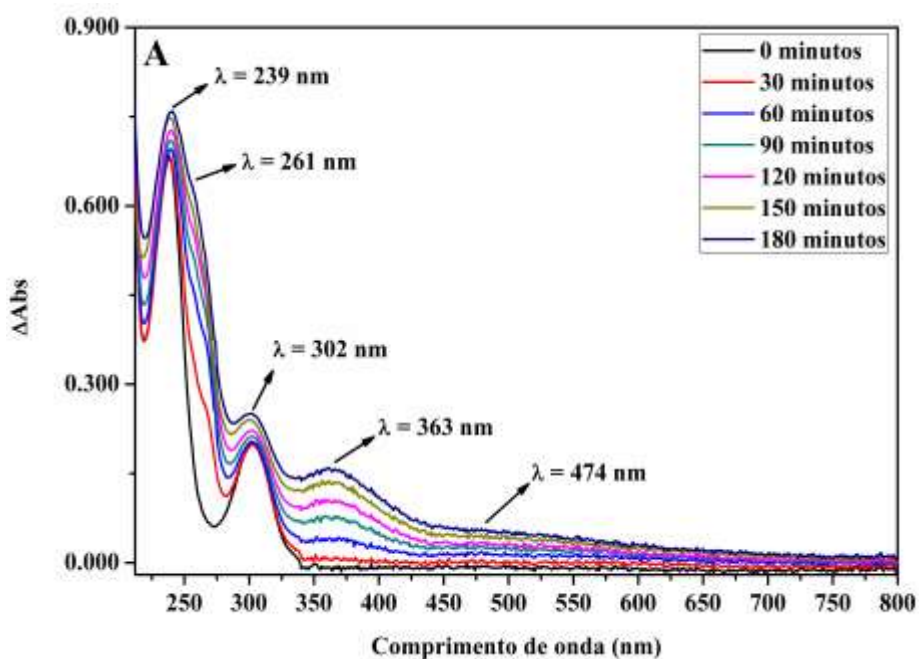
Composto	Massa Molecular (g mol ⁻¹)	Experimental (m/z) [M+H] ⁺	Íon Fragmento (m/z)
PAF 	109.1	110.2	93.1 92.2 82.1
Derivado do radical Semi-quinonaimina 	108.1	109.3	81.2 55.3 54.1
Derivado da Quinonaimina 	107.1	108.2	80.2 54.1 53.0
Dímero 	216.2	217.2	200.2 199.2 111.2
Dímero (forma oxidada) 	214.2	215.2	198.0 197.2 109.1
Trímero 	323.4	324.2	-

Radical Trímero			
	322.3	323.2	-
Trímero (forma oxidada)			
	321.3	322.2	305.0 294.0 214.2
Tetrâmero (precipitado)			
	413.4	414.2	397.4 386.1 306.2

Fonte: Autor.

5.1.7. Monitoramento da oxidação do PAF por espectrofotometria UV-VIS

A Figura 32 apresenta os espectros de absorção UV-Vis obtidos para 10,0 mg L⁻¹ de PAF, em tampão de amônio 0,1 mol L⁻¹ a pH 8,0, em atmosfera de oxigênio dissolvido (A) e 0,05% (v/v) de peróxido de hidrogênio (B) no período de 3 horas.



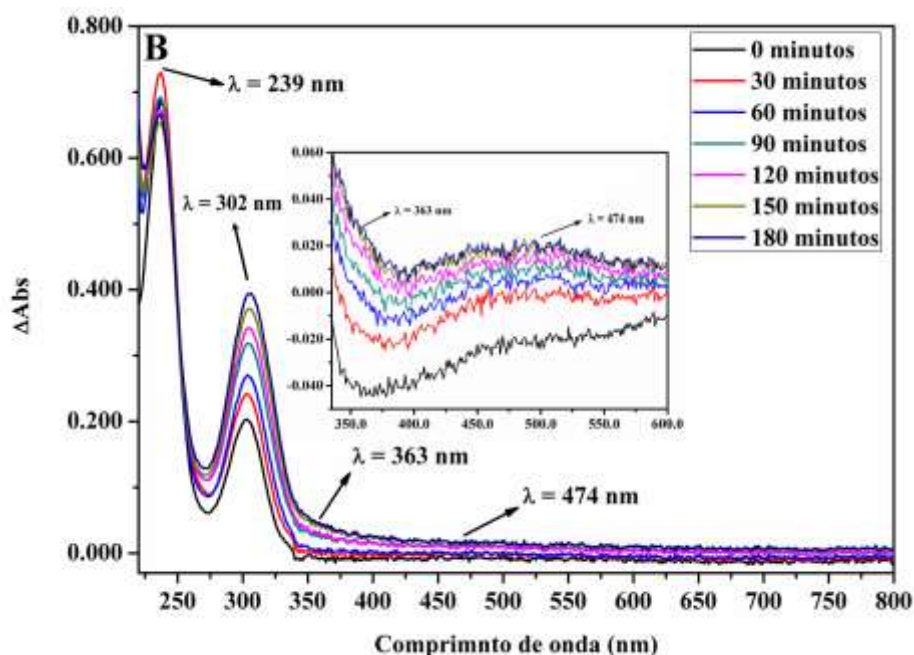


Figura 32. Espectros de absorção UV-Vis em $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ de PAF em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão amônio a pH 8,0: (A) oxigênio dissolvido e (B) peróxido de hidrogênio 0,05% (v/v). Inserção: Espectro de absorção UV-Vis aumentado na faixa de 350 a 600 nm (B).

Fonte: Autor.

Inicialmente na Figura 32A, o PAF apresentou duas bandas de absorção nos comprimentos de onda de 239 nm e 302 nm. Ambas as bandas aumentaram em função do tempo concomitantemente a uma nova formação de bandas em torno de 261 nm referente ao derivado do radical semi-quinonaimina, em 363 nm referente ao dímero, e em 474 nm referente ao trímero.

Na Figura 32B, comportamento semelhante foi observado para a banda em 302 nm, enquanto a banda em 239 nm diminuiu após 30 minutos, quando o PAF foi submetido ao mesmo tempo de reação em 0,05% de peróxido de hidrogênio. No entanto, as bandas em 363 e 474 nm tiveram menor intensidade, mostrando uma rápida oxidação seguido do acoplamento desses produtos, para a formação dos demais produtos identificados. Estes resultados são indicativos de que o PAF não é estável em tampão de amônio, comumente usado no processo de tingimento capilar. Experiências repetidas tanto na presença como na ausência de luz não mostraram diferenças significativas no comportamento oxidativo e nos espectros UV-Vis do PAF (dados não mostrados), sugerindo que a reação química não é influenciada por fotólise.

A Figura 33 mostra espectros de UV-Vis obtidos em metanol para os produtos de coloração claro, castanho escuro, rosa e para o produto precipitado, separados por CCD. Os espectros apresentaram efeito batocrômico, uma vez que foram obtidos em um solvente com polaridade diferente dos espectros obtidos nas Figuras 32A e 32B. Porém, os espectros com efeito batocrômico apresentaram bandas muito próximas aos produtos observados nos espectros das Figuras 32A e 32B, relacionando as bandas obtidas com a formação dos produtos propostos.

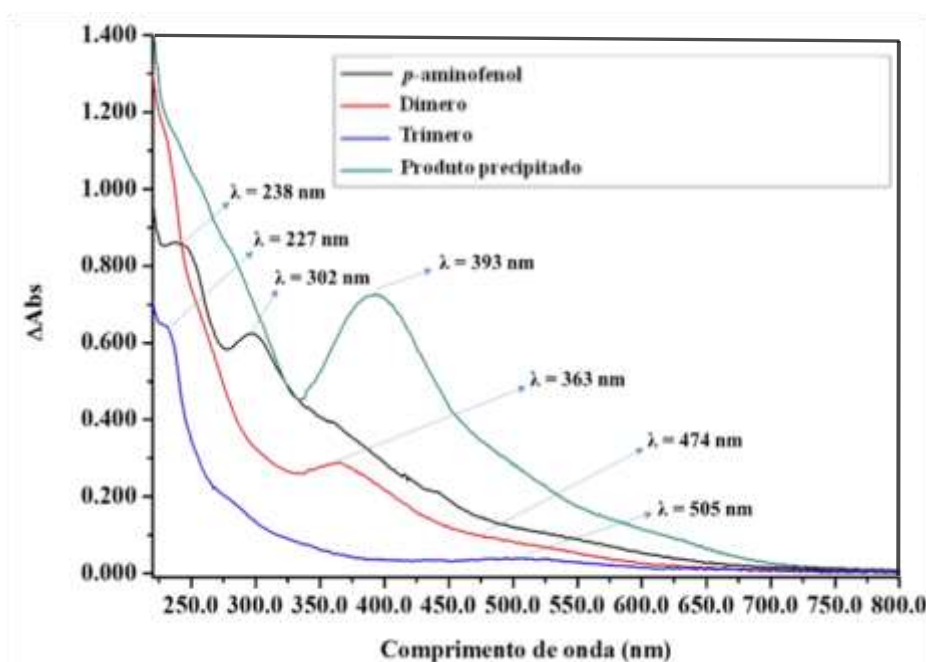


Figura 33. Espectros de absorção UV-Vis, obtidos em metanol, para o padrão e os produtos formados pela oxidação do PAF, em tampão amônio 0,1 mol L⁻¹ a pH 8,0, isolados por CCD.

Fonte: Autor.

5.1.8. Caracterização dos produtos de oxidação do PAF por espectrometria de infravermelho (IR)

O espectro de IR, obtido para o produto de coloração castanho claro (PAF), Figura 34, apresentou duas bandas de intensidade fraca, características de estiramento de ligação N-H de aminas primárias em aproximadamente 2922 e 2953 cm⁻¹, com o aparecimento de uma pequena banda em 3018 cm⁻¹, muito característico em bandas de aminas primárias e secundárias. Outras bandas de intensidade fraca em 1454 e 1516 cm⁻¹, características de estiramento de ligação C=C de carbono aromático foram observadas. Bandas em 1329 e 1374

cm^{-1} , de intensidade fraca, referente à vibração de ligação O-H, e estiramento de ligação C-O de fenóis, respectivamente foram observadas. Notou-se também uma banda de intensidade média em 1213 cm^{-1} , característica de estiramento de ligação C-N e outra banda de intensidade alta em 742 cm^{-1} característica da vibração da ligação N-H de aminas primárias e secundárias. Por fim, uma banda de intensidade média em 668 cm^{-1} característica de estiramento de ligação C-Cl oriunda do solvente utilizado para a solubilização do PAF (clorofórmio) (151). Estes resultados confirmam que a estrutura proposta para o produto de cor castanho claro é o PAF.

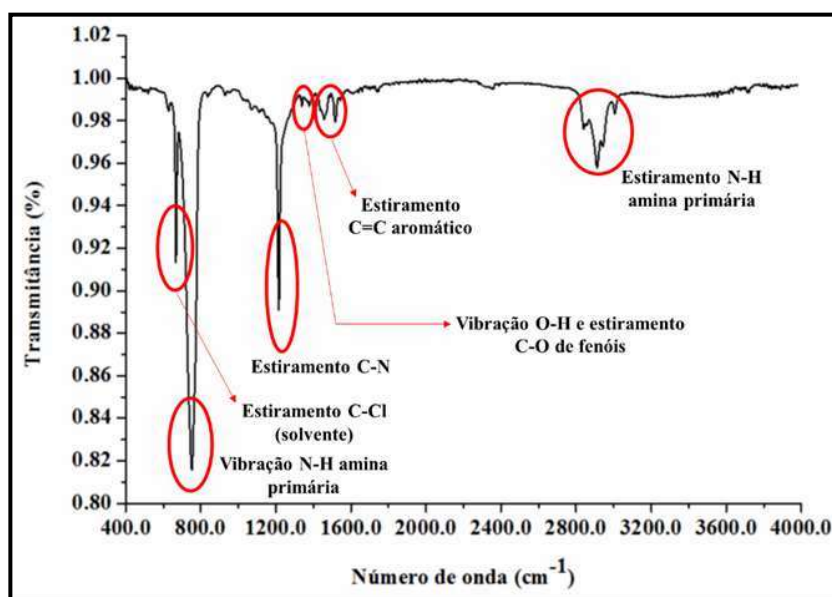


Figura 34. Espectro de IR, obtido em clorofórmio, para o produto de coloração castanho claro.

Fonte: Autor.

Para o produto de coloração castanho escuro, o espectro de IR, Figura 35, mostrou duas bandas com intensidade fraca em 2926 e 2956 cm^{-1} , correlacionadas com o alongamento primário da ligação N-H de aminas e uma pequena banda em 3021 cm^{-1} , característica de bandas de aminas primárias e secundárias. Outras bandas com intensidade fraca em 1456 e 1516 cm^{-1} , características da ligação C=C de carbono aromático foram observadas. Bandas com intensidade fraca em 1338 e 1376 cm^{-1} , relacionadas à vibração da ligação O-H e ao alongamento da ligação C-O de fenóis, respectivamente, foram observadas. Foi observada uma banda de média intensidade em 1215 cm^{-1} ; característica do alongamento da ligação C-N. Além disso, foi observada uma banda com alta intensidade em 747 cm^{-1} , relacionada com a vibração de ligação N-H de aminas primárias e secundárias. Por fim, foi observada uma banda

de intensidade média em 668 cm^{-1} , relacionada com o estiramento da ligação C-Cl do solvente utilizado para solubilização da amostra (clorofórmio) (151). Estes resultados confirmam que a estrutura proposta para o produto castanho escuro é o dímero.

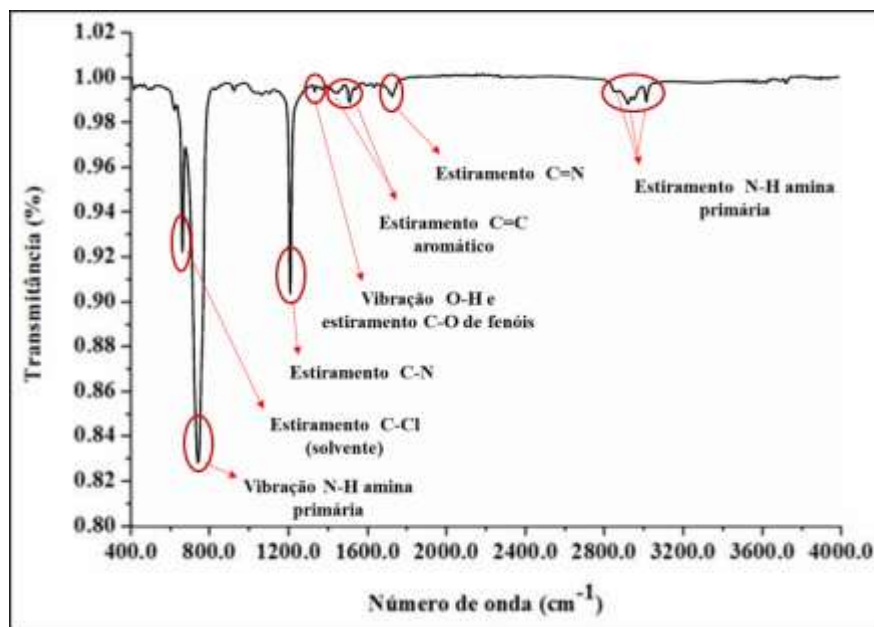


Figura 35. Espectro de IR, obtido em clorofórmio, para o produto de coloração castanho escuro.

Fonte: Autor.

O produto de coloração rosa, Figura 36, mostrou duas bandas com intensidade fraca em 2925 e 2955 cm^{-1} , características do alongamento primário da ligação N-H de aminas, e uma banda pequena em 3019 cm^{-1} , banda característica de aminas primárias e secundárias. Outras bandas com intensidade fraca em 1458 e 1516 cm^{-1} , relacionadas com a ligação C=C de carbono aromático foram observadas. Bandas com intensidade fraca em 1338 e 1377 cm^{-1} , relacionadas à vibração da ligação O-H e ao estiramento da ligação C-O de fenóis, respectivamente, foram observadas. Foi observada uma banda de média intensidade em 1210 cm^{-1} , relacionada ao alongamento característico da ligação C-N. Além disso, foi observada uma banda de alta intensidade em 744 cm^{-1} , relacionada a vibração da ligação N-H de aminas primárias e secundárias. Observou-se outra banda com intensidade média em 667 cm^{-1} , associado ao estiramento da ligação C-Cl do solvente utilizado para solubilização da amostra (clorofórmio) (151). Estes resultados confirmam que a estrutura proposta do produto cor de rosa é o trímero.

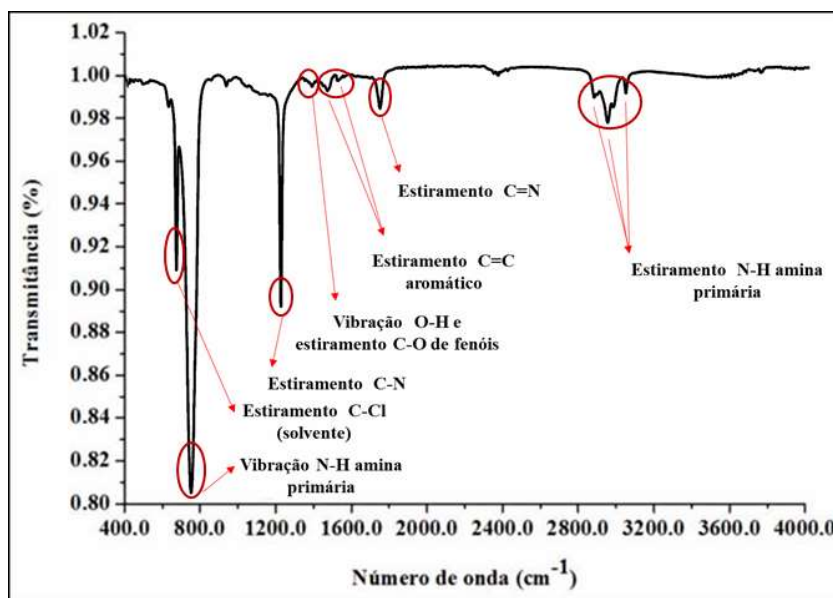


Figura 36. Espectro de IR, obtido em clorofórmio, para o produto de coloração rosa.

Fonte: Autor.

Finalmente, o espectro de IR para o produto precipitado, Figura 37, mostrou duas bandas com intensidade fraca em cerca de 2925 e 2956 cm^{-1} , relacionadas com o estiramento da ligação N-H de aminas primárias, e uma banda pequena em 3020 cm^{-1} , característica de bandas de aminas primárias e secundárias. Outras bandas com intensidade fraca em 1457 e 1516 cm^{-1} , associadas à ligação C=C de carbono aromático foram observadas. Bandas de fraca intensidade em 1338 e 1377 cm^{-1} , relacionadas à vibração da ligação O-H e ao estiramento da ligação C-O dos fenóis, respectivamente, foram observadas. Foi observada uma banda de média intensidade a 1211 cm^{-1} , característica do estiramento da ligação C-N. Além disso, uma banda de alta intensidade foi observada em 752 cm^{-1} , associada à vibração da ligação N-H de aminas primárias e secundárias. Foi observada uma banda de intensidade média em 666 cm^{-1} , característica do alongamento da ligação C-Cl do solvente utilizado para solubilização da amostra (clorofórmio) (151). Estes resultados confirmam a estrutura do produto precipitado.

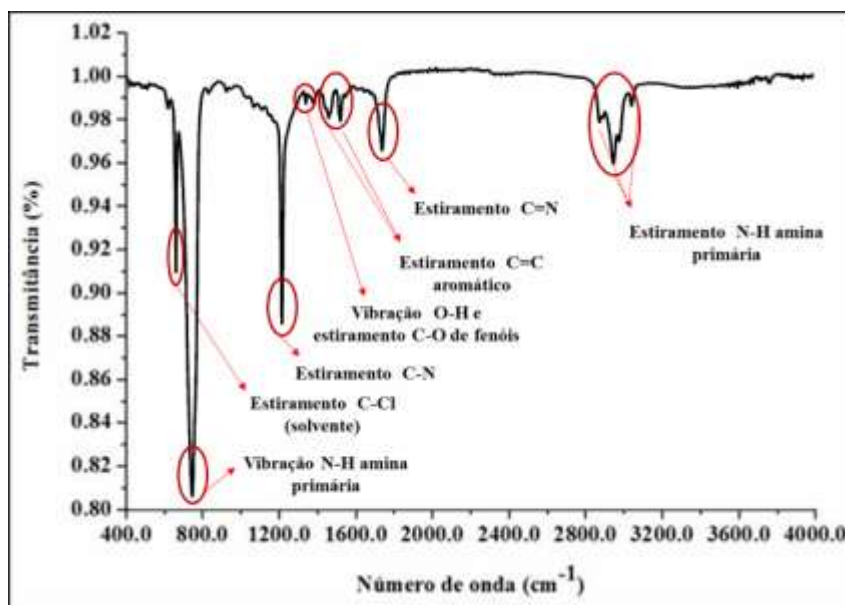


Figura 37. Espectro de IR, obtido em clorofórmio, para o produto precipitado (tetrâmero).

Fonte: Autor.

5.1.9. Caracterização dos produtos de oxidação do PAF por ^1H -RMN

O espectro de ^1H -RMN obtido para o produto de cor castanho claro (PAF), Figura 38, apresentou picos entre 6,6 e 6,9 ppm referentes aos hidrogênios ligados ao anel aromático, demarcados como “HA” e “HB” na molécula do PAF inserida no espectro de ^1H -RMN. Um pico de dois dubletos em torno de 6,7 ppm, atribuído ao hidrogênio “HA”, referente a um acoplamento em orto com o hidrogênio “HB” e um acoplamento em meta com o segundo hidrogênio “HA” foi observado (151). O outro pico de dois dubletos em aproximadamente 6,9 ppm, atribuído ao hidrogênio “HB”, referente a um acoplamento em orto com o hidrogênio “HA” e um acoplamento em meta com o segundo hidrogênio “HB” foi observado (151). Estes resultados confirmam que a estrutura proposta para o produto de cor castanha claro é o PAF.

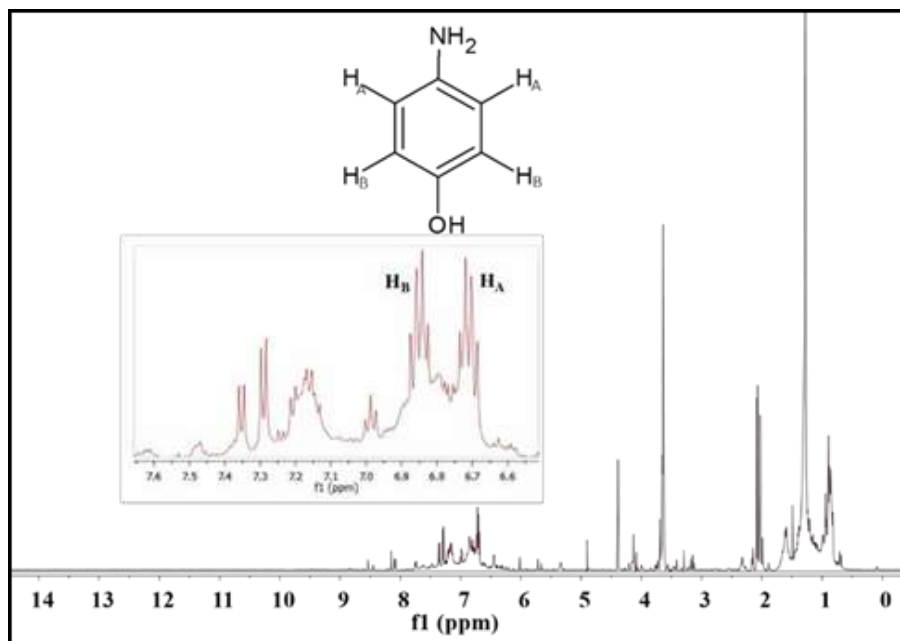


Figura 38. Espectro de ^1H -RMN obtido para o produto de coloração castanho claro em metanol deuterado. Inserção: Espectro de ^1H -RMN aumentado na faixa de 6,6 a 7,6 ppm e estrutura molecular do PAF.

Fonte: Autor.

O espectro de ^1H -RMN obtido para o produto de cor castanho escuro (dímero de reação), Figura 39, apresentou picos entre 6,6 a 6,9 ppm referentes aos hidrogênios ligados no anel aromático, demarcados como “HA” e “HB” na molécula do dímero inserida no espectro de ^1H -RMN. Um pico de dois dubletos em torno de 6,7 ppm, atribuído ao hidrogênio “HA”, referente a um acoplamento em orto com o hidrogênio “HB” e um acoplamento em meta com o segundo hidrogênio “HA” foi observado (151). Um outro pico de dois dubletos em aproximadamente 6,9 ppm, atribuído ao hidrogênio “HB”, referente a um acoplamento em orto com o hidrogênio “HA” e um acoplamento em meta com o segundo hidrogênio “HB” foi observado (151). Estes resultados confirmam que a estrutura proposta para o produto de cor castanho escuro é referente ao dímero de reação formado.

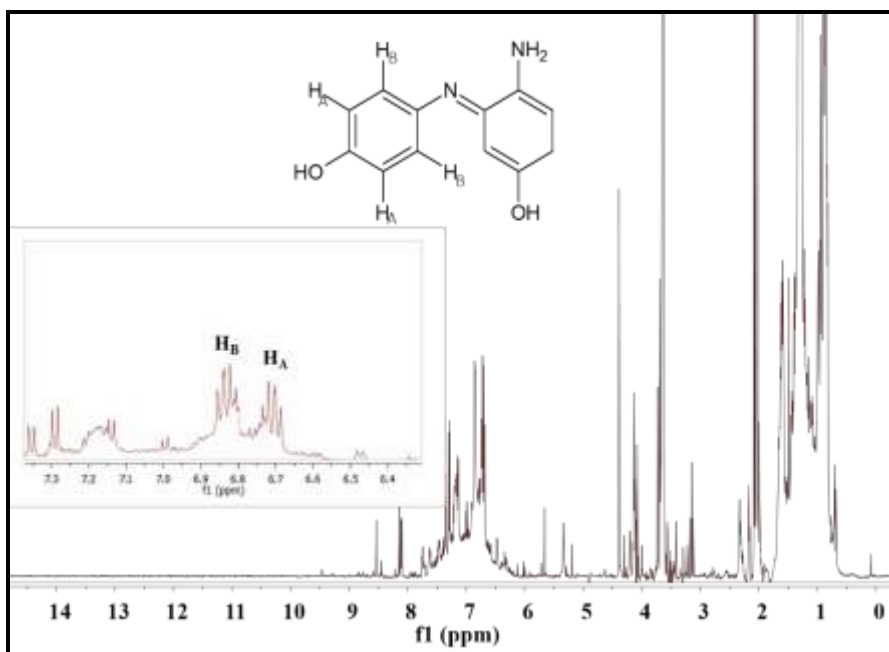


Figura 39. Espectro de ^1H -RMN obtido para o produto de coloração castanho escuro em metanol deuterado. Inserção: Espectro de ^1H -RMN aumentado na faixa de 6,3 a 7,3 ppm e estrutura molecular do dímero.

Fonte: Autor.

O espectro de ^1H -RMN obtido para o produto de coloração rosa (trímero de reação), Figura 40, apresentou picos entre 7,2 a 7,8 ppm referentes aos hidrogênios ligados ao anel aromático, demarcados como “HA” e “HB” na molécula do trímero inserida no espectro de ^1H -RMN. Um pico de dois dubletos em torno de 7,2 ppm, atribuído ao hidrogênio “HA”, referente a um acoplamento em orto com o hidrogênio “HB” e um acoplamento em meta com o segundo hidrogênio “HA” (151). Outro pico de dois dubletos observado em 7,8 ppm, atribuído ao hidrogênio “HB”, referente a um acoplamento em orto com o hidrogênio “HA” e e um acoplamento em meta com o segundo hidrogênio “HB” (151). Estes resultados confirmam que a estrutura proposta para o produto de cor rosa é referente ao trímero de reação formado.

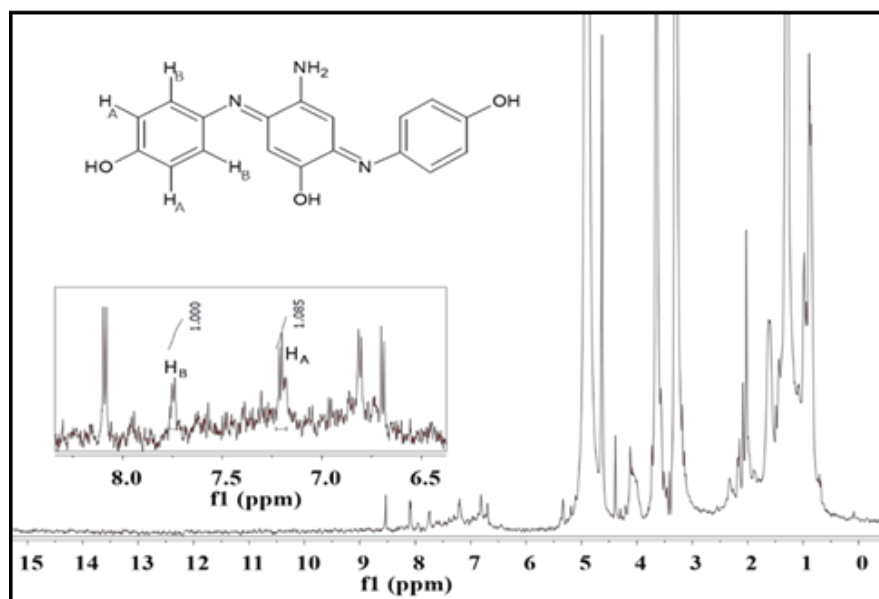


Figura 40. Espectro de ^1H -RMN obtido para o produto de coloração rosa em metanol deuterado. Inserção: Espectro de ^1H -RMN aumentado na faixa de 6,5 a 8,0 ppm e estrutura molecular do trímero.

Fonte: Autor.

Por fim, no espectro de ^1H -RMN obtido para o precipitado (tetrâmero), Figura 41, observou-se picos entre 7,0 a 7,2 ppm referentes aos hidrogênios ligados no anel aromático, demarcados como “HA” e “HB” na molécula do tetrâmero inserida no espectro de ^1H -RMN. Um pico de dois dubletos em torno de 7,0 ppm, atribuído ao hidrogênio “HA”, referente a um acoplamento em orto com o hidrogênio “HB” e um acoplamento em meta com o segundo hidrogênio “HA” foi observado (151). O outro pico de dois dubletos em aproximadamente 7,2 ppm, atribuído ao hidrogênio “HB”, referente a um acoplamento em orto com o hidrogênio “HA” e um acoplamento em meta com o segundo hidrogênio “HB” também foi observado (151). Observou-se também mais picos aglomerados entre 6,8 a 6,9 ppm, referentes aos hidrogênios ligados do outro anel aromático, demarcados como “HC” e “HD” na molécula do tetrâmero inserida no espectro de ^1H -RMN. Um pico de dois dubletos em torno de 6,8 ppm, atribuído ao hidrogênio “HC”, referente a um acoplamento em orto com o hidrogênio “HD” e um acoplamento em meta com o segundo hidrogênio “HC” foi observado (151). Outro pico de dois dubletos na região de 6,9 ppm, atribuído ao hidrogênio “HD”, referente a um acoplamento em orto com o hidrogênio “HC” e um acoplamento em meta com o segundo

hidrogênio “HD” foi observado (151). Estes resultados confirmam que a estrutura proposta para o produto é referente ao precipitado (tetrâmero) de reação formado.

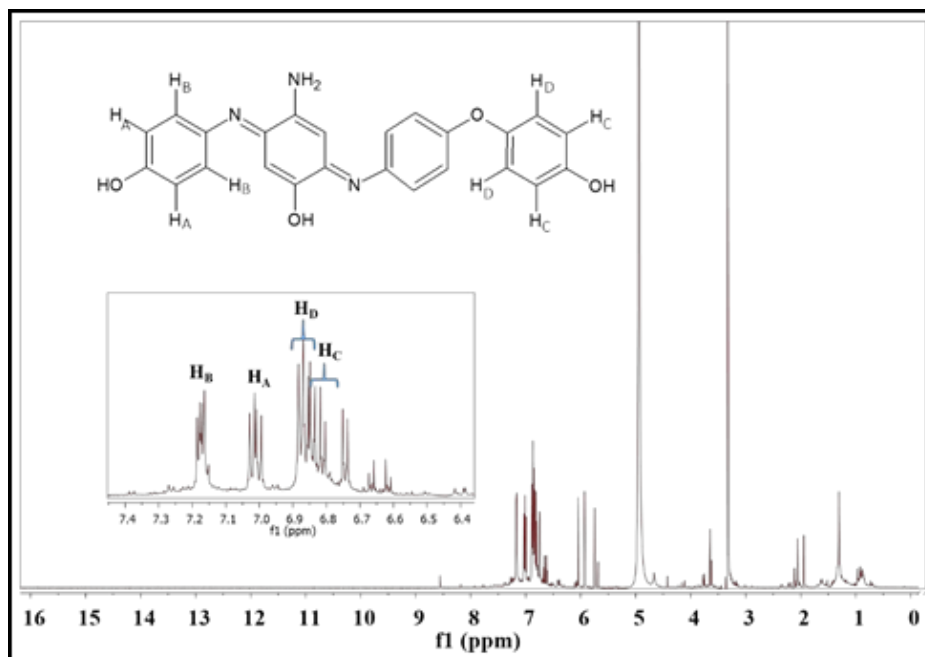


Figura 41. Espectro de ¹H-RMN obtido para o produto precipitado (tetrâmero) em metanol deuterado. Inserção: Espectro de ¹H-RMN aumentado na faixa de 6,4 a 7,4 ppm e estrutura molecular do precipitado (tetrâmero).

Fonte: Autor.

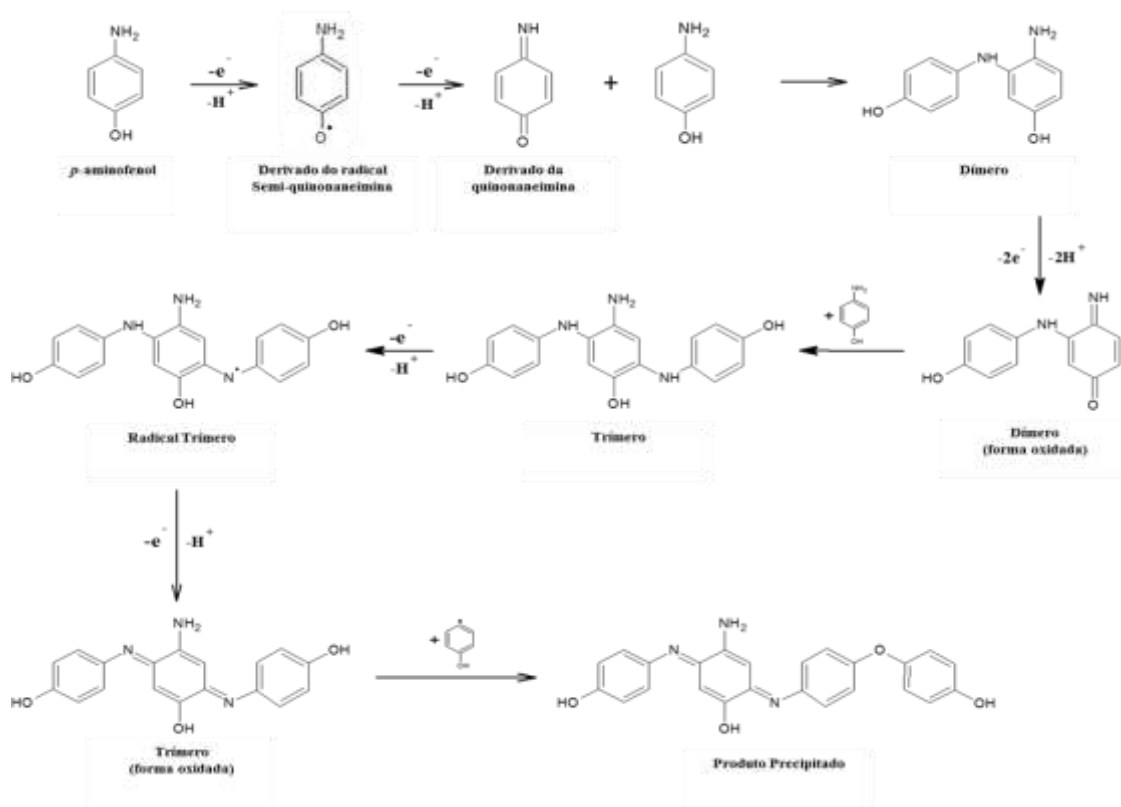
5.1.10. Reação de oxidação da PTD

Levando em consideração todos os estudos realizados neste trabalho, juntamente com os alguns estudos disponíveis na literatura (13,44,45,66,76,153-155), o mecanismo de oxidação do PAF, em meio oxidante, é proposto no Esquema 6.

Em meio amoniacal contendo oxigênio dissolvido, a oxidação do PAF é rápida, e o primeiro passo envolve a desprotonação do grupo hidroxila da molécula de PAF, formando o intermediário radical semi-quinonaimina. Provavelmente esta desprotonação também ocorre pela contribuição de alguma hidroxila livre no meio e subsequentemente gerando o intermediário quinonoimina (Esquema 6). A reação entre estes derivados com uma molécula de PAF forma dímeros, trímeros e como produto final forma o produto precipitado (tetrâmero), Esquema 6.

Para a reação de oxidação na presença de peróxido de hidrogênio foi observado um processo semelhante ao apresentado no Esquema 6, porém o PAF é diretamente oxidado ao

derivado da quinonaimina, posteriormente formando dímeros, trímeros, suas formas oxidadas e por fim a formação do produto precipitado (tetrâmero), sendo mais rápida em comparação no meio de oxigênio dissolvido, uma vez que não foi detectado alguns compostos intermediários.



Esquema 6. Representação esquemática da reação de oxidação do PAF, em meio alcalino, na presença e na ausência de peróxido de hidrogênio.

Fonte: Autor.

5.1.11. Monitoramento da reação entre a PTD e o PAF por espectrometria de massas (MS/MS)

A reação entre os precursores PTD e PAF foi monitorada por espectrometria de massas em tampão amônio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 8,0, na presença e na ausência de peróxido de hidrogênio a 1,0% (v/v). A Figura 42 mostra o espectro de massas obtido para a reação de $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ de PTD com $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ de PAF, na proporção de (1:1), em tampão amônio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 8,0 após 3 horas de reação na ausência de peróxido de hidrogênio (oxigênio dissolvido).

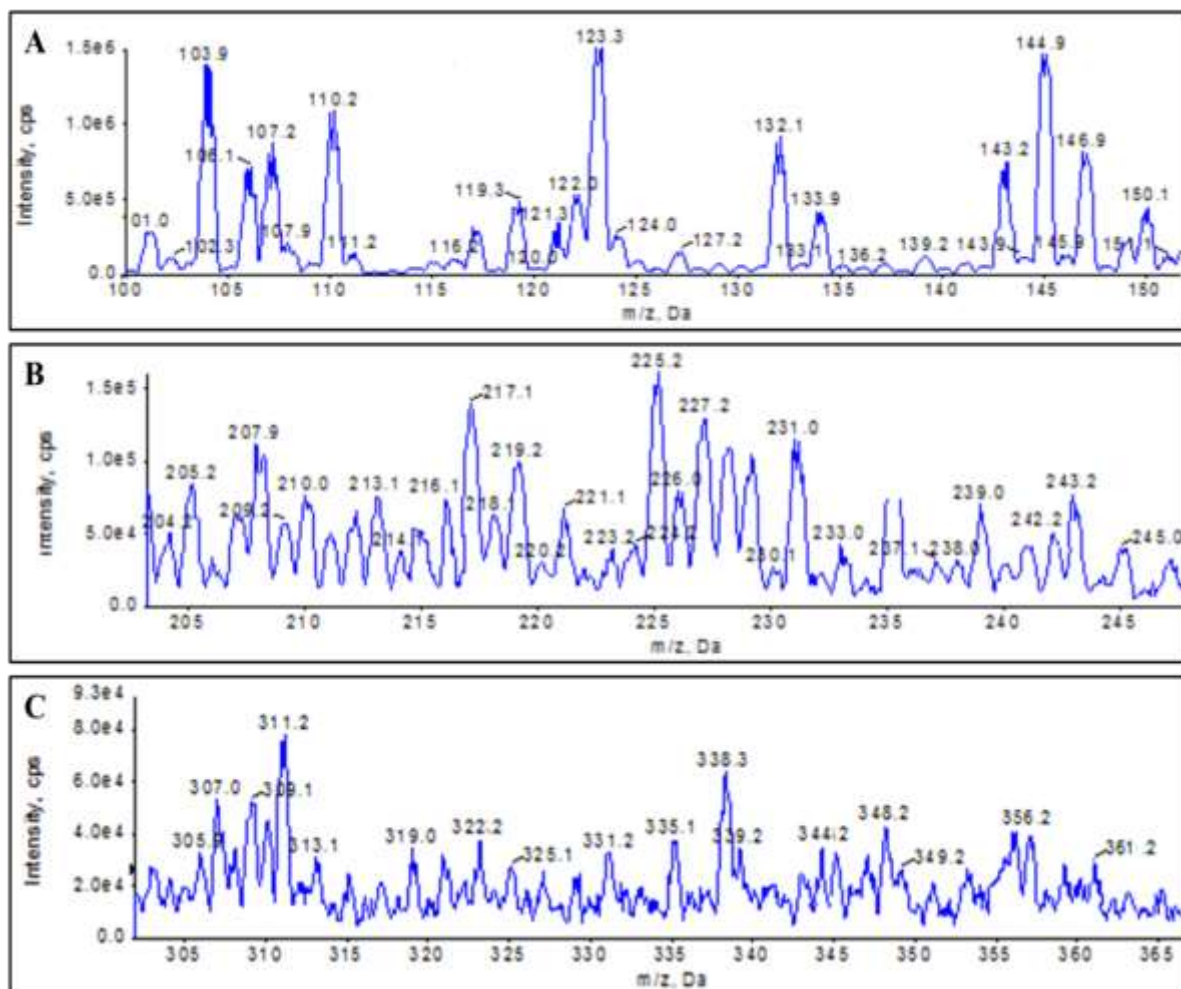


Figura 42. Espectro de massas obtido para reação entre a PTD e o PAF, na proporção de (1:1), em tampão amônio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 8,0, após 3 horas de reação: (A) Espectro de massas aumentado na faixa de m/z 100 a 150 Da, (B) espectro de massas aumentado na faixa de m/z 200 a 245 Da e em (C) espectro de massas aumentado na faixa de m/z 300 a 365 Da.

Fonte: Autor.

Após 3 horas de reação, na Figura 42A, pode-se observar ainda uma quantidade relativa de PTD (m/z 123,3) e de PAF (m/z 110,2) que não reagiram. Verificou-se também na Figura 42A a formação dos produtos intermediários de reação oriundos da oxidação da PTD, radical semi-quinonadiimina (m/z 122,0), derivado da quinonadiimina (m/z 121,3). Na Figura 42B observou-se o derivado da difenilamina (m/z 243,2) e sua forma oxidada (m/z 241,2), e na Figura 42C o derivado da BB (m/z 361,2) e seu fragmento (m/z 344,2). Todas as estruturas desses compostos estão representadas na Tabela 5 (páginas 106 e 107).

Foi observado também na Figura 42A, a formação dos produtos intermediários de reação oriundos da oxidação do PAF, derivado da quinonaimina (m/z 108,0), na Figura 42B o

dímero (m/z 217,1) e sua forma oxidada (m/z 215,2), e na Figura 42C o trímero na sua forma oxidada (m/z 322,2). Todas as estruturas desses compostos estão representadas na Tabela 6 (páginas 119 e 120). Os espectros de massas obtidos para a reação na presença de peróxido de hidrogênio a 1,0% (v/v) (dados não mostrados), na mesma condição experimental, apresentaram os mesmos produtos.

A separação dos principais produtos foi realizada por CCD a fim de identificá-los e caracterizá-los. Após 3 horas de reação em meio de oxigênio dissolvido e de peróxido de hidrogênio a 1% (v/v), foi observado cinco manchas com compostos de coloração castanho escuro, castanho claro, roxo, marrom, rosa escuro, marrom escuro e rosa claro com ($R_f \times 100$) de 16, 21, 29, 33, 38, 44 e 51, respectivamente. Os produtos foram extraídos analisados conforme descrito anteriormente nas seções 4.3 e 4.4.

A placa de CCD mostrou uma mancha de coloração castanho escuro e outra de coloração castanho claro em ($R_f \times 100$) de 16 e 21, respectivamente. Os valores de R_{fs} obtidos são os mesmos verificados anteriormente para a PTD e para o PAF, respectivamente. Portanto, os produtos formados de coloração castanho escuro e castanho claro são a PTD e o PAF, respectivamente.

No entanto, foi obtido um espectro de massas para o composto castanho escuro com o objetivo de confirmar se o mesmo é a PTD. O espectro de massas obtido para o composto de coloração castanho escuro, Figura 43, apresentou picos de íons com m/z 123,0; 122,2 e 121,2, referentes à PTD, o derivado do intermediário radical semi-quinonadiimina e o derivado do intermediário quinonadiimina, respectivamente. Estruturas dispostas na Tabela 5 (páginas 106 e 107).

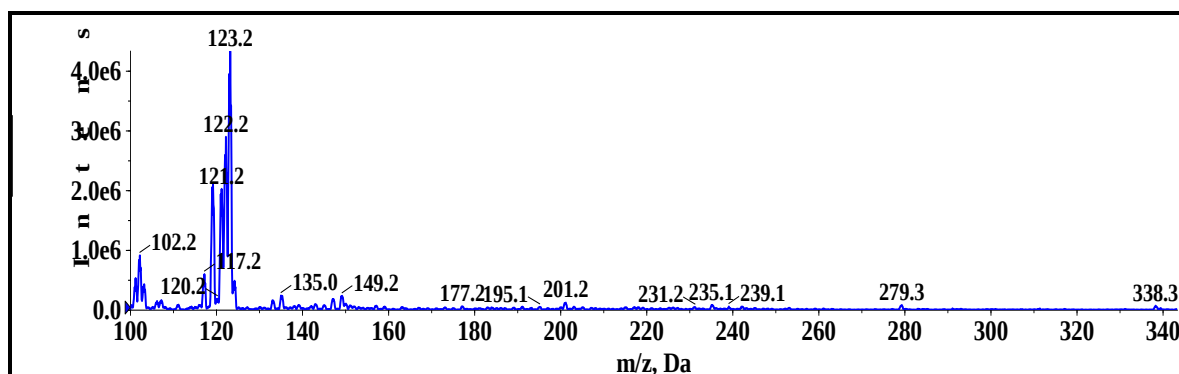


Figura 43. Espectro de massas obtido para o produto de coloração castanho escuro.

Fonte: Autor.

O espectro de massas obtido para o produto de coloração castanho claro, Figura 44, mostrou um pico de íon com m/z 110,0 e outro com m/z 108,2, picos referentes ao PAF e o derivado do intermediário quinonaimina, respectivamente. Estruturas dispostas na Tabela 6 (páginas 119 e 120).

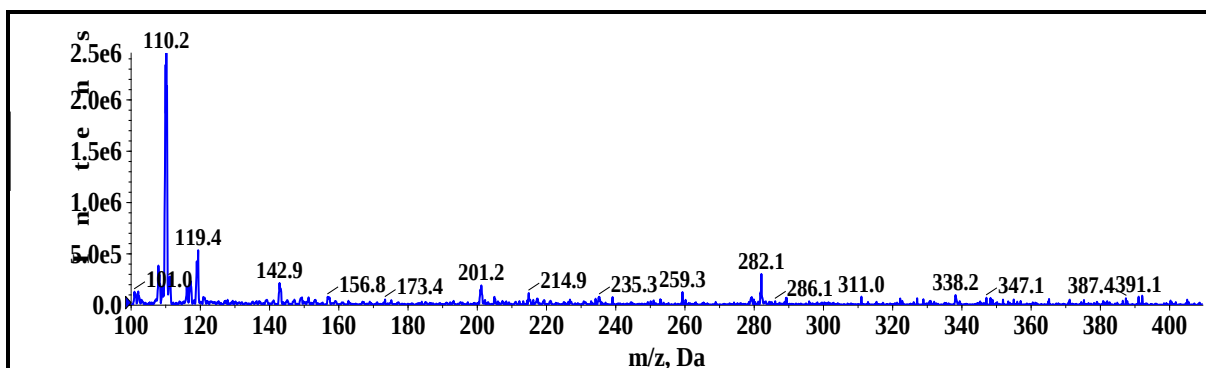


Figura 44. Espectro de massas obtido para o produto de coloração castanho claro.

Fonte: Autor.

A banda de coloração roxo apresentou um ($R_f \times 100$) de 29, com coloração parecida e de mesmo R_f observado na placa obtida na oxidação da PTD referente ao derivado da BB. O espectro de massas obtido, Figura 45, mostra um pico de íon com m/z 361,3, e outro íon com m/z 344,3, o que comprova que o produto de cor roxo é de fato o derivado da BB.

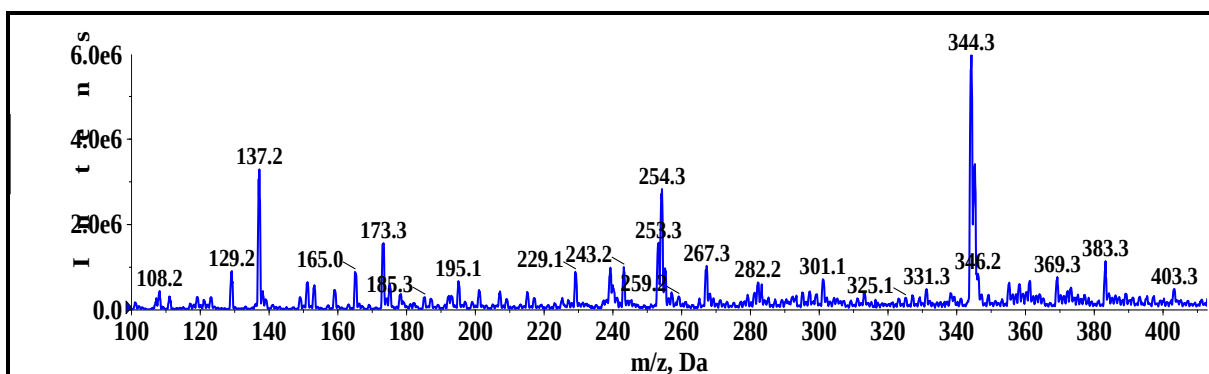


Figura 45. Espectro de massas obtido para o produto de coloração roxo.

Fonte: Autor.

A banda de coloração marrom apresentou um ($R_f \times 100$) de 33, com coloração e R_f semelhante ao produto observado na oxidação do PAF referente ao dímero formado. O espectro de massas obtido, Figura 46, mostrou um pico de íon com m/z 217,1, o que

comprova que o produto de cor marrom é o dímero de reação formado através da oxidação do PAF.

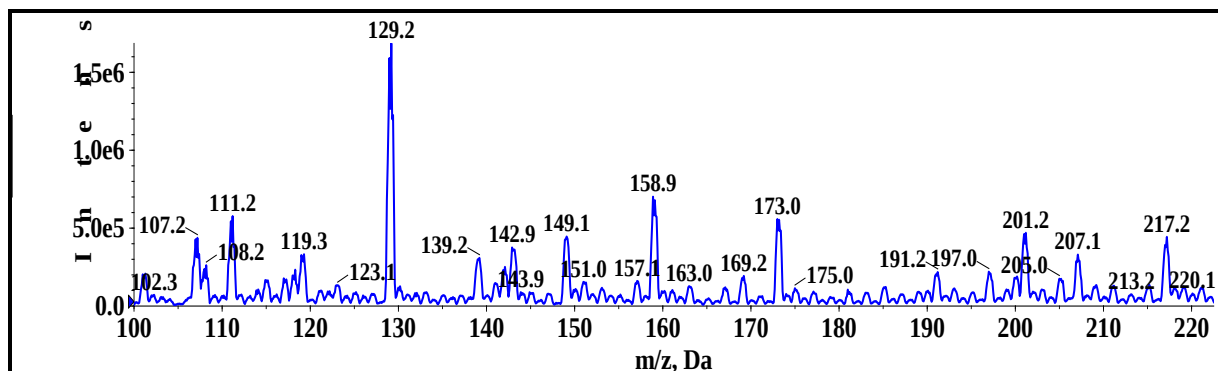


Figura 46. Espectro de massas obtido para o produto de coloração marrom.

Fonte: Autor.

A banda de coloração rosa escuro apresentou um ($R_f \times 100$) de 38, e não foi observada tanto na oxidação da PTD quanto na do PAF. Portanto, trata-se de um produto formado pela reação entre ambos os precursores. O espectro de massas obtido para o produto de coloração rosa, Figura 47, apresentou o íon de m/z 348,3 (Produto 2), cuja estrutura é mostrada na Tabela 7 (páginas 138 a 140).

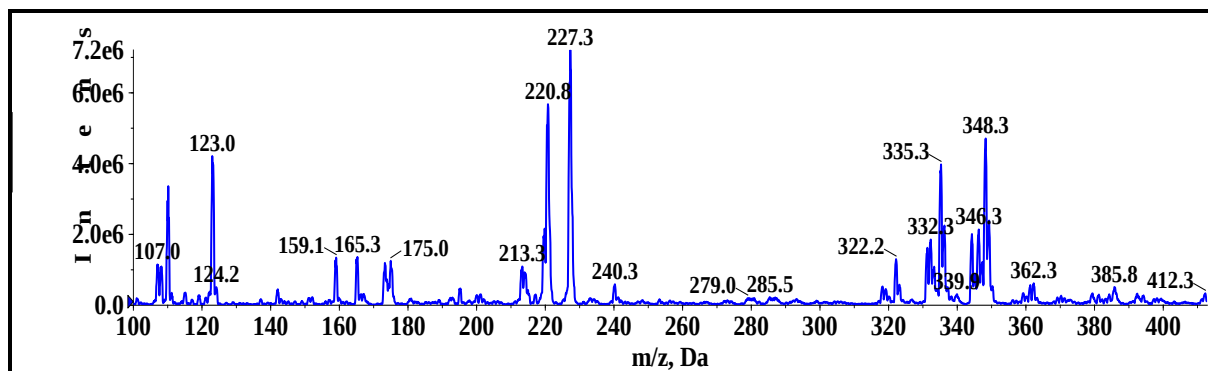


Figura 47. Espectro de massas obtido para o produto de coloração rosa.

Fonte: Autor.

O espectro MS/MS para o íon de m/z 348,3 (Figura 13AP, disponível no apêndice), apresentou como fragmentos os íons de m/z 333,4, referente à perda de (CH_3 , 15 Da), m/z 320,3, referente à perda de (CO , 28 Da) e m/z 226,3, referente à perda do derivado do intermediário quinonadiimina ($\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2$, 122 Da).

A banda de coloração marrom escuro apresentou um ($R_f \times 100$) de 44, e também não foi observada na oxidação da PTD e do PAF, tratando-se de produto formado da reação entre ambos os precursores. O espectro de massas obtido, Figura 48, apresenta o íon de m/z 335,3 (Produto 3), cuja estrutura é mostrada na Tabela 7 (páginas 138 a 140).

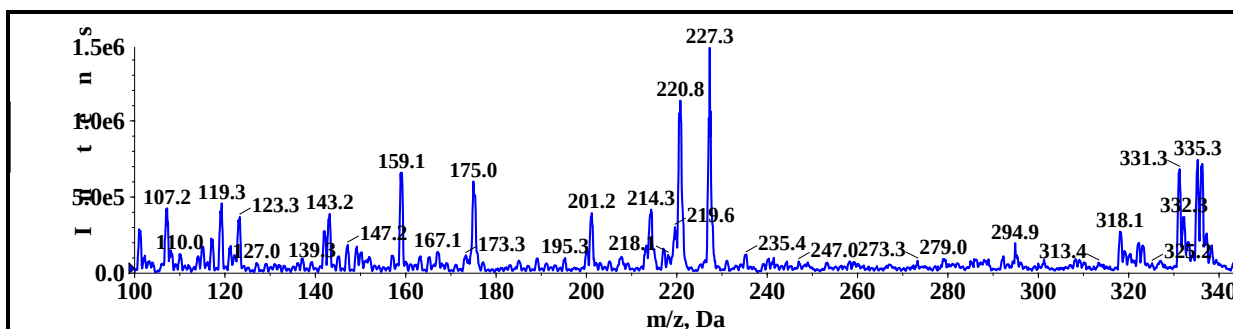


Figura 48. Espectro de massas obtido para o produto de coloração marrom escuro.

Fonte: Autor.

O espectro MS/MS para o íon m/z 335,3 (Figura 14AP, disponível no apêndice) apresentou como fragmentos os íons de m/z 320,0, referente à perda de (CH_3 , 15 Da), m/z 307,2, referente à perda de (CO , 28 Da) e m/z 226,3, referente à perda de ($\text{C}_6\text{H}_7\text{N}_1\text{O}_1$, 109 Da).

E por fim, a banda de coloração rosa claro apresentou um ($R_f \times 100$) de 51, com coloração e R_f semelhante ao trímero formado pela oxidação do PAF (Tabela 6, páginas 119 e 120). O espectro de massas obtido para o produto de coloração rosa claro, Figura 49, apresentou o íon m/z 322,2, referente ao trímero formado pela oxidação do PAF, cuja estrutura é mostrada na Tabela 6 (páginas 119 e 120).

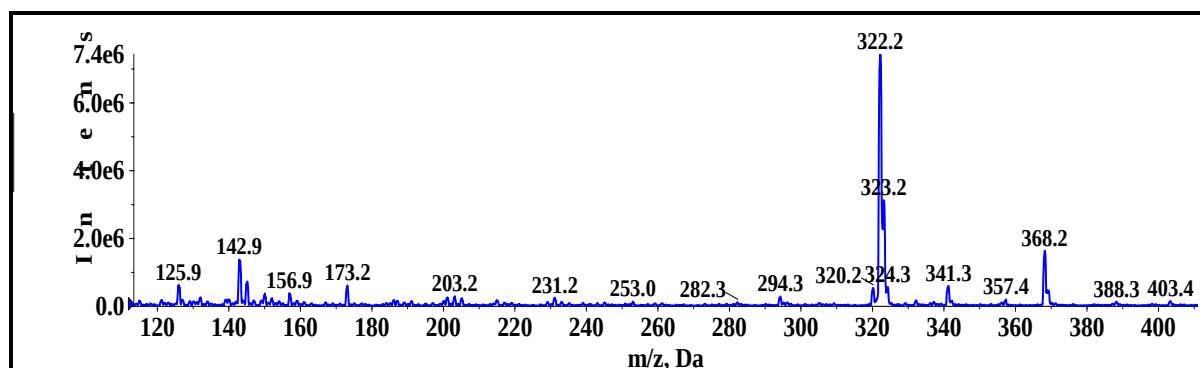


Figura 49. Espectro de massas obtido para o produto de coloração rosa claro.

Fonte: Autor.

No mais, a reação entre os precursores PTD e PAF, na proporção de (1:1), em tampão amônio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 8,0, formou também um produto precipitado de coloração preta. O espectro de massas obtido para o precipitado formado, Figura 50, apresentou o pico de íon de m/z 414,3, referente ao precipitado formado pela oxidação do PAF (estrutura mostrada na Tabela 6, páginas 119 e 120). Os picos dos íons de m/z 427,3 (Produto 7), m/z 440,4 (Produto 6), m/z 453,4 (Produto 5) e m/z 468,4 (Produto 6) são referentes aos produtos formados pela reação entre a PTD e o PAF, cuja estruturas são mostradas na Tabela 7 (páginas 138 a 140). Portanto o precipitado obtido é na verdade um conjunto de vários produtos que precipitaram.

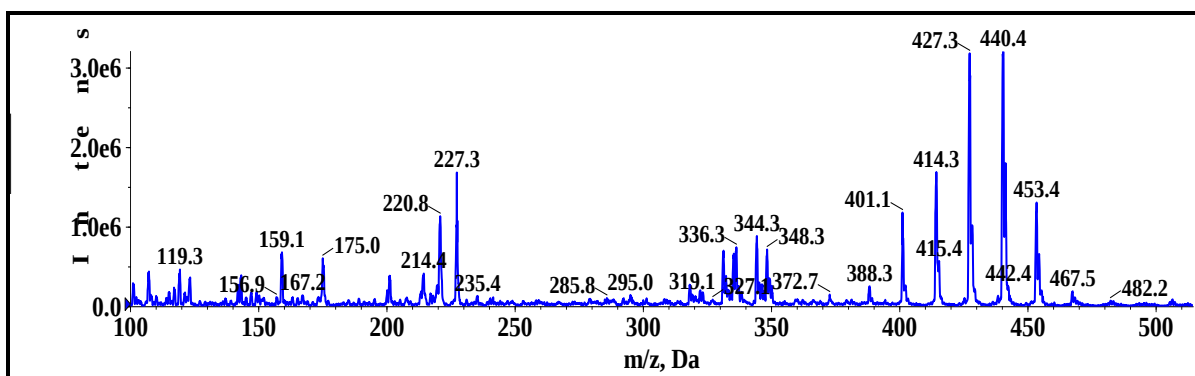


Figura 50. Espectro de massas obtido para os produtos precipitados da reação entre a PTD e o PAF.

Fonte: Autor.

O espectro MS/MS obtido para o íon de m/z 427,3 (Figura 15AP, disponível no apêndice) apresentou como fragmentos os íons com m/z 412,1 referente à perda de ($\cdot\text{CH}_3$, 15 Da), m/z 319,2 referente à perda de (CO , 28 Da) e, m/z 319,2 referente à perda de um derivado do intermediário radical semi-quinonaimina ($\cdot\text{C}_6\text{H}_6\text{N}_1\text{O}_1$, 108 Da).

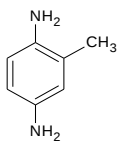
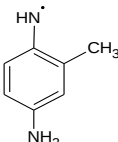
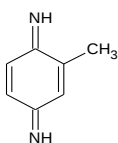
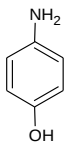
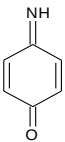
O espectro MS/MS obtido para o íon de m/z 440,3 (Figura 16AP, disponível no apêndice) apresentou como fragmentos os íons com m/z 425,2 referente à perda de ($\cdot\text{CH}_3$, 15 Da), m/z 319,2 referente à perda de um derivado do intermediário quinonadiimina ($\cdot\text{C}_7\text{H}_9\text{N}_2$, 121 Da) e, m/z 332,2 referente à perda de um derivado do intermediário radical semi-quinonaimina ($\cdot\text{C}_6\text{H}_6\text{N}_1\text{O}_1$, 108 Da).

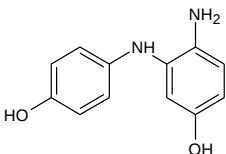
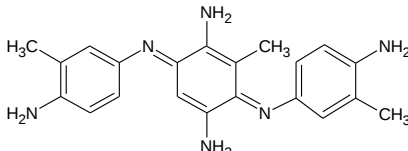
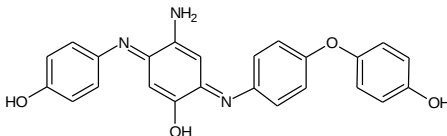
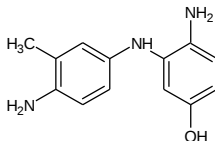
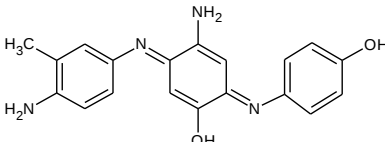
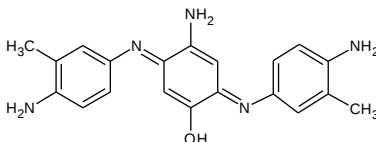
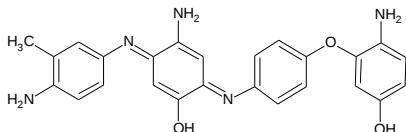
O espectro MS/MS obtido para o íon de m/z 453,4 (Figura 17AP, disponível no apêndice) apresentou como fragmentos os íons de m/z 438,3, referente à perda de ($\cdot\text{CH}_3$, 15 Da), m/z 332,2 referente à perda de um derivado do intermediário quinonadiimina ($\cdot\text{C}_7\text{H}_9\text{N}_2$, 121 Da) e, m/z 331,2 referente à perda de um derivado do intermediário radical semi-

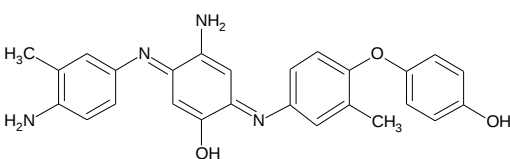
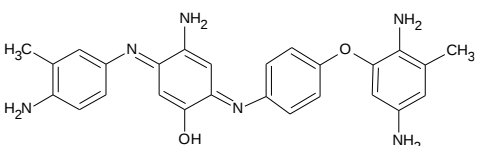
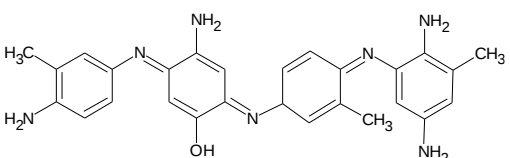
quinonadiimina ($C_7H_8N_2$, 120 Da). No entanto, o espectro do íon de m/z 468,4 não foi obtido devido à sua baixa intensidade.

O mesmo procedimento foi repetido com a presença de peróxido de hidrogênio a 1,0% (v/v) (dados não mostrados), e o perfil obtido para as placas foram os mesmos, com a formação dos mesmos produtos, porém com intensidades diferentes.

Tabela 7. Estruturas propostas dos compostos detectados por MS/MS durante a reação da PTD e o PAF, proporção de (1:1), em tampão amônio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 8,0, na presença e na ausência de peróxido de hidrogênio.

Compostos	Massa Molecular (g mol^{-1})	Experimental (m/z) [M+H] ⁺	Íon Fragmento (m/z)
PTD (*) 	122,2	123,2	108,2 106,0 81,0
Derivado do radical Semi-quinonadiimina 	121,2	122,2	107,0 105,4 91,9
Derivado da Quinonadiimina 	120,2	121,2	106,1 105,4 91,7
PAF (**) 	109,1	110,2	93,1 92,2 82,1
Derivado da Quinonaimina (**) 	107,1	108,2	80,2 54,1 53,0

Dímero (**)			
	216.2	217.2	200.2 199.2 111.2
Derivado da Base de Bandrowski (*)			
	360.5	361.3	346.1 344.3 241.2
Tetrâmero (**)			
	413.4	414.2	397.4 386.1 306.2
Produto 1			
	229.3	230.2	-
Produto 3			
	334.4	335.3	320.0 307.2 226.3
Produto 2			
	347.4	348.3	333.4 320.3 226.3
Produto 4			
	426.4	427.4	412.1 399.2 319.3

Produto 5				
	439.4	440.4	425.2 319.2 332.2	
Produto 6				
	452.4	453.4	438.3 332.2 331.2	
Produto 7				
	466.6	467.5	-	

(*) - Produtos formados pela oxidação da PTD;

(**) - Produtos formados pela oxidação do PAF.

Fonte: Autor.

5.1.12. Monitoramento da reação entre a PTD e o PAF por espectrofotometria UV-VIS

A Figura 51 apresenta os espectros de absorção UV-Vis obtidos para a reação da PTD com o PAF, na proporção de (1:1) (ambos a $10,0 \text{ mg L}^{-1}$), em tampão de amônio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 8,0, em atmosfera de oxigênio dissolvido (A) e 1,0% (v/v) de peróxido de hidrogênio (B) no período de 3 horas.

Inicialmente, a Figura 51A apresentou duas bandas de absorção nos comprimentos de onda de 242 nm e 305 nm. No decorrer das 3 horas de reação, houve a diminuição gradativa da banda em 242 nm, atribuída a combinação da absorção da PTD e do PAF, mostrando a formação de outros produtos de reação em 352 nm e 474 nm, evidenciando a formação de novos produtos de reação.

Após 45 minutos do preparo da solução, observou-se uma alteração de coloração, que passou de castanho claro para uma coloração castanha escura, que se intensificou ao longo do tempo. Além disso, observou-se a formação de um precipitado de coloração preta.

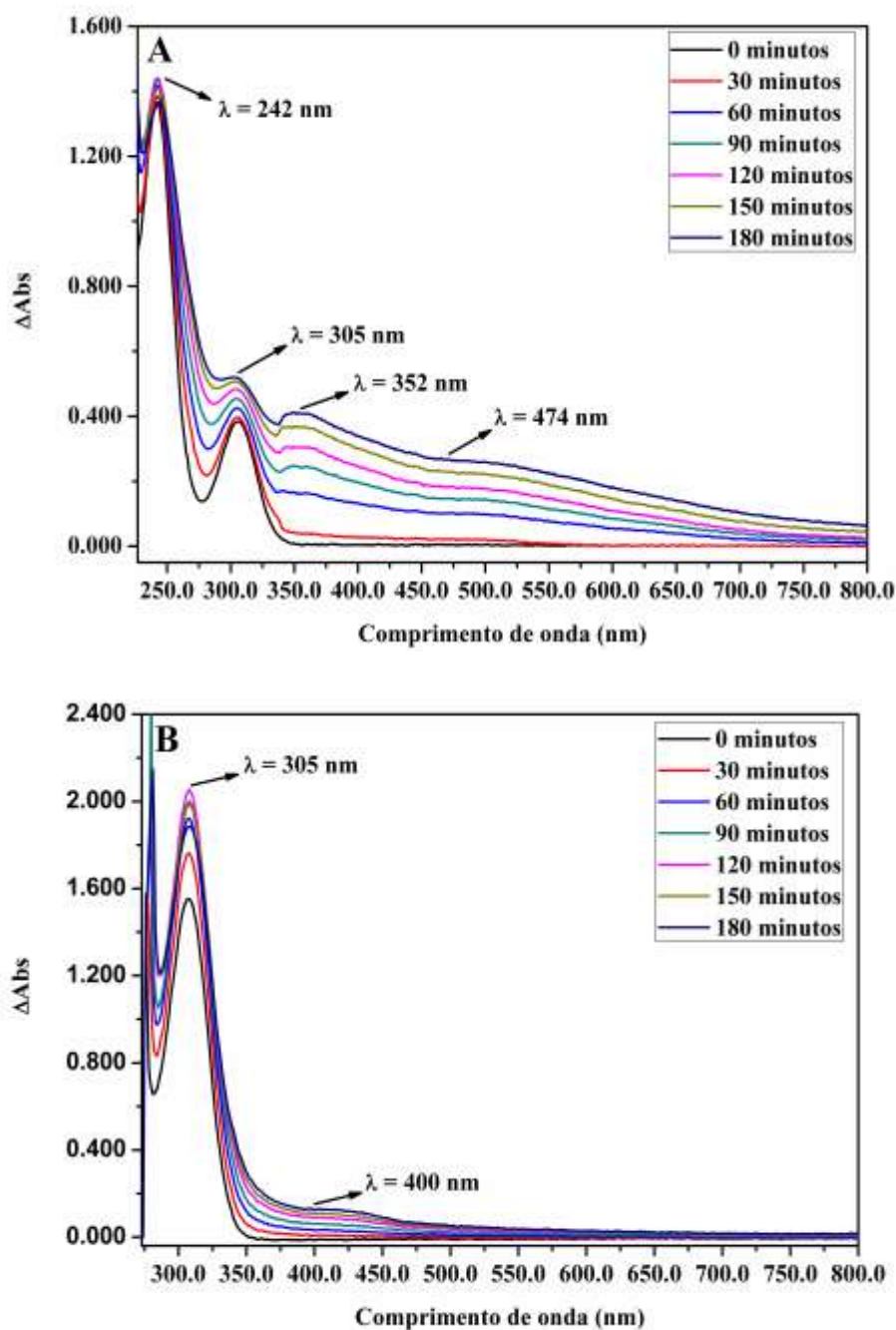


Figura 51. Espectro de absorção UV-Vis para a reação da PTD com o PAF na proporção de (1:1) (ambos a $10,0 \text{ mg L}^{-1}$) em tampão amônio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 8,0 em atmosfera de oxigênio dissolvido (A) e 1,0% (v/v) de peróxido de hidrogênio (B).

Fonte: Autor.

Experimentos repetidos, tanto na presença quanto na ausência de luz, não mostraram diferenças significativas no comportamento e nos espectros obtidos (dados não apresentados), sugerindo que a reação, entre a PTD e o PAF, não é influenciada por fotólise.

A adição de peróxido de hidrogênio provocou o desaparecimento imediato da banda em 242 nm, Figura 51B, um aumento gradativo da banda em 305 nm, e a formação de uma banda de absorção em torno de 400 nm. Isso pode ser um indicativo de que a reação e a formação desses produtos acontecem de forma mais rápida em comparação ao meio de oxigênio dissolvido. Todavia, no instante em que foi adicionado o peróxido de hidrogênio 1,0% (v/v), na presença de PTD e de PAF, observou-se uma alteração de cor, passando de uma coloração castanha claro para uma coloração castanho escuro, que ao longo do tempo foi se intensificando. Além disso, observou-se a formação de um precipitado de coloração preta.

Espectros de UV-Vis, Figura 52, foram obtidos em metanol, para os produtos de reação entre a PTD e o PAF separados por CCD. Embora os espectros apresentem efeito batocrômico, por serem obtidos em um solvente com polaridade diferente dos espectros obtidos nas Figuras 51A e 51B, eles mostram algumas bandas similares para os produtos observados nos espectros obtidos em tampão amônio, confirmando a formação dos produtos propostos. No instante em que foi adicionado o peróxido de hidrogênio 1,0% (v/v), na presença de PTD e de PAF, observou-se uma alteração de cor, passando de uma coloração castanha claro para uma coloração castanho escuro, que ao longo do tempo foi se intensificando. Além disso, observou-se a formação de um precipitado de coloração preta.

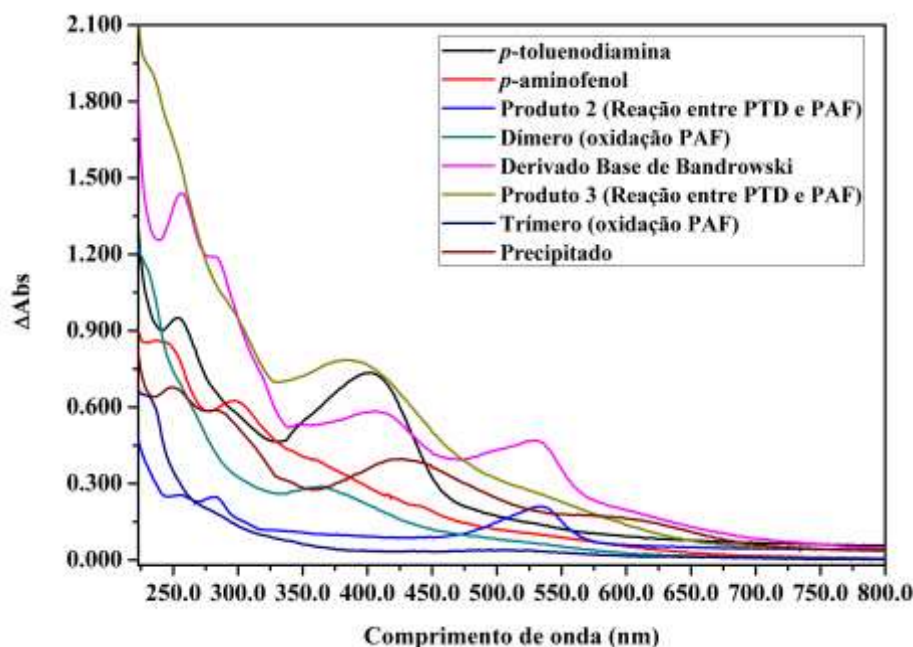


Figura 52. Espectros de absorção UV-Vis, obtidos em metanol, para os produtos formados pela reação entre a PTD e o PAF, isolados por CCD.

Fonte: Autor.

5.1.13. Caracterização dos produtos de reação entre a PTD e o PAF por espectrometria de infravermelho (IR)

O espectro de IR obtido para o produto de cor castanho escuro, Figura 53, mostrou bandas de absorção semelhantes ao espectro obtido anteriormente para a PTD (Figura 23). No espectro de IR obtido (Figura 53), duas bandas de intensidade fraca, características de estiramento de ligação N-H de amins primárias em aproximadamente 3210 e 3356 cm^{-1} , com o aparecimento de um ombro pequeno em 3448 cm^{-1} , característico de amins primárias foram observadas. Também é possível observar duas bandas de intensidade média, de estiramento de ligação C-H, característico de carbono alifático, mais precisamente de um carbono primário de metila em 2857 e 2928 cm^{-1} . Outras bandas de intensidade fraca em 1404, 1506, 1635 e 1651 cm^{-1} , características de estiramento de ligações C=C de carbono aromático foram observadas. Uma banda de intensidade média em 1215 cm^{-1} , característica de estiramento de ligação C-N, e outra banda de alta intensidade em 747 cm^{-1} , característica da vibração da ligação N-H de amins primárias e secundárias também foram observadas. Finalmente, foi observada uma banda de intensidade média em 662 cm^{-1} , característica do estiramento da ligação C-Cl do solvente usado para a solubilização (clorofórmio) (151). Portanto, estes resultados mostram que o produto de coloração castanho escuro observado é um excesso de PTD (Tabelas 5 e 7) que não havia reagido.

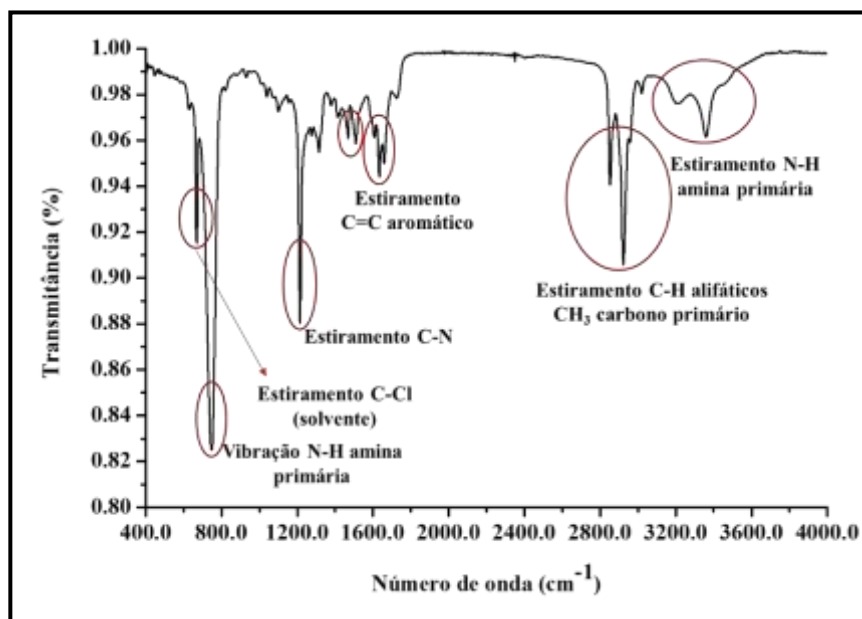


Figura 53. Espectro de IR, obtido em clorofórmio, para o produto de coloração castanho escuro, formado pela reação entre a PTD e o PAF.

Fonte: Autor.

O espectro de IR obtido para o produto de cor castanho claro, Figura 54, mostrou bandas semelhantes ao espectro obtido anteriormente para o PAF (Figura 34). No espectro de IR obtido (Figura 54), foram observadas duas bandas de intensidade fraca, características de estiramento de ligação N-H de amins primárias em aproximadamente 2918 e 2955 cm^{-1} , com o aparecimento de uma pequena banda em 3018 cm^{-1} , muito característico em bandas de amins primárias e secundárias. Outras bandas de intensidade fraca em 1454 e 1516 cm^{-1} , características de estiramento de ligação C=C de carbono aromático foram observadas. Bandas em 1324 e 1379 cm^{-1} , de intensidade fraca, referente à vibração da ligação O-H, e estiramento da ligação C-O de fenóis, respectivamente, foram observadas. Observou-se também uma banda de intensidade média em 1218 cm^{-1} , característica de estiramento de ligação C-N e outra banda de intensidade alta em 739 cm^{-1} característica da vibração da ligação N-H de amins primárias.

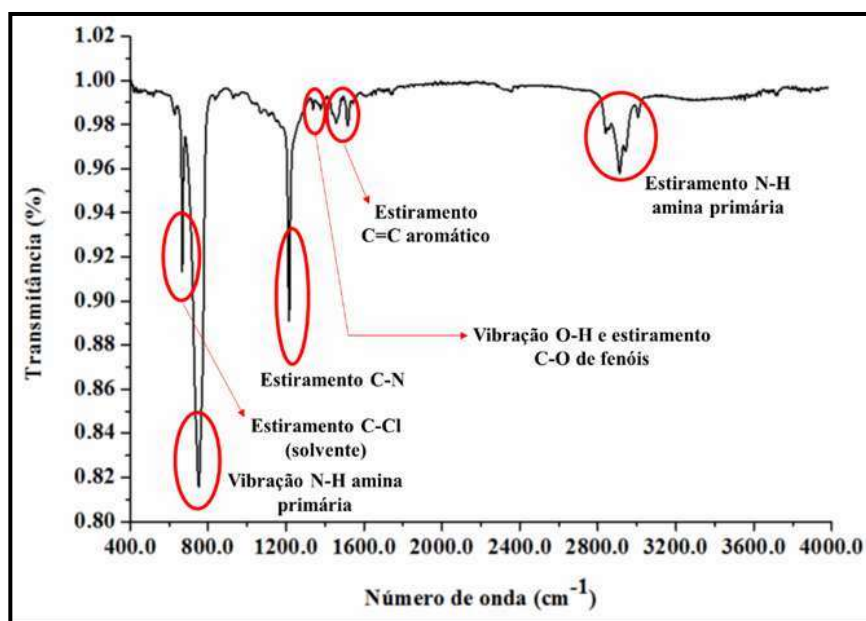


Figura 54. Espectro de IR, obtido em clorofórmio, para o produto de coloração castanho claro, formado pela reação entre a PTD e o PAF.

Fonte: Autor.

Para o produto de coloração roxa, o espectro de IR obtido, Figura 55, mostrou bandas semelhantes ao espectro obtido anteriormente para o derivado da BB (Figura 24). No espectro de IR obtido para o produto de coloração roxa, Figura 55, foi observado duas bandas de intensidade fraca, características de estiramento de ligação N-H de amins primárias, em aproximadamente 3193 e 3364 cm^{-1} , com o aparecimento de um pequeno ombro em

3455 cm^{-1} , característico de amins primárias e secundárias. Duas bandas de intensidade média, características de estiramento de ligação C-H de carbono alifático, mais precisamente de carbono primário de grupamento metila, em 2848 e 2928 cm^{-1} . Outras bandas de intensidade fraca, características de estiramento de ligações C=C de carbono aromático em 1412 , 1419 , 1620 e 1643 cm^{-1} , foram observadas. Uma banda de intensidade baixa foi observada em 1655 cm^{-1} , característica de estiramento de ligação C=N de imina. Uma banda de intensidade média em 1219 cm^{-1} , característica de estiramento de ligação C-N, e outra banda de alta intensidade em 741 cm^{-1} , característica da vibração da ligação N-H de amins primárias e secundárias. Finalmente, uma banda de intensidade média em 670 cm^{-1} , característica do estiramento da ligação C-Cl do solvente usado para a solubilização (clorofórmio) (151). Portanto, estes resultados mostram que o produto de coloração roxo formado é o derivado da BB (Tabelas 5 e 7).

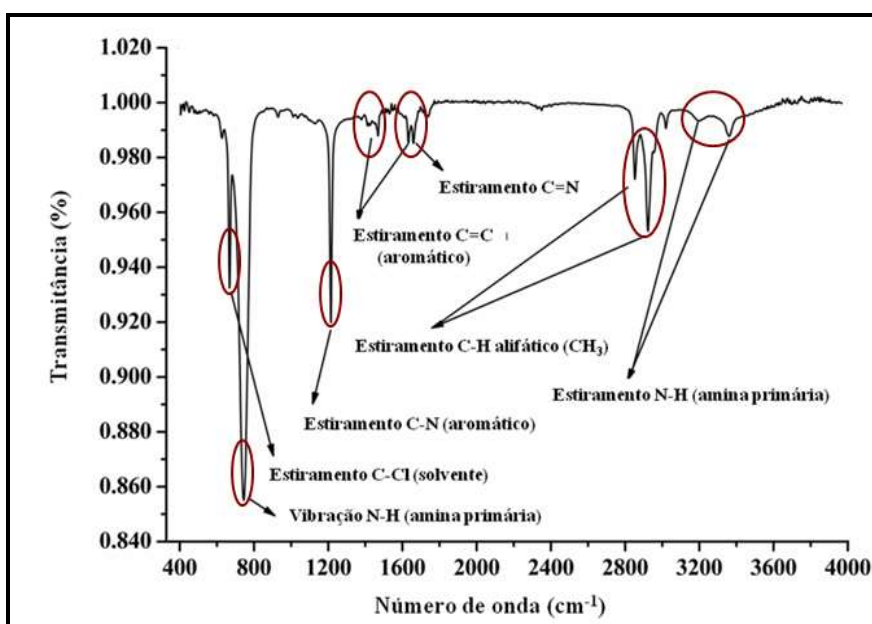


Figura 55. Espectro de IR, obtido em clorofórmio, para o produto de coloração roxo, formado pela reação entre a PTD e o PAF.

Fonte: Autor.

Para o produto de coloração marrom, o espectro de IR obtido, Figura 56, mostrou bandas semelhantes ao espectro obtido anteriormente para o dímero formado pela oxidação do PAF (Figura 35). Para o produto de coloração castanho escuro, o espectro de IR, Figura 56, mostrou duas bandas com intensidade fraca em 2921 e 2952 cm^{-1} , correlacionadas com o alongamento primário da ligação N-H de amins e uma pequena banda em 3021 cm^{-1} ,

característica de bandas de aminas primárias e secundárias. Outras bandas com intensidade fraca em 1454 e 1518 cm^{-1} , característica da ligação $\text{C}=\text{C}$ de carbono aromático foram observadas. Bandas com intensidade fraca em 1341 e 1375 cm^{-1} , relacionadas à vibração da ligação $\text{O}-\text{H}$ e ao alongamento da ligação $\text{C}-\text{O}$ de fenóis, respectivamente, foram observadas. Foi observada uma banda de média intensidade em 1210 cm^{-1} ; característica do alongamento da ligação $\text{C}-\text{N}$. Além disso, foi observada uma banda com alta intensidade em 750 cm^{-1} , relacionada com a vibração da ligação $\text{N}-\text{H}$ de aminas primárias e secundárias. Por fim, foi observada uma banda de intensidade média em 672 cm^{-1} , relacionada com o estiramento da ligação $\text{C}-\text{Cl}$ do solvente utilizado para solubilização da amostra (clorofórmio) (151). Portanto, estes resultados mostram que o produto de coloração marrom formado é o dímero (Tabelas 6 e 7), oriundo da oxidação do PAF.

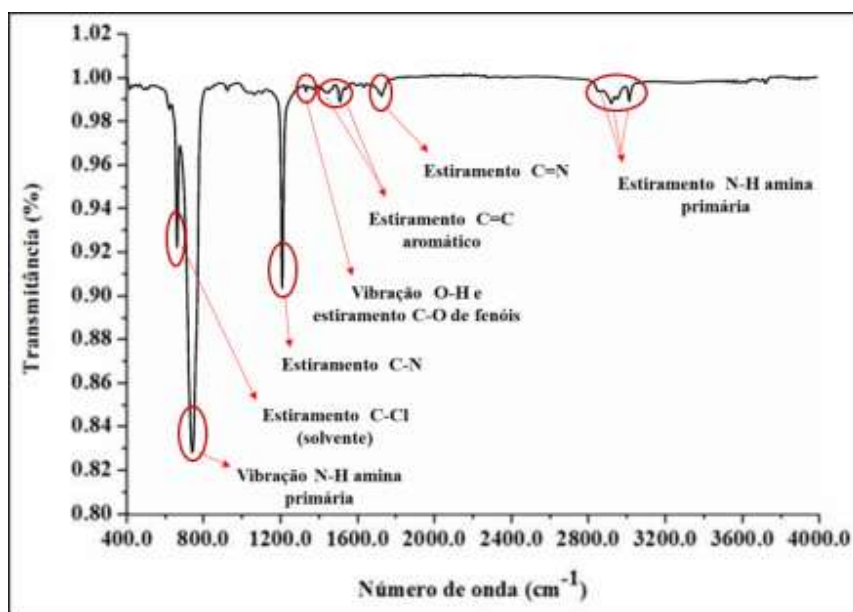


Figura 56. Espectro de IR, obtido em clorofórmio, para o produto de coloração marrom, formado pela reação entre a PTD e o PAF.

Fonte: Autor.

O produto de coloração rosa claro, no espectro de IR obtido, Figura 57, mostrou bandas de absorção semelhantes ao espectro obtido anteriormente para o trímero formado pela oxidação do PAF (Figura 36). Para o produto de coloração rosa claro, o espectro de IR, Figura 57, mostrou duas bandas com intensidade fraca em 2922 e 2951 cm^{-1} , características do alongamento primário da ligação $\text{N}-\text{H}$ de aminas, e uma banda pequena em 3021 cm^{-1} , banda característica de aminas primárias e secundárias. Outras bandas com intensidade fraca em

1460 e 1519 cm^{-1} , relacionadas com a ligação C=C de carbono aromático foram observadas. Bandas com intensidade fraca em 1333 e 1379 cm^{-1} , relacionadas à vibração da ligação O-H e ao estiramento da ligação C-O de fenóis, respectivamente, foram observadas. Foi observada uma banda de média intensidade em 1213 cm^{-1} , relacionada ao alongamento característico da ligação C-N. Além disso, foi observada uma banda de alta intensidade em 748 cm^{-1} , relacionada a vibração da ligação N-H de aminas primárias e secundárias. Observou-se outra banda com intensidade média em 663 cm^{-1} , associado ao estiramento da ligação C-Cl do solvente utilizado para solubilização da amostra (clorofórmio) (151). Portanto, estes resultados mostram que o produto de coloração rosa claro formado é o trímero, oriundo da oxidação do PAF (Tabelas 6 e 7).

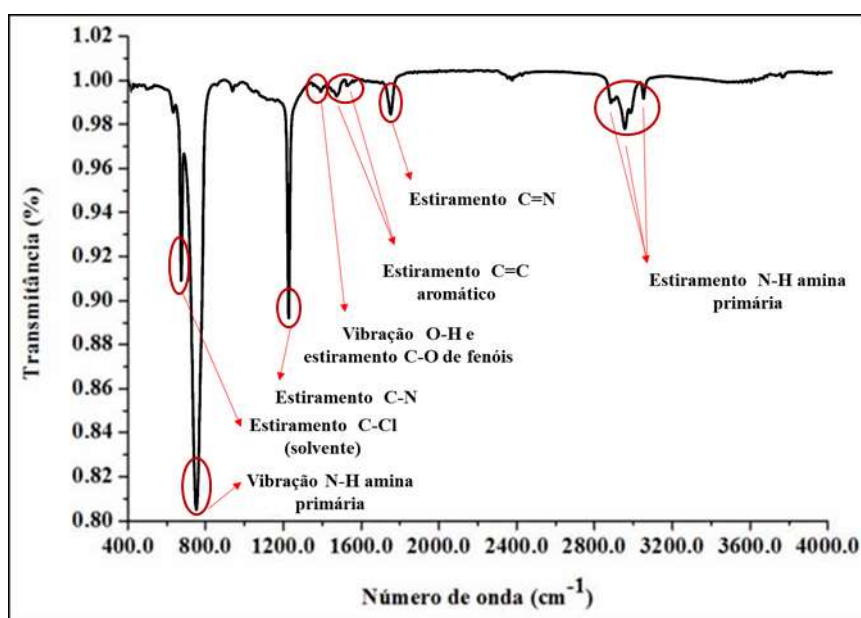


Figura 57. Espectro de IR, obtido em clorofórmio, para o produto de coloração rosa claro, formado pela reação entre a PTD e o PAF.

Fonte: Autor.

O espectro de IR obtido para o composto de coloração rosa escuro (Produto 2, Tabela 7), Figura 58, mostrou duas bandas de intensidade fraca, características de estiramento de ligação N-H de aminas primárias, em aproximadamente 3389 e 3408 cm^{-1} , com o aparecimento de uma pequena banda em 3385 cm^{-1} , muito característico de aminas primárias e secundárias. Outras bandas de intensidade fraca em 1570 e 1591 cm^{-1} , características de estiramento de ligação C=C de carbono aromático foram observadas. Bandas em 1415 e 1467 cm^{-1} , de intensidade fraca, referente à vibração da ligação O-H e estiramento da ligação C-O

de fenóis, respectivamente, foram observadas. Notou-se também uma banda de intensidade média em 1216 cm^{-1} , característica do estiramento de ligação C-N e outra banda de intensidade alta em 760 cm^{-1} característica da vibração da ligação N-H de amina primária e secundária. Por fim uma banda de intensidade média em 665 cm^{-1} característica de estiramento da ligação C-Cl oriunda do solvente utilizado para a solubilização do composto (151). Portanto, estes resultados mostram que o produto de coloração rosa escuro formado é o Produto 2 (Tabela 7), oriundo da reação entre a PTD e o PAF.

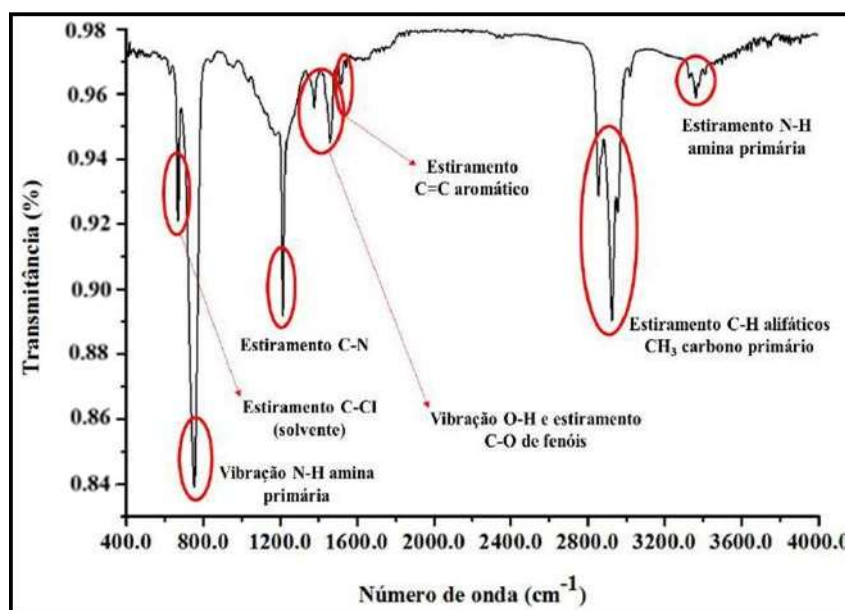


Figura 58. Espectro de IR, obtido em clorofórmio, para o produto de coloração rosa escuro, formado pela reação entre a PTD e o PAF.

Fonte: Autor.

O espectro de IR obtido para o composto de coloração marrom escuro (Produto 3, Tabela 7) Figura 59, mostrou duas bandas de intensidade fraca, características do estiramento de ligação N-H de aminas primárias, em aproximadamente 3387 e 3407 cm^{-1} , com o aparecimento de uma pequena banda em 3381 cm^{-1} , muito característico de aminas primárias e secundárias. Outras bandas de intensidade fraca em 1572 e 1583 cm^{-1} , características de estiramento de ligação C=C de carbono aromático foram observadas. Bandas em 1412 e 1460 cm^{-1} , de intensidade fraca, referente à vibração da ligação O-H e estiramento da ligação C-O de fenóis, respectivamente, foram observadas. Notou-se também uma banda de intensidade média em 1215 cm^{-1} , característica de estiramento da ligação C-N e outra banda de intensidade alta em 768 cm^{-1} característica da vibração da ligação N-H de aminas primárias e

secundárias. Por fim uma banda de intensidade média em 671 cm^{-1} característica de estiramento da ligação C-C oriunda do solvente utilizado para a solubilização do composto (151). Portanto, estes resultados mostram que o produto de coloração rosa escuro formado é o Produto 3 (Tabela 7), oriundo da reação entre a PTD e o PAF.

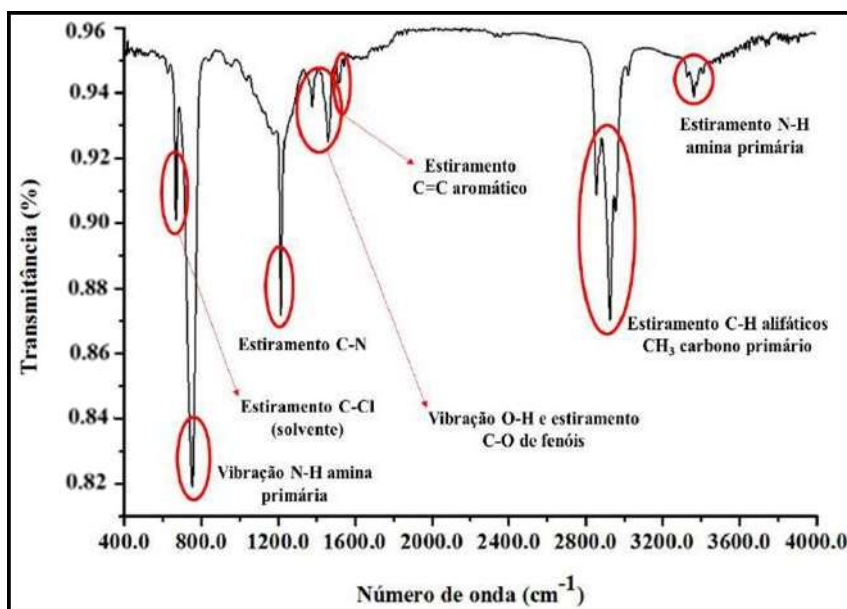


Figura 59. Espectro de IR, obtido em clorofórmio, para o produto de coloração marrom escuro, formado pela reação entre a PTD e o PAF.

Fonte: Autor.

O espectro de IR obtido para o precipitado (Produtos 4,5,6 e 7, Tabela 7), Figura 60, formado pela reação entre a PTD e o PAF, mostrou duas bandas de intensidade fraca, características do estiramento da ligação N-H de aminas primárias em aproximadamente 3392 e 3403 cm^{-1} com o aparecimento de uma pequena banda em 3385 cm^{-1} , muito característico de aminas primárias e secundárias. Outras bandas de intensidade fraca em 1574 e 1586 cm^{-1} , características do estiramento da ligação C=C de carbono aromático foram observadas. Bandas em 1409 e 1464 cm^{-1} , de intensidade fraca, referente à vibração da ligação O-H e estiramento da ligação C-O de fenóis, respectivamente, foram observadas. Notou-se também uma banda de intensidade média em 1213 cm^{-1} , característica do estiramento da ligação C-N e outra banda de intensidade alta em 762 cm^{-1} característica da vibração da ligação N-H de aminas primárias e secundárias. Por fim uma banda de intensidade média em 668 cm^{-1} característica do estiramento da ligação C-Cl oriunda do solvente utilizado para a solubilização do precipitado (Produtos 4,5,6 e 7, Tabela 7). (151)

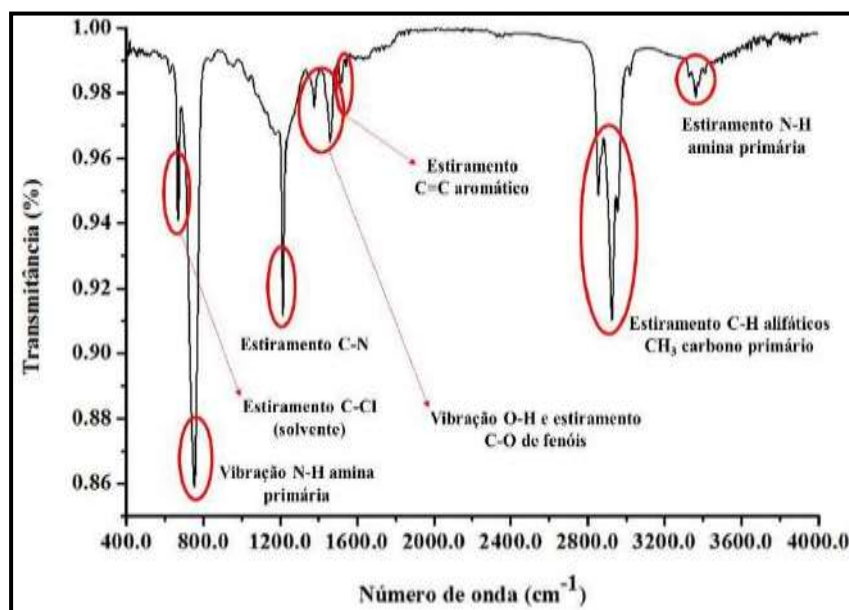


Figura 60. Espectro de IR, obtido em clorofórmio, para o produto precipitado, formado pela reação entre a PTD e o PAF.

Fonte: Autor.

5.1.14. Caracterização dos produtos de reação entre a PTD e o PAF por ^1H -RMN

Os espectros de ^1H -RMN para os compostos de coloração castanho escuro, castanho claro, roxo, marrom e rosa claro (dados não mostrados) foram semelhantes aos obtidos anteriormente para os mesmos produtos aos quais foram atribuídos. O produto de coloração castanho escuro foi atribuído como sendo a PTD, o produto de coloração castanho claro como sendo o PAF, o produto de coloração roxa como sendo o derivado da BB, e os produtos de coloração marrom e rosa claro como sendo, respectivamente, o dímero e o trímero formados pela oxidação do PAF. As estruturas propostas para todos esses compostos são mostradas nas Tabelas 5,6 e 7.

O espectro de ^1H -RMN obtido para o produto de coloração rosa escuro (Produto 2, Tabela 7), Figura 61, mostrou em 1,9 ppm a presença de um pico singlete de intensidade forte, muito característico de grupamento metila ligado a anel aromático, que integrado mostra ser referente a 6 hidrogênios, podendo assim ser atribuído aos 2 grupos metila da molécula do produto 2 (Tabela 7). Observa-se também picos entre 7,7 e 8,0 ppm, referentes aos hidrogênios ligados ao anel aromático, demarcados como “HA”, “HB” e “HC” na

molécula do Produto 2, inserida no espectro. Um pico dubleto em 7,9 ppm, atribuído ao hidrogênio “HA”, referente a um acoplamento em orto com o hidrogênio “HC”, que aparece um pouco mais deslocado em relação aos demais picos, foi observado. Um pico dubleto em aproximadamente 7,75 ppm, atribuído ao hidrogênio “HB”, que se acopla em meta com o hidrogênio “HC”, que aparece menos deslocado em relação aos demais picos foi observado. E por fim, dois picos dubletos próximo a 7,9 ppm, atribuídos ao hidrogênio “HC”, referente a um acoplamento em orto com o hidrogênio “HA” e um acoplamento em meta com o hidrogênio “HB” foram observados. (151)

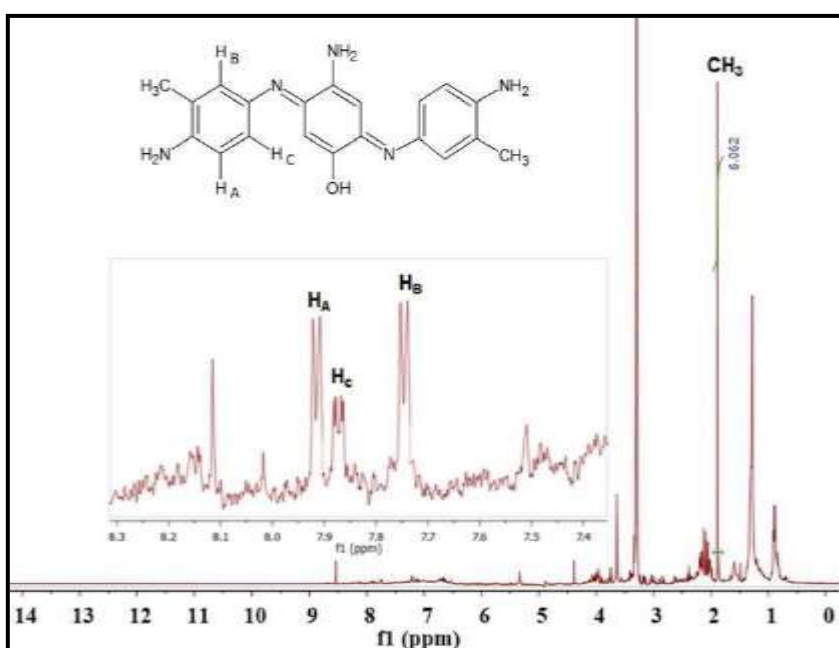


Figura 61. Espectro de ^1H -RMN obtido para o produto de coloração rosa escuro em metanol deuterado. Inserção: Espectro de ^1H -RMN aumentado na faixa de 7,4 a 8,3 ppm e estrutura molecular do Produto 2.

Fonte: Autor.

O espectro de ^1H -RMN obtido para o produto de coloração marrom escuro (Produto 3, Tabela 7), Figura 62, mostrou em 2,1 ppm a presença de um pico singleto de intensidade forte, muito característico de grupamento metila ligado a anel aromático, que integrado mostra ser referente a 3 hidrogênios, atribuído ao grupo metila da molécula do produto 3 (Tabela 7). Observou-se também picos entre 7,0 e 7,2 ppm, referentes aos hidrogênios ligados no anel aromático, demarcados como “HA”, “HB” e “HC” na molécula do Produto 3 inserida no espectro. Um pico dubleto em 7,2 ppm pode ser atribuído ao hidrogênio “HA”, referente a

um acoplamento em orto com o hidrogênio “HC”, aparecendo um pouco mais deslocado em relação aos demais picos. Um pico dubleto na região aproximadamente de 7,0 ppm, atribuído ao hidrogênio “HB”, referente a um acoplamento em meta com o hidrogênio “HC”, aparecendo menos deslocado em relação aos demais picos foram observados. E por fim dois picos dubletos próximos a 7,1 ppm, atribuídos ao hidrogênio “HC”, referente a um acoplamento em orto com o hidrogênio “HA” e um acoplamento em meta com o hidrogênio “HB” foram observados. (151)

Observou-se também mais picos aglomerados entre 6,8 e 6,9 ppm, referentes aos hidrogênios ligados ao outro anel aromático, demarcados como “HD” e “HE”, na molécula do Produto 3 inserida no espectro (Figura 62). Um pico de dois dubletos em torno de 6,8 ppm, atribuído ao hidrogênio “HE”, referente a um acoplamento em orto com o hidrogênio “HD” e um acoplamento em meta com o segundo hidrogênio “HE” foi observado (151). Um outro pico de dois dubletos em aproximadamente 6,9 ppm, atribuído ao hidrogênio “HD”, referente a um acoplamento em orto com o hidrogênio “HE” e um acoplamento em meta com o segundo hidrogênio “HD” foi observado. (151)

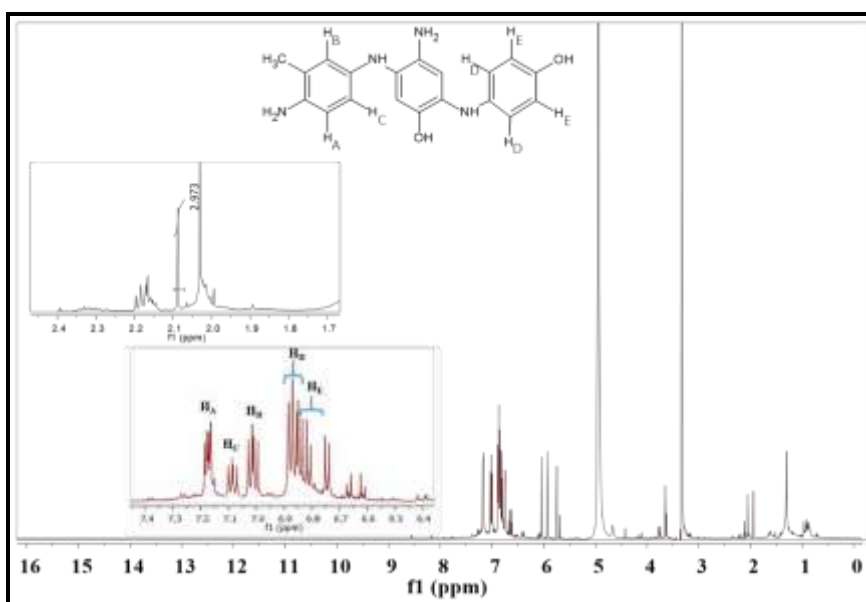


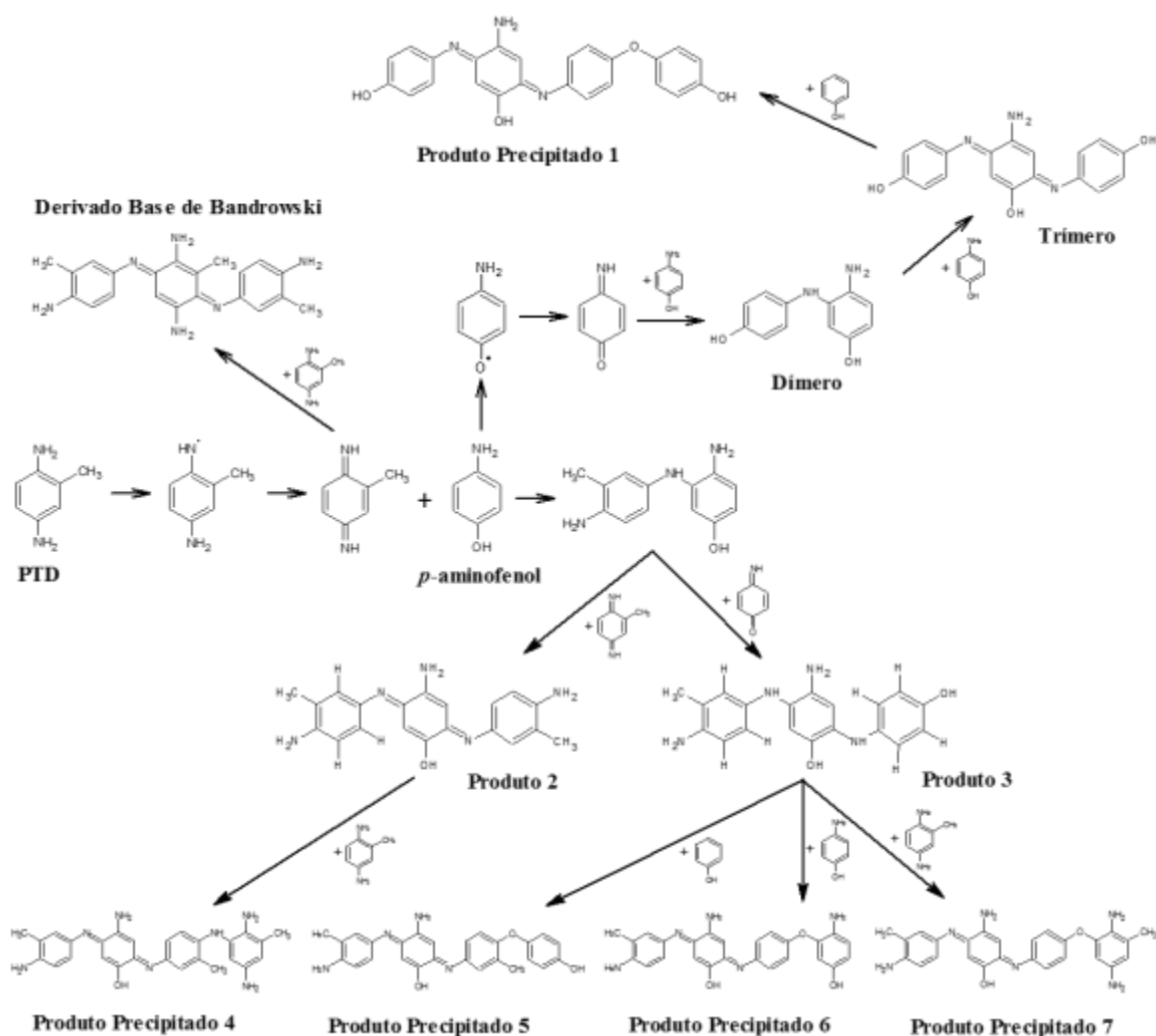
Figura 62. Espectro de ^1H -RMN obtido para o produto de coloração marrom escuro em metanol deuterado. Inserção: Espectro de ^1H -RMN aumentado na faixa de 7,4 a 6,4 ppm e estrutura molecular do Produto 3.

Fonte: Autor.

O espectro de ^1H -RMN obtido para o precipitado formado (dado não mostrado), não permitiu distinguir quais picos eram referentes aos hidrogênios de cada molécula, e assim não houve como caracterizá-los pela técnica. Como dito anteriormente, o precipitado formado na verdade era um conjunto dos produtos formados pela reação entre a PTD e o PAF (Produtos 4,5,6 e 7), e pelo tetrâmero formado pela oxidação do PAF.

5.1.15. Reação entre a PTD e o PAF

Levando em consideração todos os estudos realizados neste trabalho, juntamente com alguns estudos disponíveis na literatura (13,44,45,66,76,153-155), o mecanismo da reação entre a PTD e o PAF, em meio oxidante, é proposto no Esquema 7.



Esquema 7. Representação esquemática da reação entre a PTD e o PAF, em meio alcalino, na presença e na ausência de peróxido de hidrogênio.

Fonte: Autor.

Em meio amoniacal contendo oxigênio dissolvido, a reação entre a PTD e o PAF, Esquema 7, ocorre primeiramente com a oxidação da PTD por meio da desprotonação de um grupo amino, formando o intermediário derivado do radical semi-quinonadiimina. Posteriormente, uma nova desprotonação, no segundo grupo amino da molécula, é responsável pela geração do derivado do intermediário quinonadiimina. O derivado do intermediário quinonadiimina reagiu com uma molécula de PAF formando o Produto 1. O Produto 1 reagiu com uma molécula do derivado do radical quinonadiimina e formou o Produto 2 (Esquema 7). O Produto 1 também pode reagir com uma molécula do derivado do radical quinonaimina e formar o Produto 3.

O Produto 2 reagiu com uma molécula de PTD e formou o Produto 4. O Produto 3 reagiu com uma molécula de PTD e formou o Produto 5. No mais, o Produto 3 também reagiu com uma molécula de PAF e formou o Produto 6. E por fim, o Produto 3 reagiu com um radical fenol e formou o Produto 7.

Conforme foi observado no Esquema 7, os produtos secundários oriundos da oxidação da PTD e do PAF também podem ser formados e, competem no mecanismo com a formação dos produtos referentes da reação entre a PTD e o PAF.

5.2. Testes de mutagenicidade e toxicidade dos produtos formados pela reação de oxidação da PTD, do PAF e da reação entre ambos

O ensaio de *Salmonella* é uma avaliação bacteriana de curta duração, amplamente aceita, para identificar substâncias que possam produzir danos genéticos que levam a mutações genéticas (156). Esse ensaio pode ser ainda usado como uma pré-seleção rápida para a avaliação de carcinogenicidade de um composto (157-159). A literatura relata uma alta correlação, cerca de 90%, entre os testes de mutagenicidade e carcinogenicidade em animais. (157-159)

A grande maioria dos compostos que apresentam mutagenicidade são eletrofílicos ou foram metabolizados no organismo antes de promover a formação de tumores (159-160). Os compostos absorvidos e os metabolitos formados por esses compostos podem reagir quimicamente por ligação covalente com as moléculas de ácido nucléico presentes no DNA de bactérias e animais (mamíferos), formando produtos que podem desencadear processos mutagenicos. (98)

Garner e colaboradores (159) juntamente com Ames e colaboradores (98) avaliaram a mutagenicidade de vários compostos, e descobriram que aminas aromáticas substituídas por pelo menos dois grupos aminos, ou dois grupos nitros ou ainda um grupo amino e um grupo nitro têm atividade mutagênica. Eles também descobriram que as aminas aromáticas, na sua grande maioria, que têm em sua estrutura apenas grupos aminos como substituintes, tais como fenilenodiaminas e fenilenotriaminas, exibem mutagenicidade se foram metabolizadas por enzimas presentes no fígado dos mamíferos. Fenilenodiaminas e fenilenotriaminas são compostos amplamente utilizados nas composições da maioria dos corantes capilares comerciais, e parece que os metabolitos produzidos por estes compostos são largamente responsáveis pela mutagenicidade, e por alterações e transformações microssomais nas células dos mamíferos. (159,161-163)

No entanto, algumas fenilenodiaminas e fenilenotriaminas apresentam mutagenicidade na ausência de atividade metabólica, e pouco se sabe sobre o mecanismo de atividade mutagênica dessas aminas (159). Suspeita-se que a atividade mutagênica apresentada por essas aminas provém de sua capacidade de oxidar e reagir entre si, formando compostos com múltiplos anéis, como é descrito amplamente na literatura na oxidação da PFD (8,21,28,43,159) e como observado neste trabalho, nos resultados obtidos pela oxidação da PTD, do PAF e pela reação entre ambos.

Além disso, testes de mutagenicidade realizados, usando *Salmonella Typhimurium* TA1538, demonstraram que estes compostos multi-anelados tiveram atividade mutagênica, corroborando ainda mais com a hipótese. (159)

A PTD é positiva para a reversão da histidina, e o teste de Ames indica potencial genotóxico (98,164-166). No entanto, considerando que os derivados trimeros da PTD são facilmente formados, deve ser relevante avaliar a resposta do derivado da BB pelo teste de Ames. Para isso, o extrato da BB, separado por CCD e identificado, foi submetido ao ensaio de mutagenicidade com a cepa *Salmonella enterica Typhimurium* YG1041, selecionada para este estudo devido a alta sensibilidade à aminas aromáticas (167), na presença e na ausência de ativação metabólica exógena (S9).

Os resultados obtidos no teste de mutagenicidade do derivado da BB, Tabela 8, indicam que as concentrações avaliadas apresentaram ação mutagênica para a bactéria *Salmonella enterica Typhimurium* YG1041, com e sem ativação metabólica (S9), com CEM₂ de 0,4 e 0,8 µg mL⁻¹, respectivamente. Isso indica que linhagens de bactérias com S9

necessitam de uma concentração mínima efetiva duas vezes maior para fornecer o dobro de revertentes comparados ao controle negativo.

O derivado da BB mostrou uma curva clara de resposta de concentração com a cepa selecionada, tanto na presença quanto na ausência de S9 (Tabela 8), indicando atividade mutagênica. O derivado da BB apresentou uma atividade um pouco maior sem o S9, em comparação com o S9 (Tabela 8). Portanto, o derivado da BB tem a capacidade de causar mutações, que são caracterizadas por alterações no quadro de leitura de DNA, que são denominados de mutações do tipo *frameshift*. Resultados semelhantes foram obtidos no estudo de mutagenicidade realizados para a PTD. (98,164-166)

Tabela 8. Resultados dos testes de mutagenicidade obtidos para o derivado da BB, analisada com a cepa *Salmonella* YG1041, com e sem ativação metabólica.

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Sem S9		Com S9	
	Média (n = 4)	D.P. ^c	Média (n = 4)	D.P. ^c
Controle negativo ^a	8,8	1,5	7,0	1,4
0,1	12,0	3,4	11,5	1,9
1,0	33,8 **	5,1	17,3	5,7
10,0	117,3 **	17,6	110,0 **	7,2
Controle Positivo ^b	105,5	4,8	150,0	0,0
CEM ₂ ^d ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,4 (0,5 – 0,3) ^d		0,8 (0,9 – 0,7)	

Nota: ^aDimetilsulfóxido (DMSO);

^b4-nitro-*o*-fenilenodiamina (0,02 $\mu\text{g mL}^{-1}$) sem S9 e 2-aminoantraceno (0,0003 $\mu\text{g mL}^{-1}$) com S9;

^cD.P.: Desvio Padrão da Média;

^dCEM₂: Concentração Efetiva Mínima que forneceu o dobro do número de revertentes do controle negativo e expressa em $\mu\text{g mL}^{-1}$, limites de confiança de ^d90% para o CEM₂ entre parênteses;

** ANOVA ($p < 0,001$).

Fonte: Autor.

Os mesmos testes realizados por Ames e colaboradores (98) para o PAF não mostraram mutagenicidade em bactérias do tipo *Salmonella Typhimurium* (98,164-166). Embora o PAF não tenha demonstrado atividade mutagênica e carcinogênica, o mesmo apresentou sob exposição constante efeito genotóxico (45,66,85). Estudos mostram que a maioria das aminas aromáticas hidroxiladas não apresenta atividade mutagênica, pois estes substituintes do anel impede a ativação dos grupos amino pelo metabolismo do fígado. (159)

Com relação a ativação de aminas aromáticas de anel único, a introdução de um grupo hidroxila na posição orto aos grupos amino, produz compostos que são mutagênicos sem metabolismo hepático. Isso faz com que muitos derivados de aminas aromáticas hidroxiladas sejam altamente reativos com ácidos nucleicos. No entanto, ainda é difícil entender porque algumas dessas aminas aromáticas são potentes mutagênicos sem nenhuma ativação adicional ocorrendo. Duas propostas de mecanismo são possíveis para explicar a atividade biológica dessas aminas: a primeira é que o grupo hidroxila presente nessas aminas podem ser esterificados por uma enzima bacteriana, tal como a tRNA sintetase, a segunda é que os grupos hidroxilas reagem com outro anel para formar corantes de caráter multi-anelado. (159)

Como observado anteriormente, o mecanismo de oxidação do PAF ocorre das duas maneiras. Portanto, considerando que produtos esterificados e multi-anelados são formados com a reação de oxidação do PAF, deve ser relevante avaliar a resposta mutagênica dos compostos formados.

Os resultados obtidos nos testes de mutagenicidade realizados para os produtos Trímero e Precipitado (Tetrâmero), oriundos da oxidação do PAF, Tabelas 9 e 10, respectivamente, não mostraram ação mutagênica com e sem S9, respectivamente, comparados ao controle negativo. Embora esses compostos não mostrem atividade mutagênica, isso não significa que eles causem outros efeitos adversos ao organismo humano e ao meio ambiente.

Tabela 9. Resultados dos testes de mutagenicidade obtidos para o Trímero, analisada com a cepa Salmonella YG1041, com e sem ativação metabólica.

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Sem S9		Com S9	
	Média (n = 4)	D.P. ^c	Média (n = 4)	D.P. ^c
Controle negativo ^a	8,8	1,5	7,0	1,4
0,1	9,5	5,1	8,5	2,4
1,0	8,3	5,2	7,5	3,3
10,0	12,0	8,4	11,0	3,4
Controle Positivo ^b	105,5	4,8	150,0	0,0
Mutagenicidade	Não detectado**		Não detectado**	

Nota: ^aDimetilsulfóxido (DMSO);

^b4-nitro-*o*-fenilenodiamina (0,02 $\mu\text{g mL}^{-1}$) sem S9 e 2-aminoantraceno (0,0003 $\mu\text{g mL}^{-1}$) com S9;

^cD.P.: Desvio Padrão da Média;

** ANOVA ($p > 0,05$), obtidos por comparação com o controle negativo nas concentrações testadas.

Fonte: Autor.

Tabela 10. Resultados dos testes de mutagenicidade obtidos para o Precipitado (tetrâmero), analisada com a cepa *Salmonella* YG1041, com e sem ativação metabólica.

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Sem S9		Com S9	
	Média (n = 4)	D.P. ^c	Média (n = 4)	D.P. ^c
Controle negativo ^a	8,8	1,5	7,0	1,4
0,1	10,0	1,4	9,8	4,2
1,0	7,8	3,9	7,0	2,5
10,0	9,8	2,1	12,8	2,6
Controle positivo ^b	105,5	4,8	150,0	0,0
Mutagenicidade	Não detectado**		Não detectado**	

Nota: ^aDimetilsulfóxido (DMSO);

^b4-nitro-o-fenilenodiamina ($0,02 \mu\text{g mL}^{-1}$) sem S9 e 2-aminoantraceno ($0,0003 \mu\text{g mL}^{-1}$) com S9;

^cD.P.: Desvio Padrão da Média;

** ANOVA ($p > 0,05$), obtidos por comparação com o controle negativo nas concentrações testadas.

Fonte: Autor.

Os testes de mutagenicidade também foram realizados para o conjunto de produtos finais gerados pela reação da PTD com o PAF, em meio alcalino oxidante. De acordo com o Esquema 7, tem-se como produtos finais dessa reação, 4 produtos precipitados (Produtos Precipitados 4, 5, 6 e 7). Esses produtos foram analisados simultaneamente devido à impossibilidade de realizar uma separação satisfatória dos mesmos por CCD. Embora a mistura dos Produtos Precipitados contenha o Produto Precipitado 1, formado pela oxidação do PAF, o mesmo não apresenta mutagenicidade conforme foi concluído anteriormente (Tabela 10), então sua presença não afetará os resultados obtidos nestes testes. Os resultados obtidos para os testes de mutagenicidade desses produtos precipitados formados são mostrados na Tabela 11.

Os resultados obtidos no teste de mutagenicidade dos Produtos Precipitados 4, 5, 6 e 7, Tabela 7, apresentaram ação mutagênica para a bactéria *Salmonella enterica* Typhimurium YG1041 somente com S9, com CEM₂ de $10,0 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$. Essa concentração é cerca de 12,5 vezes maior comparada a concentração observada para o derivado da BB. Isso indica que os Produtos Precipitados 4, 5, 6 e 7 necessitam estar em uma quantidade 12,5 vezes maior para fornecer o dobro de revertentes do controle negativo. Portanto, o derivado da BB apresenta maior efeito mutagênico comparado aos produtos formados pela reação entre a PTD e o PAF.

Tabela 11. Resultados dos testes de mutagenicidade obtidos para os produtos Precipitados 4,5,6 e 7, analisados com a cepa Salmonella YG1041, com e sem ativação metabólica.

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Sem S9		Com S9	
	Média (n = 4)	D.P. ^c	Média (n = 4)	D.P. ^c
Controle negativo ^a	9,0	1,5	7,0	1,4
0,1	8,0	3,6	10,0	3,7
1,0	8,0	2,0	8,0	2,9
10,0	9,0	2,9	15,0	2,9
Controle positivo ^b	105,5	4,8	150,0	0,0
CEM ₂ ^d ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Não detectado**		10,0**	

Nota: ^aDimetilsulfóxido (DMSO);

^b4-nitro-*o*-fenilenodiamina (0,02 $\mu\text{g mL}^{-1}$) sem S9 e 2-aminoantraceno (0,0003 $\mu\text{g mL}^{-1}$) com S9;

^cD.P.: Desvio Padrão da Média;

^dCEM₂: Concentração Efetiva Mínima que forneceu o dobro do número de revertentes do controle negativo e expressa em $\mu\text{g mL}^{-1}$, limites de confiança de ^d90% para o CEM₂ entre parênteses;

** ANOVA ($p > 0,05$), obtidos por comparação com o controle negativo nas concentrações testadas.

Fonte: Autor.

Os compostos químicos encontrados nas tinturas capilares sintéticas permanentes como precursores, acopladores, aditivos entre outros são considerados de certa forma os compostos mais reativos da indústria cosmética, o que torna o processo de tingimento dos cabelos bastante complexo (8,44,45). Isso faz com que o potencial toxicológico dessas tinturas não seja só de responsabilidade dos compostos puros utilizados nas composições desses produtos, mas também pelos produtos secundários gerados pela oxidação e reação desses compostos formados durante o processo de tingimento dos cabelos. (43-45)

Os testes de toxicidade com *Daphnia similis* são empregados para avaliação preliminar da toxicidade aguda e crônica de amostras ambientais, estimar os efeitos potenciais de agentes tóxicos sobre uma determinada comunidade de seres vivos, e fazem parte dos programas de avaliação da qualidade de amostras ambientais, juntamente com outros bioensaios. (168)

Os microcrustáceos *Daphnia similis* são recomendados por diversos órgãos internacionais e nacionais, para a avaliação da toxicidade aguda e crônica de amostras de águas e efluentes, principalmente por apresentarem alta sensibilidade e por se reproduzirem por partenogênese, o que mantém a uniformidade genética (168,169). A *Daphnia similis* é um

microcrustáceo filtrador que faz parte do zooplâncton de água doce. Em condições ambientais favoráveis, reproduz-se assexuadamente por partenogênese e origina uma população constituída apenas por fêmeas geneticamente idênticas à mãe. (169)

Os ensaios de ecotoxicidade aguda indicam a possibilidade de organismos aquáticos, no caso a *Daphnia similis*, morrer em função da presença de toxicidade na amostra testada. É um teste que indica se a água contaminada pode causar efeito tóxico letal aos indivíduos nativos. (168)

Os testes de toxicidade foram realizados com *Daphnia similis*, tanto para todos os produtos finais obtidos quanto para somente os produtos solúveis em água, oriundos da reação entre a PTD e o PAF em meio alcalino oxidante. Os resultados dos testes de toxicidade são mostrados na Tabela 12.

Tabela 12. Teste de toxicidade aguda em *Daphnia similis*. Resultados expressos em efeito concentração 50%, 48 horas (EC50).

Amostra	CE(I)50 (faixa %)
Produto Reação PTD + PAF (todos)	< 0,01 a > 0,001
Produto Reação PTD + PAF (solúveis em água)	< 0,01 a > 0,001
Tampão amônio 0,1 mol L ⁻¹ (pH 8,00)	< 1,0 a > 0,1

Fonte: Autor.

Os resultados de testes realizados, tanto para a PTD quanto PAF, e seus derivados mostraram que esses compostos são extremamente tóxicos (27,28,30,33,44,45,66,76,78-82,85,87). Neste estudo, os resultados obtidos nos testes de toxicidade para os produtos finais da reação entre a PTD e o PAF, em todas as amostras analisadas mostraram-se altamente tóxicos para a *Daphnia similis*, conforme é mostrado na Tabela 12. O resultado dos testes é expresso em Concentração Efetiva Inicial Mediana - CE(I)50 – 48 horas, que corresponde à concentração da amostra no início do ensaio, que causa efeito agudo, ou a morte de 50% dos organismos expostos em 48 horas, nas condições de teste. (168)

Embora o tampão amônio também mostre ser tóxico (EC50, 48 horas) na faixa de < 0,1, a concentração do efluente era muito mais baixa e mais tóxica, com EC50, 48 horas na

faixa de $< 0,01$ a $> 0,001\%$. Portanto, tanto todos os produtos juntos, solúveis e insolúveis em água, quanto somente os solúveis, mostraram-se extremamente tóxicos para *Daphnia similis*.

O uso do bioindicador *Daphnia similis*, para avaliação da toxicidade dos produtos finais obtidos pela reação da PTD com o PAF, constituiu uma ferramenta indispensável para previsão do impacto que os efluentes, oriundos do processo de tingimento dos cabelos, poderiam causar à biota de um corpo hídrico ao qual esses resíduos estejam sendo despejados, além de indicar o nível de toxicidade desses compostos com os organismos vivos aquáticos.

Conforme foi observado, esses compostos presentes nesses resíduos são altamente tóxicos, podendo causar impactos e danos intensos a todo um ecossistema em que esses resíduos ou compostos estejam sendo descartados, uma vez que provoca a morte imediata da *Daphnia similis*, que é uma espécie de extrema e essencial importância para a manutenção de qualquer ecossistema de água doce. A *Daphnia similis* é a base da cadeia alimentar de quase todos os ecossistemas de água doce, como rios, lagos, represas, etc. A morte dessa espécie pode afetar toda a cadeia alimentar, provocando a morte e a extinção das demais espécies que compõem todo esse ecossistema.

No mais, os testes com *Daphnia similis* podem servir de indicativo da qualidade da água de uma determinada região, mostrando indícios se está água está própria ou não para o consumo humano, e se está ou não contaminada. Conforme observado nos testes, os compostos produzidos pela oxidação da PTD e PAF, bem como da reação entre ambos são bastante tóxicos e pode contaminar corpos d'água se não descartados ou tratados adequadamente, tornando-a imprópria para o consumo humano e prejudicando toda a biota aquática.

5.3. Desenvolvimento da metodologia analítica para a determinação de PTD e PAF em amostras de águas e rejeitos de salão de cabeleireiros por CLAE/DAD e MS/MS

A técnica de CLAE, acoplada a diversos detectores, é um dos métodos mais utilizados para a análise de corantes e compostos derivados de corantes em diferentes matrizes e amostras (43-45,124,125,128-130,170). Portanto, para determinar a quantidade de PTD e PAF em amostras de água e de efluente de salão de cabeleireiros foi utilizada a técnica de CLAE/DAD.

A Figura 63 mostra o cromatograma obtido para os padrões de PTD e PAF, a uma concentração de $50,0 \text{ mg L}^{-1}$, em fase móvel composta de tampão acetato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH

5,6):acetonitrila 98:2 (v/v), respectivamente, fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura da coluna de $40,0^\circ\text{C}$, volume de injeção de $20,0 \mu\text{L}$ e comprimento de onda de $\lambda = 236 \text{ nm}$.

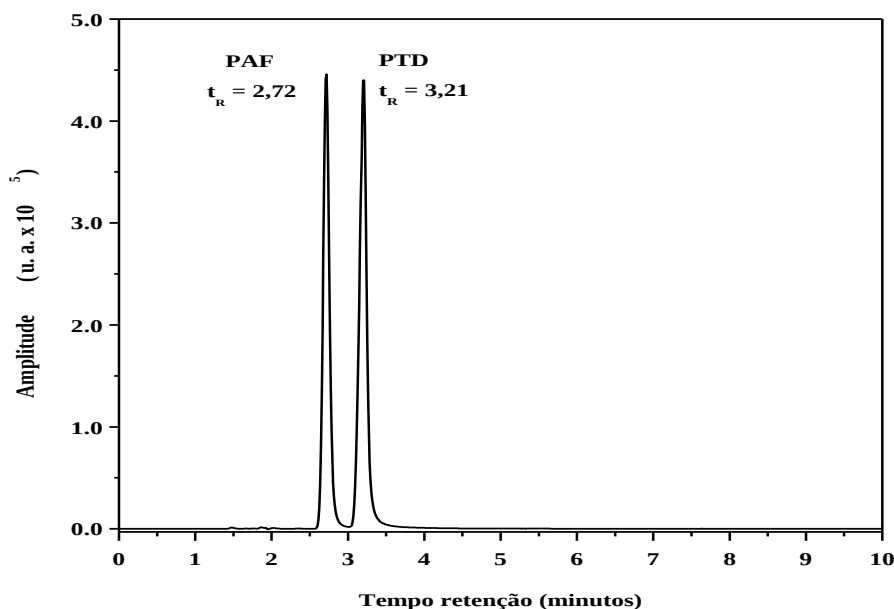


Figura 63. Cromatograma obtido por CLAE/DAD para os padrões de PTD e PAF a uma concentração de $50,0 \text{ mg L}^{-1}$. Fase móvel tampão acetato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,6):acetonitrila 98:2 (v/v), respectivamente, fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura da coluna de $40,0^\circ\text{C}$, volume de injeção de $20,0 \mu\text{L}$ e comprimento de onda de $\lambda = 236 \text{ nm}$.

Fonte: Autor.

O cromatograma da Figura 63, mostra a corrida cromatográfica obtida por CLAE/DAD para a determinação simultânea da PTD e do PAF. O tempo total de corrida para o método desenvolvido foi de dez minutos, sendo que os compostos alvo tem tempos de retenção antes dos quatro minutos (Figura 63). O restante do tempo de corrida foi condicionado para limpeza e condicionamento da coluna para uma nova injeção de amostra.

Para a limpeza da coluna, foi utilizado um tempo que varia de quatro a seis minutos com 100% de acetonitrila. Para o condicionamento da coluna com a fase móvel, tampão acetato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,6):acetonitrila 98:2 (v/v), respectivamente, o tempo estipulado foi de quatro minutos no total, variando de seis até dez minutos.

As condições ótimas de separação foram de fase móvel composta de tampão acetato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,6):acetonitrila 98:2 (v/v), respectivamente, fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura da coluna de $40,0^\circ\text{C}$, volume de injeção de $20,0 \mu\text{L}$ e comprimento de onda de 236 nm . Sob essas condições, tanto a PTD quanto o PAF apresentam picos cromatográficos

com boa definição e resolução, o que contribui para uma boa separação dos compostos. A PTD apresentou um tempo de retenção (t_R) de 3,21 minutos e o PAF um t_R de 2,72 minutos (Figura 63). Os demais parâmetros cromatográficos obtidos estão mostrados na Tabela 13.

Tabela 13. Parâmetros cromatográficos obtidos para a PTD e para o PAF por CLAE/DAD.

Parâmetro cromatográfico	PTD	PAF
Tempo de retenção (t_R)	3,21	2,72
Tempo de retenção corrigido (t_R')	1,29	0,80
Assimetria (A)	1,05	1,19
Seletividade (α)	0,62	1,61
Número pratos teóricos (N)	3738,45	3653,53
Altura prato teórico (H/cm)	0,040	0,041
Resolução (R_s)	2,51	2,51

Fonte: Autor.

Uma curva analítica foi obtida para a PTD, e é representada pela equação $\text{Área} = 53544C_{(PTD)} + 494,5$ ($R^2 = 0,9990$). A curva mostrou-se linear até a concentração de $500,0 \text{ mg L}^{-1}$. Limites de detecção e de quantificação (obtidos pela relação de sinal analítico de 3 vezes e 10 vezes a altura do sinal do ruído, respectivamente) foram de $0,03$ e $0,08 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente. O desvio padrão relativo intra e interdia foram calculados por repetições de três concentrações distintas ($0,5$; $1,0$ e $50,0 \text{ mg L}^{-1}$) dentro da faixa linear da curva analítica e os desvios médios intra e interdia foram de $4,2\%$ e $7,6\%$, respectivamente.

Uma curva analítica também foi obtida para o PAF, e é representada pela equação $\text{Área} = 61129C_{(PAF)} + 234,5$ ($R^2 = 0,9994$). A curva mostrou-se linear até a concentração de $300,0 \text{ mg L}^{-1}$. Limites de detecção e de quantificação (obtidos pela relação de sinal analítico de 3 vezes e 10 vezes a altura do sinal do ruído, respectivamente) foram de $0,02$ e $0,05 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente. O desvio padrão relativo intra e interdia, foram calculados por repetições de três concentrações distintas ($0,5$; $1,00$ e $50,00 \text{ mg L}^{-1}$) dentro da faixa linear da curva analítica e os desvios médios intra e interdia foram de $3,9\%$ e $5,4\%$, respectivamente.

A recuperação do método foi avaliada nas amostras de água da estação de tratamento de água antes e após tratamento e, efluente de salão de cabeleireiros. Para isso, as amostras foram fortificadas com concentrações conhecidas de PTD e PAF de $0,5$; $1,0$ e $50,0 \text{ mg L}^{-1}$ para ambos os analitos, dentro da faixa linear da curva analítica para cada analito. As Tabelas

14 e 15 mostram a recuperação média e as recuperações obtidas para a PTD e para o PAF, respectivamente, nas concentrações estudadas.

Os valores de recuperação obtidos tanto para a PTD quanto para o PAF mostraram-se bastante satisfatórios para todas as concentrações e amostras avaliadas, considerando que as amostras utilizadas para a aplicação do método são bastante complexas e passaram por um dispendioso processo de tratamento.

Tabela 14. Valores de recuperação obtidos para a PTD nas amostras de água e efluente de salão de cabeleireiros.

Amostra	[PTD] adicionada (mg L ⁻¹)	[PTD] encontrada (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)
Água antes do tratamento	0,5	0,5	96,0	97,2
	1,0	0,9	97,6	
	50,0	49,0	98,1	
Água tratada	0,5	0,5	96,8	98,1
	1,0	1,0	98,4	
	50,0	49,5	99,0	
Efluente salão de cabeleireiros	0,5	0,5	95,3	96,6
	1,0	0,9	96,6	
	50,0	48,9	97,9	

Fonte: Autor.

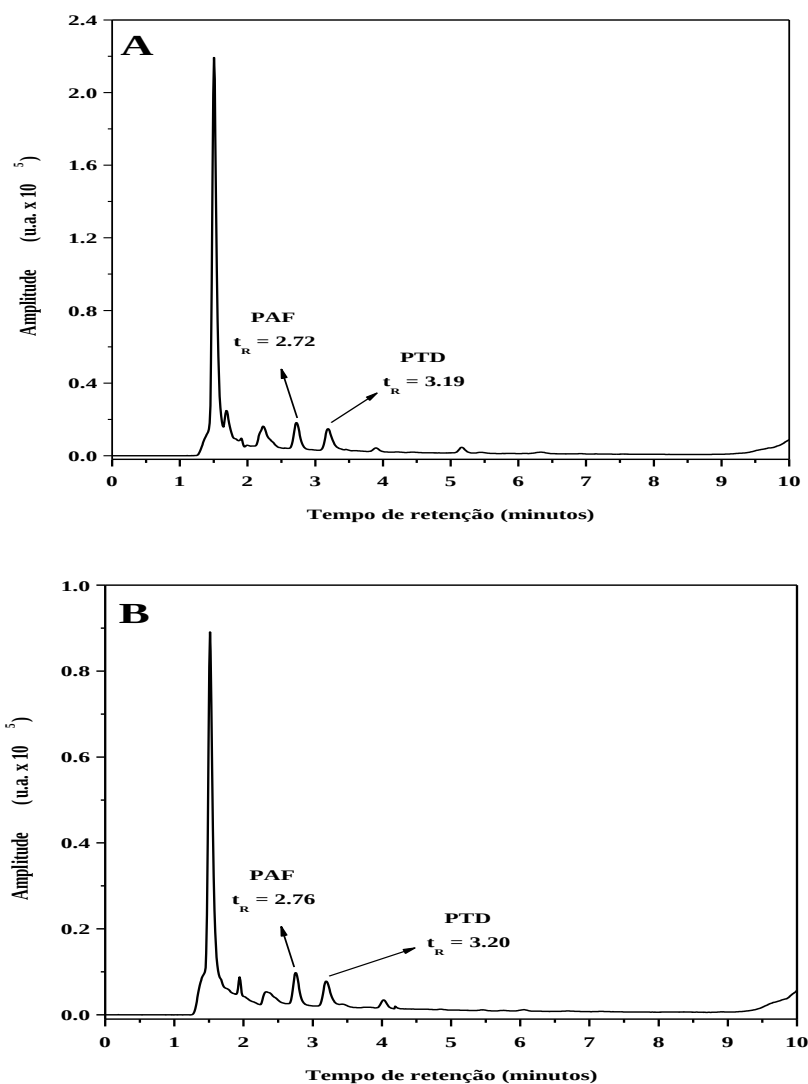
Tabela 15. Valores de recuperação obtidos para o PAF nas amostras de água e efluente de salão de cabeleireiros.

Amostra	[PAF] adicionada (mg L ⁻¹)	[PAF] encontrada (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)
Água antes do tratamento	0,5	0,5	95,7	96,6
	1,0	0,9	96,4	
	50,0	48,9	97,7	

Água tratada	0,5	0,5	95,8	97,1
	1,0	0,9	97,4	
	50,0	49,0	98,0	
Efluente salão de cabeleireiros	0,5	0,5	95,5	96,1
	1,0	0,9	95,9	
	50,0	48,5	96,9	

Fonte: Autor.

A quantificação da PTD e do PAF foram realizadas em todas as amostras pelo método de adição de padrão e em três diferentes concentrações, de 0,4; 0,8 e 1,0 mg L⁻¹ para ambos os analitos. A Figura 64 mostra os cromatogramas obtidos para as amostras de água antes do tratamento, após o tratamento e efluente de salão de cabeleireiros.



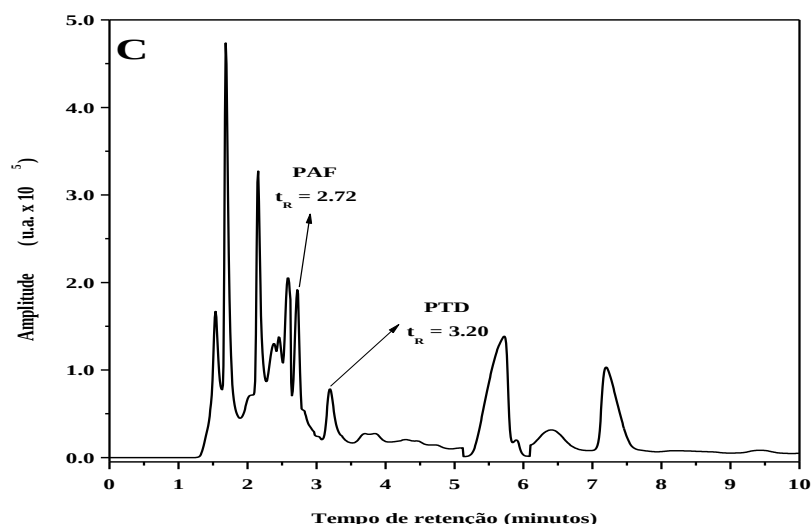


Figura 64. Cromatogramas obtidos por CLAE/DAD para as amostras de água antes do tratamento (A), após o tratamento (B) e efluente de salão de cabeleireiros (C). Fase móvel tampão acetato 0,01 mol L⁻¹ (pH 5,6):acetonitrila 98:2 (v/v), respectivamente, fluxo de 1,0 mL min⁻¹, temperatura da coluna de 40,0 °C, volume de injeção de 20,0 µL e comprimento de onda de $\lambda = 236$ nm.

Fonte: Autor.

O cromatograma obtido para amostra de água da estação de tratamento de água antes do tratamento, Figura 64A, apresentou tempos de retenção (t_R) para a PTD de 3,19 minutos e para o PAF de 2,72 minutos. A concentração de PTD e PAF encontradas para amostra de água da estação de tratamento de água antes do tratamento foi de $2,48 \pm 0,10 \times 10^{-3}$ mg L⁻¹ e $1,90 \pm 0,30 \times 10^{-3}$ mg L⁻¹, respectivamente.

O cromatograma obtido para amostra de água da estação de tratamento de água após o tratamento, Figura 64B, apresentou tempos de retenção (t_R) para a PTD de 3,20 minutos e para o PAF de 2,76 minutos. A concentração de PTD e PAF encontradas para amostra de água da estação de tratamento de água após o tratamento foi de $1,77 \pm 0,10 \times 10^{-3}$ mg L⁻¹ e $1,30 \pm 0,20 \times 10^{-3}$ mg L⁻¹, respectivamente.

O cromatograma obtido para amostra de efluente de salão de cabeleireiros, Figura 64C, mostraram a presença de pelo menos sete picos em t_R , 1,55, 1,69, 2,16, 2,60, 2,74, 3,15, 5,73, 6,41 e 7,20 minutos, isto indica que, após o tingimento dos cabelos, muitos outros compostos são descartados no efluente. No mais, o cromatograma obtido apresentou tempos de retenção (t_R) para a PTD de 3,20 minutos e para o PAF de 2,72 minutos. A concentração de

PTD e PAF encontradas para amostra de efluente de salão de cabeleireiros foi de $2,10 \pm 0,20$ mg L⁻¹ e $2,08 \pm 0,50$ mg L⁻¹, respectivamente.

O espectro de massas, *full scan*, obtido para a amostra de efluente de salão de cabeleireiros, Figura 65, indica a presença de diversos íons com relação *massa/carga*, correspondentes à aqueles esperados para a oxidação da PTD, do PAF e da reação entre ambos.

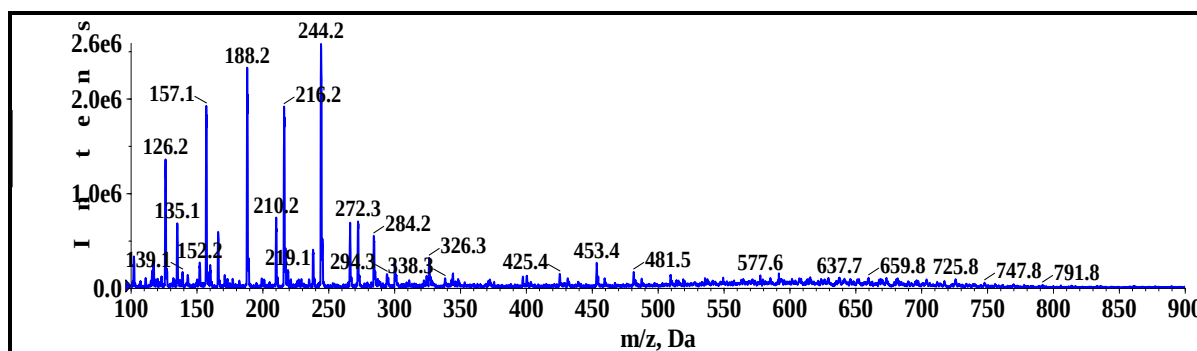


Figura 65. Espectro de massas *full scan* obtido para a amostra de efluente de salão de cabeleireiros.

Fonte: Autor.

A Figura 66A, mostra a amplificação do espectro de massas da amostra de efluente de salão de cabeleireiros na faixa de *m/z* de 100 a 150 Da, onde foi identificado pequenas quantidades de PTD (*m/z* 123,1), PAF (*m/z* 110,1) e do intermediário derivado da quinonaimina (*m/z* 108,0).

O espectro ampliado na faixa de *m/z* de 200 a 250 Da, Figura 66B, mostrou grande quantidade do Dímero (*m/z* 217,2). Em pequena quantidade foi identificado a presença do Produto 1 (*m/z* 230,0) (Tabela 7, páginas 138 a 140).

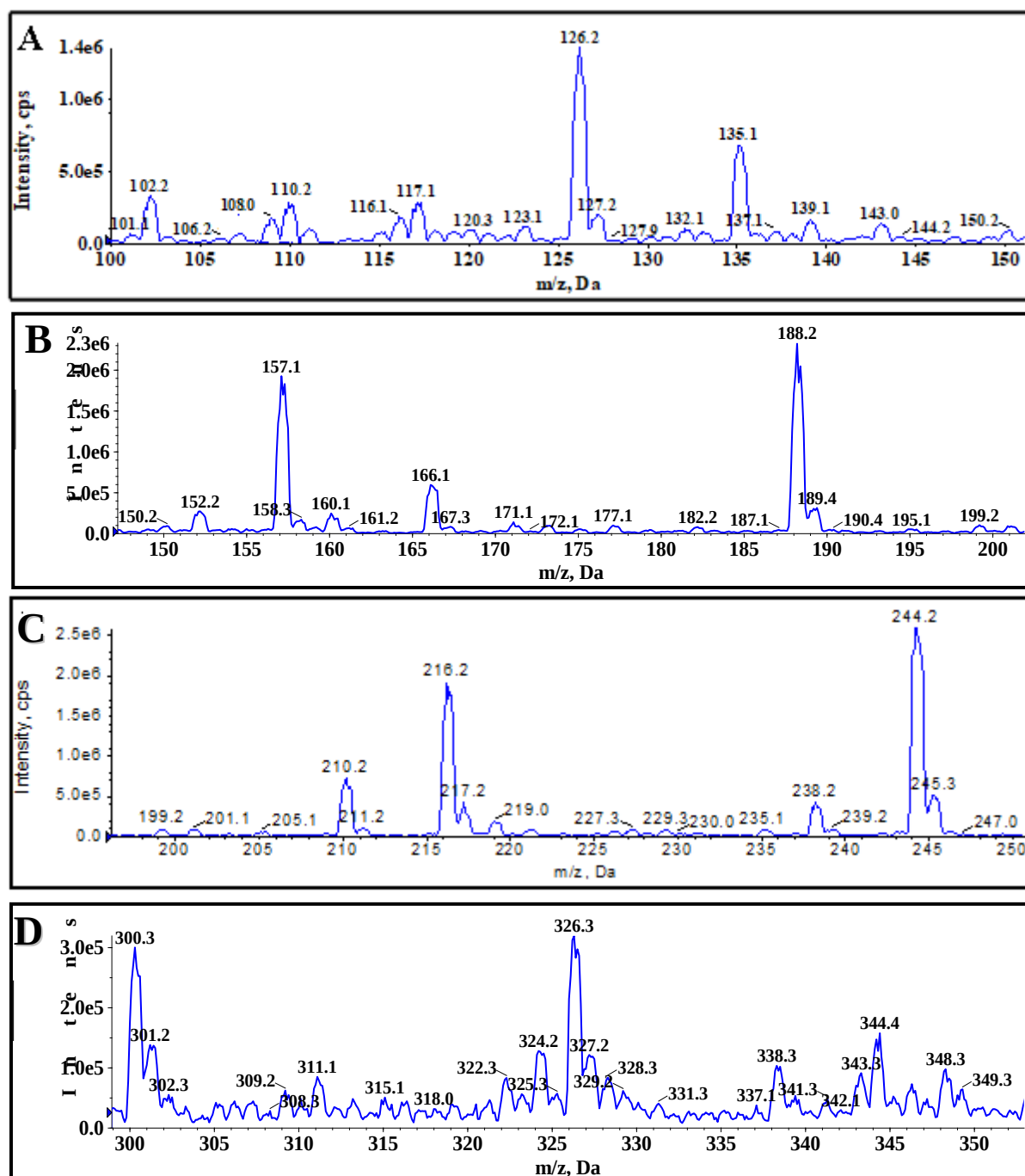
O espectro ampliado na faixa de *m/z* de 300 a 350 Da, Figura 66C, observou-se o pico do íon de *m/z* 344,4 referente a quebra do derivado da BB, além de derivados da BB, os íons *m/z* 323,2 e 322,3 referentes aos trímeros formados pela oxidação do PAF e o íon de *m/z* 348,2 referente ao Produto 2 (Tabela 7, páginas 138 a 140).

No espectro ampliado na faixa de *m/z* de 350 a 400 Da, Figura 66D, observou-se o íon *m/z* 363,1 referente ao Trímero não oxidado do derivado da BB.

O espectro ampliado na faixa de *m/z* de 400 a 450 Da, Figura 66E, mostrou a presença do íon *m/z* 414,0; referente ao tetrâmero (Tabela 6, páginas 119 e 120) formado pela oxidação

do PAF. Também foram identificados produtos de m/z de 427,4 e 440,5 referentes aos Produtos 7 e 6, respectivamente (Tabela 7, páginas 139 a 140).

Por fim, o espectro ampliado na faixa de m/z de 450 a 500 Da, Figura 66F, foi observado o íon de m/z 453,6 referente ao Produto 5 (Tabela 7, páginas 139 a 140) e o íon m/z 468,2 referente ao Produto 4 (Tabela 7, páginas 139 a 140).



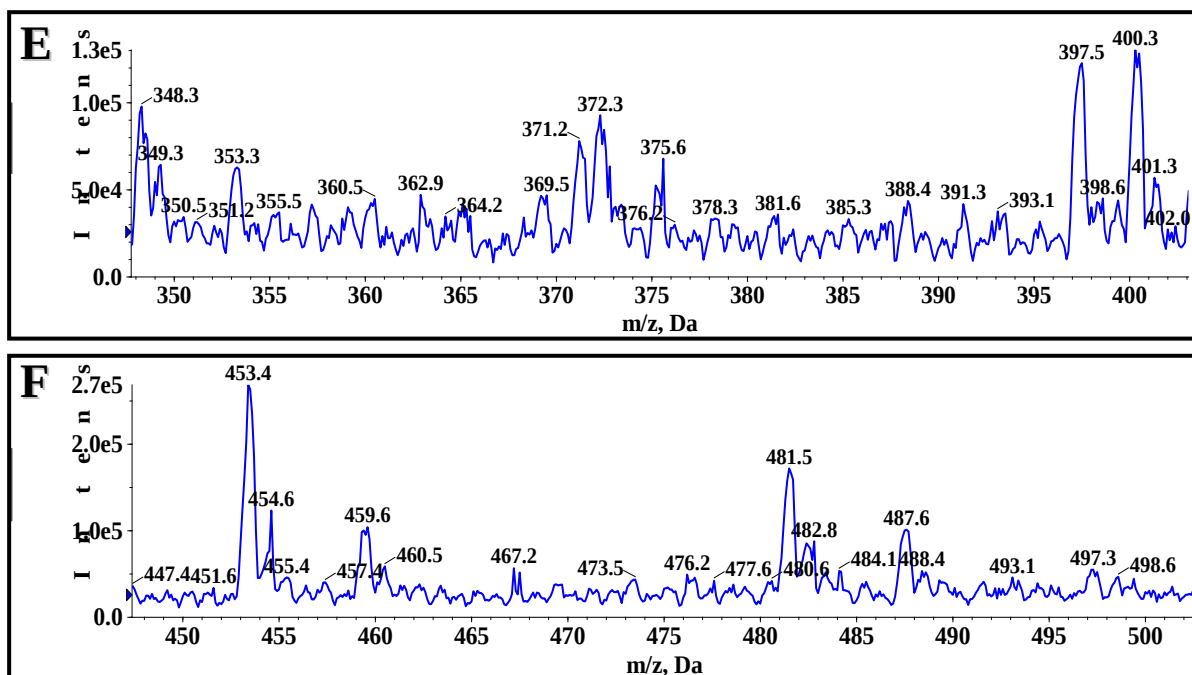


Figura 66. Espectro de massas obtido para a amostra de efluente de salão de cabeleireiros, ampliado na faixa de m/z 100 a 150 Da (A), ampliado na faixa de m/z 150 a 200 Da (B), ampliado na faixa de m/z 200 a 250 Da (C), ampliado na faixa de m/z 300 a 350 Da (D), ampliado na faixa de m/z 350 a 400 Da (E) e ampliado na faixa de m/z 450 a 500 Da (F).

Fonte: Autor.

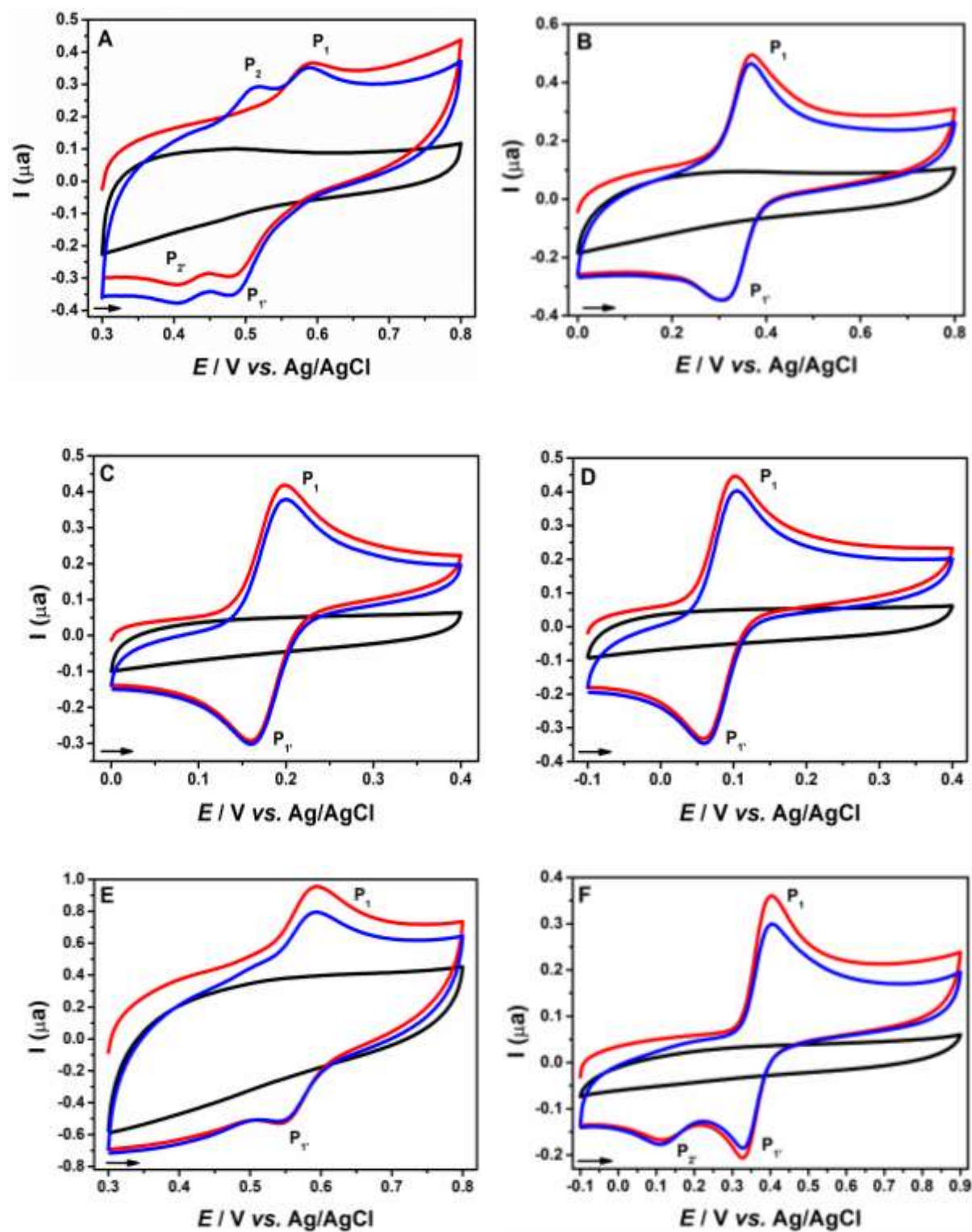
Foi observado que diferentes quantidades de vários produtos oriundos da oxidação da PTD, do PAF e da reação entre os dois precursores estão presentes no efluente de salão de cabeleireiros, gerado pelo tingimento de cabelos com tinturas permanentes comerciais. Esses compostos estão sendo descartados no esgoto comum diariamente. Portanto, isso exige uma maior atenção e cuidado no monitoramento e descarte desse rejeito, uma vez que a prática de tingimento dos cabelos é bastante difundida e rotineira nos salões de cabeleireiros. Além disso, esses produtos descartados podem estar contaminando toda a biota aquática, uma vez que as estações de tratamento de esgoto convencionais não conseguem tratar adequadamente esse tipo de resíduo. (43-45)

5.4. Comportamento eletroquímico da PTD e do PAF no GCE

5.4.1. Voltametria cíclica (CV)

Os comportamentos eletroquímicos das soluções de PTD e de PAF, a uma concentração de $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, foi primeiramente investigados no GCE por CV, em

soluções de eletrólitos suporte de tampão a $1,0 < \text{pH} < 12,0$. Os voltamogramas cíclicos obtidos para a PTD e para o PAF estão dispostos na Figura 67.



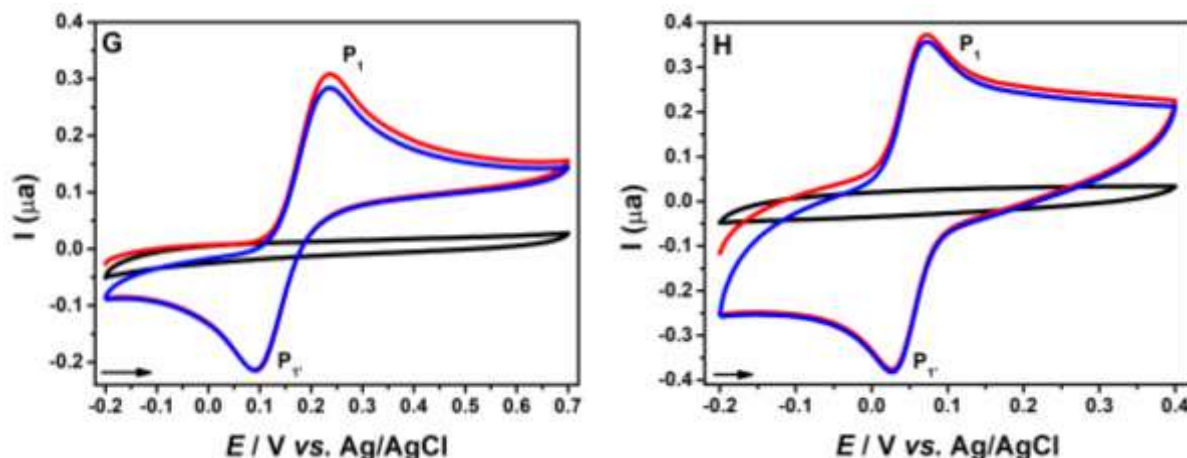


Figura 67. Voltamogramas cíclicos obtidos em GCE, para $1,0 \times 10^{-4}$ mol L $^{-1}$ de PTD, a pH: (A) 1,0, (B) 4,0, (C) 7,0 e (D) 9,0; e para $1,0 \times 10^{-4}$ mol L $^{-1}$ de PAF a pH: (E) 1,0, (F) 4,0, (G) 7,0 e (H) 9,0. (—) branco (eletrólito suporte), (—) primeira varredura e (—) segunda varredura. Velocidade de varredura de $\nu = 50,0$ mV s $^{-1}$.

Fonte: Autor.

Os voltamogramas cíclicos obtidos em pH 1,0 para a PTD, Figura 67A, mostraram na primeira varredura um pico de oxidação reversível bem definido P_{1PTD} , em $E_{pa1PTD} = + 0,59$ V, seguido na varredura reversa pelo pico de redução de P_{1PTD} , em $E_{pc1PTD} = + 0,48$ V, e um pico de redução reversível P_{2PTD} do produto de oxidação da PTD, em $E_{pc2PTD} = + 0,40$ V. Na segunda varredura, a PTD mostrou primeiro um pico de oxidação reversível menor dos produtos de oxidação, P_{2PTD} , em $E_{pa2PTD} = + 0,51$ V, e um pico de oxidação reversível da PTD, P_{1PTD} , em $E_{pa1PTD} = + 0,59$ V. Para pH $> 3,0$, nas Figuras 67B, 67C e 67D, apenas o pico de oxidação P_{1PTD} e o pico de redução $P_{1'PTD}$ foram observados.

Os voltamograma cíclicos obtidos para o PAF a pH 1,0, Figura 67E, mostraram na primeira varredura um pico de oxidação reversível bem definido P_{1PAF} , em $E_{pa1PAF} = + 0,59$ V, seguido na varredura reversa pelo pico de redução de PAF, $P_{1'PAF}$, em $E_{pc1'PAF} = + 0,48$ V. Em pH = 4,0, Figura 67F, o PAF mostrou um pico de oxidação reversível P_{1PAF} , no $E_{pa1PAF} = + 0,56$ V, e na varredura reversa o pico de redução, $P_{1'PAF}$, no $E_{pc1'PAF} = + 0,56$ V, e um outro pico menor de redução do produto de oxidação irreversível P_{2PAF} , em $E_{pc2'PAF} = + 0,37$ V. Para pH $> 4,0$, Figuras 67G e 67H, apenas o pico de oxidação P_1 e o pico de redução $P_{1'}$ foram observados.

Foi observada também uma pequena diminuição das correntes dos picos de oxidação P_1 da PTD e do PAF nas varreduras sucessivas, sem limpeza da superfície do eletrodo,

devido à adsorção dos produtos de oxidação da PTD e do PAF na superfície do GCE. Os produtos de oxidação da PTD e do PAF foram eletroquimicamente ativos apenas em meio ácido.

O efeito da velocidade de varredura, Figuras 68A e 68B, para o pico de oxidação reversível P_1 foi avaliado, no intervalo de $5,0 - 500,0 \text{ mVs}^{-1}$, para a PTD e para o PAF a $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, sempre usando uma superfície limpa no GCE, em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 7,0. As correntes de pico de oxidação P_1 da PTD e do PAF, $I_{pa} \text{ (A)} = 2,69 \times 10^5 n (\alpha n')^{1/2} A [R]_{\infty} D O^{1/2} v^{1/2}$, aumentaram linearmente com $v^{1/2}$, indicando que o processo de oxidação foi por difusão (134). Os coeficientes de difusão da PTD e do PAF, em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 7,0, foram calculados e os valores foram $D_{PTD} = 1,57 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ para PTD e $D_{PAF} = 1,03 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ para o PAF.

A área eletroativa aparente do GCE foi determinada, em $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ a uma concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ($D = 7,35 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$), diluído em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0 e o valor obtido foi de $A = 4,23 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$.

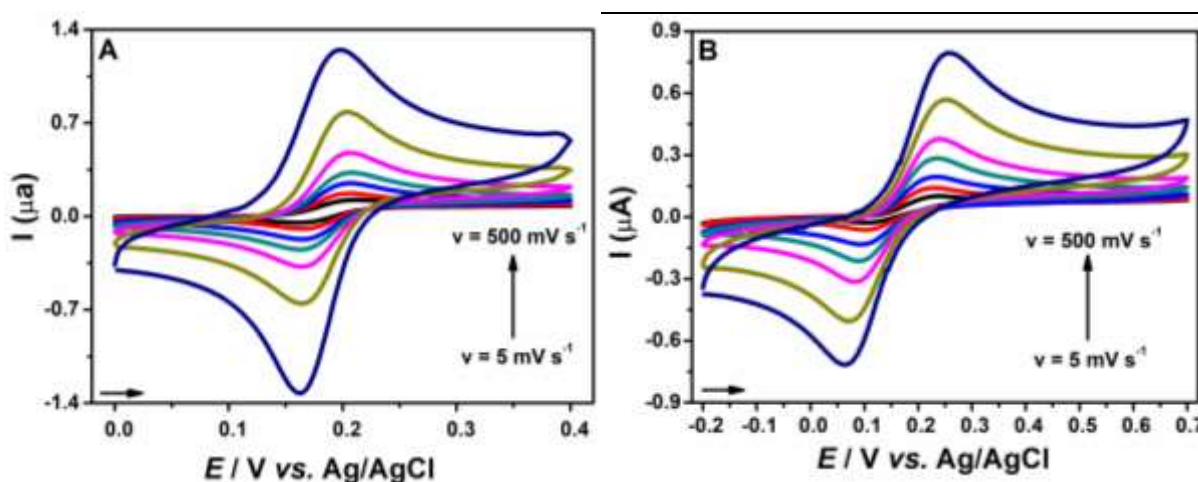


Figura 68. Voltamogramas cíclicos obtidos em GCE, para $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de PTD (A) e de PAF (B), a pH 7,0 no intervalo de velocidade de varredura de $5,0 - 500,0 \text{ mVs}^{-1}$.

Fonte: Autor.

5.4.2. Voltametria de pulso diferencial (DPV)

Investigou-se a influência do pH na oxidação e redução eletroquímica da PTD e do PAF a $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, no GCE, por DPV, em $3,0 < \text{pH} < 12,0$, sempre com a superfície do GCE limpa. Os voltamogramas de pulso diferencial obtidos para a PTD e para o PAF são mostrados na Figura 69.

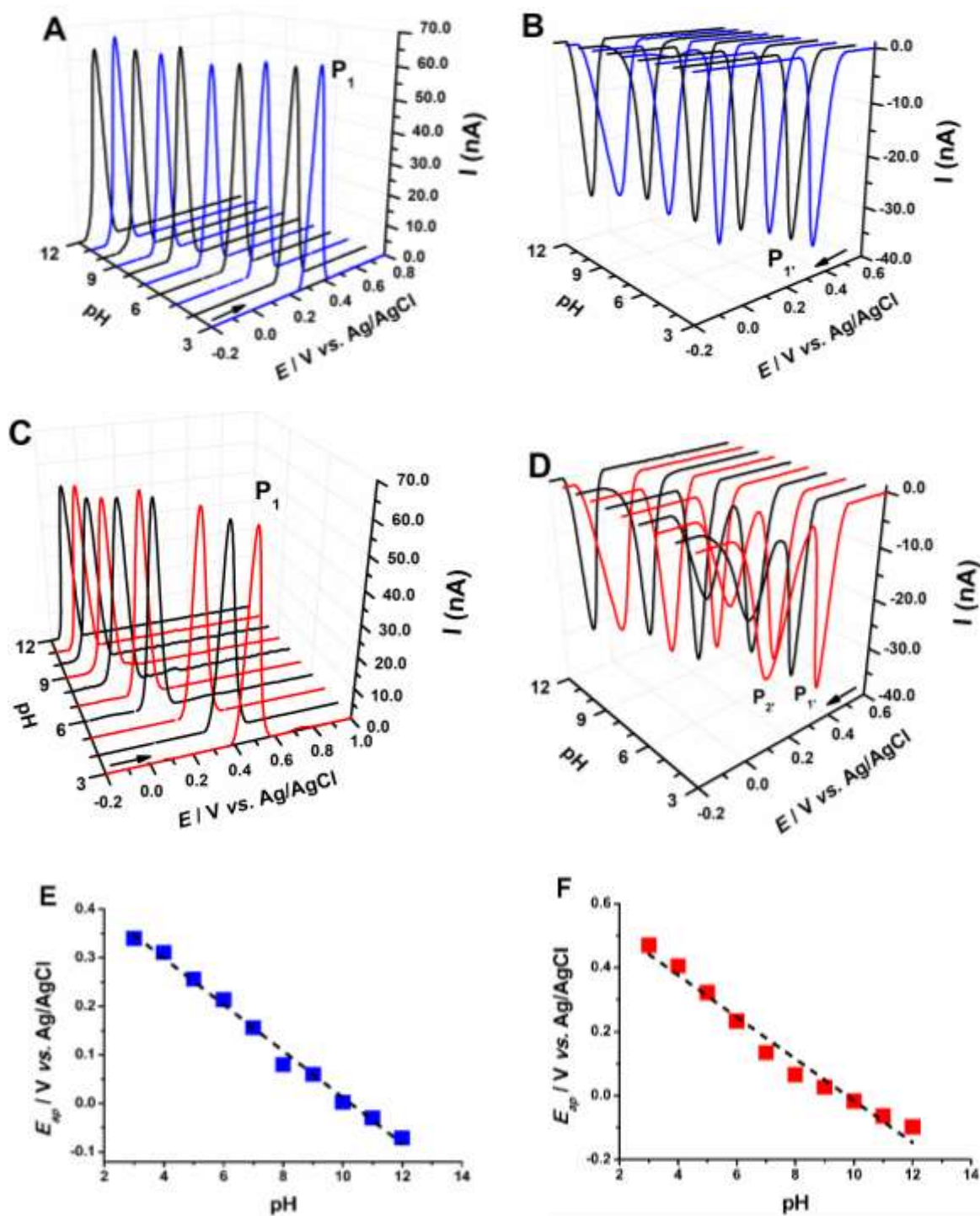


Figura 69. Voltamogramas de pulso diferencial em 3D, com linha de base corrigida, em GCE, para $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de PTD: (A) oxidação e (B) redução e $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de PAF: (C) oxidação e (D) redução, em diferentes pHs de eletrólito de suporte. Velocidade de varredura $\nu = 5,0 \text{ mV s}^{-1}$. Gráficos E_{ap} vs. pH para a PTD (E) e para o PAF (F).

Fonte: Autor.

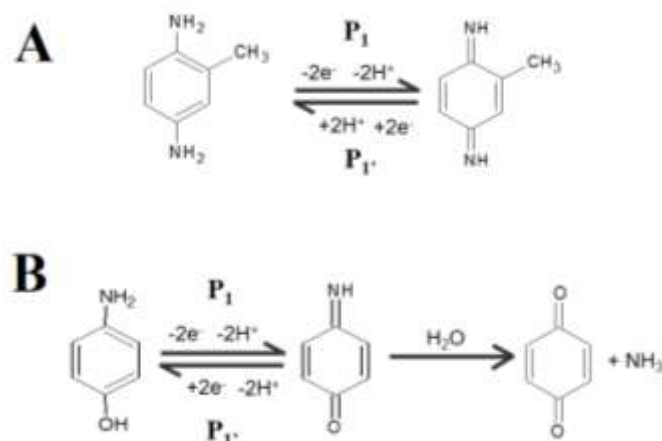
Nos voltamogramas de pulso diferencial obtidos para a PTD, Figuras 69A e 69B, apenas o pico de oxidação reversível P_1 ocorreu. O pico de oxidação P_1 da PTD foi dependente do pH, passando de potenciais mais positivos para potenciais menos positivos com o aumento do pH, seguindo a relação linear, $E_{P1PTD} (V) = 0,53 V - 0,047 (V) pH$ (Figura 69E) e a largura a meia altura de pico foi de $W_{1/2P1PTD} = 58,0 mV$, próximo ao valor teórico para transferência de dois elétrons e dois prótons (Figura 69A). (171)

Os voltamogramas de pulso diferencial obtidos para o PAF a $3,0 < pH < 6,0$, Figuras 69C e 69D, também apresentaram o pico reversível do P_{1PAF} e também o pico reversível P_{2PAF} do produto de oxidação P_{1PAF} . No entanto, para $pH > 6,0$, apenas o pico de oxidação reversível P_1 do PAF ocorreu. O pico de oxidação reversível P_1 do PAF foi dependente do pH para $3,0 < pH < 12,0$, passando de potenciais mais positivos para potenciais menos positivos com o aumento do pH, seguindo a relação linear, $E_{P1PAF} (V) = 0,64 V - 0,065 (V) pH$ (Figura 69F), e a largura a meia altura de pico foi de $W_{1/2P1PAF} = 63,0 mV$, também indicando um mecanismo de transferência de dois elétrons e dois prótons (Figura 69C). (171)

As correntes de pico de oxidação da PTD e do PAF não mudaram entre as espécies protonadas e desprotonadas, Figura 69. O potencial P_1 do pico de oxidação para a PTD e para o PAF, gráfico E_{p1} vs. pH, tem inclinação de aproximadamente 60,0 mV/unidade de pH, Figuras 69E e 69F, indicando que em ambos os compostos estão envolvidos um mecanismo de oxidação eletroquímica de dois prótons e dois elétrons.

O mecanismo de oxidação da PTD, Esquema 8A, ocorreu nos grupos amina, com dois prótons e dois elétrons transferidos, e uma estrutura de diimina quinoide é formada. O mecanismo de oxidação do PAF, Esquema 8B, também ocorreu no grupo amina, em uma transferência de dois prótons e dois elétrons, e após a oxidação, há uma etapa de reação química com a água leva a formação de amônia (NH_3) e ao produto final quinona.

Os mecanismos eletroquímicos propostos para a PTD e para o PAF, no GCE, por DPV, para uma ampla faixa de pH, estão de acordo com os mecanismos propostos na literatura para a PTD, por CV em eletrodo de malha de platina (152), e para o PAF em eletrodo de platina, GCE e eletrodo de mercúrio, respectivamente. (76,153-155)



Esquema 8. Mecanismos de oxidação eletroquímica propostos para a PTD e para o PAF no GCE.

Fonte: Autor.

5.4.3. Voltametria de onda quadrada (SWV)

Para confirmar a reversibilidade das reações de transferência de elétrons da PTD e do PAF, foram realizados experimentos de SWV para medir em uma varredura as correntes de pico de oxidação e redução. A SWV apresenta uma velocidade de análise maior, com um consumo menor das espécies eletroativas, o que diminui a adsorção dos produtos de oxidação na superfície do eletrodo em comparação com a técnica DPV. (171,172)

Experimentos de SWV foram realizados para a PTD e para o PAF, a uma concentração de $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, em diferentes eletrólitos suporte com diferentes pHs, sempre com a superfície do GCE limpa. Os voltamogramas de onda quadrada obtidos em tampão fosfato a 0,1 mol L⁻¹ a pH 7,0 para a PTD e para o PAF são mostrados na Figura 70.

Para a PTD, o voltamograma de onda quadrada obtido em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ a pH 7,0, Figura 70A, mostrou o pico anódico P_{1PTD}, em $E_{P1PTD} = + 0,17$ V, e o pico catódico P_{1'PTD}, em $E_{P1'PTD} = + 0,20$ V, confirmando uma reação de oxidação reversível para a PTD.

Para o PAF, o voltamograma de onda quadrada obtido em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ a pH 7,0, Figura 70B, mostrou o pico anódico P_{1PAF} em $E_{P1PAF} = + 0,16$ V e o pico catódico P_{1'PAF} em $E_{P1'PAF} = + 0,16$ V, confirmando também uma reação de oxidação reversível para o PAF. Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos por CV e DPV a pH 7,0 (Figuras 68 e 69).

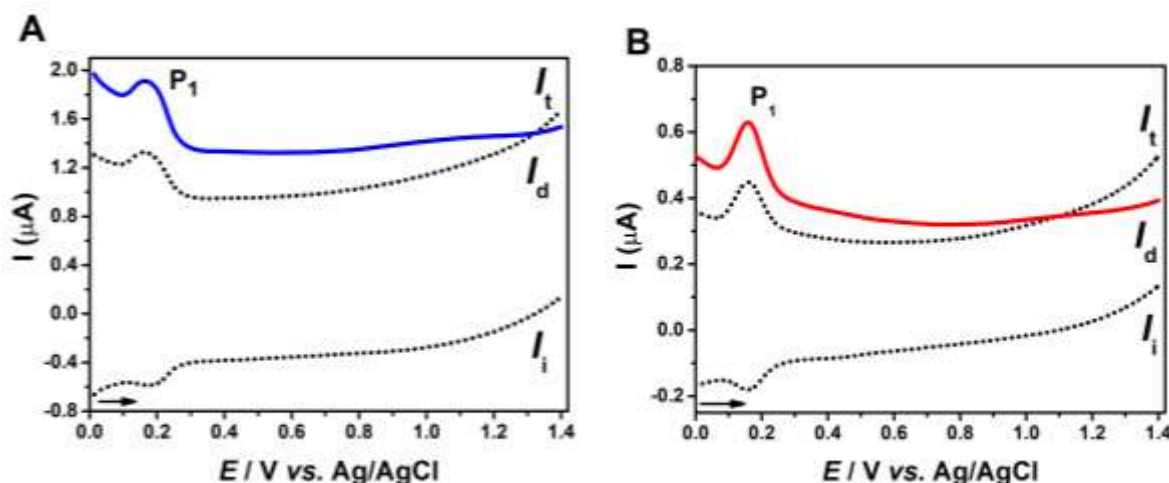


Figura 70. Voltamogramas de onda quadrada obtidos em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, a pH 7,0, para $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de PTD (A) e PAF (B) em GCE. Velocidade de varredura $v_{\text{ef}} = 50,0 \text{ mV s}^{-1}$. I_t – corrente de pico total, I_d – corrente de pico direta e I_i – corrente de pico inversa.

Fonte: Autor.

5.5. Determinação eletroquímica da PTD e do PAF em fluidos biológicos

Um método eletroquímico foi desenvolvido, por DPV em GCE, para a determinação de PTD e de PAF, em amostras de soro fetal bovino (simulando o plasma sanguíneo humano) e de urina artificial (simulando a urina humana).

Uma curva analítica foi obtida para a PTD, com concentrações variando de $1,0 \times 10^{-7}$ a $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, em tampão de fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 7,0, e é representada pela equação $I_{\text{pa}} (\text{nA}) = 4,55 (\text{nA}/\mu\text{M}) [\text{PTD}] (\mu\text{M}) - 0,37 (\text{nA})$ ($R^2 = 0,9996$). Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) para a PTD, obtidos pela relação ($\text{LD} = 3\text{std/s}$) e ($\text{LQ} = 10\text{std/s}$), respectivamente, em que "std" é o desvio padrão da corrente de pico e "s" é a inclinação da curva de calibração, foram de $1,2 \times 10^{-7}$ e $1,7 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente.

Uma curva analítica também foi obtida, em triplicata, para o PAF, com concentrações variando de $1,0 \times 10^{-7}$ a $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, em tampão de fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 7,0, e é representada pela equação $I_{\text{pa}} (\text{nA}) = 1,53 (\text{nA}/\mu\text{M}) [\text{PAF}] (\mu\text{M}) - 0,05 (\text{nA})$ ($R^2 = 0,9989$). Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) para o PAF, obtidos pela relação ($\text{LD} = 3\text{std/s}$) e ($\text{LQ} = 10\text{std/s}$), respectivamente, em que "std" é o desvio padrão da corrente de pico e "s" é a inclinação da curva de calibração, foram de $3,9 \times 10^{-7}$ e $4,6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. Os voltamogramas de DPV, obtidos para as diferentes concentrações de

PTD e de PAF avaliadas, para a construção da curva analítica são mostrados na Figura 71A e 71B, respectivamente.

A repetibilidade do método foi avaliada, em triplicata, nas concentrações de $5,0 \times 10^{-7}$ e $8,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ de PTD e de PAF. Os desvios padrões relativos obtidos foram de 2,61% para a PTD e 3,58% para o PAF a $5,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e 2,95% para a PTD e 3,86% para o PAF a $8,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. Esses resultados indicam que o método eletroquímico desenvolvido foi repetitivo, e o pré-tratamento (limpeza e polimento) causou apenas pequenas alterações na área da superfície do GCE, com pequenas variações nas correntes de pico medidas.

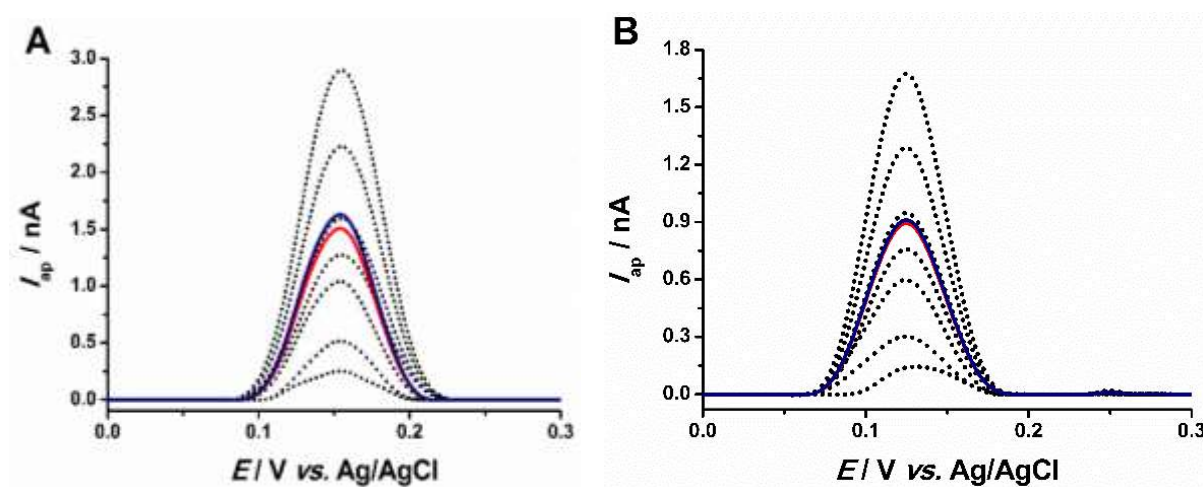


Figura 71. Voltamogramas de pulso diferencial, com linha de base corrigida, obtidos em GCE, tampão de fosfato 0,1 mol L⁻¹ a pH 7,0, nas concentrações de 0,1, 0,2, 0,4, 0,5, 0,6, 0,8 e $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de PTD (A) e para o PAF (B). Voltamograma de pulso diferencial obtidos para as amostras de soro fetal bovino (—) e de urina artificial (---). Velocidade de varredura $\nu = 5,0$ mV s⁻¹.

Fonte: Autor.

Na literatura outras metodologias foram relatadas para a determinação de PTD e PAF em diferentes matrizes. A Tabela 16 fornece uma comparação dos valores das figuras de mérito do método proposto com os valores de outras metodologias relatadas na literatura.

O método proposto possui um LD menor em comparação ao método de CG (138), uma faixa linear limitada em comparação ao método CLAE/DAD (44) para a PTD e LD menor em comparação aos métodos de CLAE/DE (129) e GCE-GQ (132). Para PAF, o método proposto possui uma faixa linear menor do que outros métodos relatados na literatura (129,132,139). No entanto, o método proposto é extremamente simples e permite uma determinação mais rápida, mais barata, menos gastos com solventes e reagentes, menor

geração de resíduos, e praticamente nenhuma preparação de amostra em comparação com outros métodos relatados na literatura.

Tabela 16. Comparação entre as figuras de mérito do método proposto, com o de outros métodos relatados na literatura, para a determinação de PTD e PAF.

Analito	Técnica	Faixa linear (mol L ⁻¹)	LD (mol L ⁻¹)	LQ (mol L ⁻¹)	Referência
PTD	^a CLAE/DAD	$2,46 \times 10^{-7} - 4,09 \times 10^{-3}$	$2,46 \times 10^{-7}$	$6,55 \times 10^{-7}$	(44)
	^b CG	-	$4,1 \times 10^{-8}$	-	(138)
	^c DPV/GCE	$1,0 \times 10^{-7} - 1,0 \times 10^{-6}$	$1,2 \times 10^{-7}$	$1,7 \times 10^{-7}$	M.P.
PAF	^d CLAE/DE	$2,75 \times 10^{-7} - 2,75 \times 10^{-4}$	$1,38 \times 10^{-8}$	-	(129)
	^e GCE-GQ	$2,0 \times 10^{-7} - 5,5 \times 10^{-5}$	$5,7 \times 10^{-8}$	-	(132)
	^f EC/DA	$1,0 \times 10^{-5} - 1,0 \times 10^{-3}$	$1,4 \times 10^{-6}$	$4,7 \times 10^{-6}$	(139)
	^g DPV/GCE	$1,0 \times 10^{-7} - 1,0 \times 10^{-6}$	$3,9 \times 10^{-7}$	$4,6 \times 10^{-7}$	M.P.

^aCLAE/DAD: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção por Arranjo de Diodos;

^bCG: Cromatografia Gasosa;

^cDPV/GCE: Voltametria de Pulso Diferencial/Eletrodo de Carbono Vítreo,

^dCLAE/DE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção Eletroquímica;

^eGCE-GQ: Eletrodo de Carbono Vítreo modificado com filme de composto de Grafeno e Quitosana;

^fEC/DA: Eletroforese Capilar com Detecção Amperométrica;

M.P.: Método Proposto.

Fonte: Autor.

O método eletroanalítico proposto foi aplicado para a quantificação de PTD e PAF em amostras de fluidos biológicos de soro fetal bovino e de urina artificial, pelo método de adição/recuperação, utilizando DPV em GCE.

As amostras de soro fetal bovino e de urina artificial foram fortificadas com $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de PTD e PAF, e diluídas diretamente na célula eletroquímica, até uma concentração final de $6,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. Os voltamogramas de pulso diferencial foram registrados, em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ a pH 7,0, medindo a corrente P₁ do pico de oxidação da PTD e do PAF. O efeito da matriz foi avaliado por adição/recuperação, e as

amostras de soro fetal bovino e de urina artificial não apresentaram interferências significativas. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os resultados são mostrados na Tabela 17.

Tabela 17. Determinação de PTD e de PAF nas amostras de fluídos biológicos de soro fetal bovino e de urina artificial.

Soro fetal bovino	PTD	PAF
Adicionado (10^{-7} mol L ⁻¹)	6,0	6,0
Encontrado (10^{-7} mol L ⁻¹)	5,9 ± 0,1	5,8 ± 0,2
Recuperação (%)	98,3	96,7
Urina artificial	PTD	PAF
Adicionado (10^{-7} mol L ⁻¹)	6,0	6,0
Encontrado (10^{-7} mol L ⁻¹)	6,2 ± 0,1	5,9 ± 0,3
Recuperação (%)	103,3	98,3

* n = 3.

Fonte: Autor.

As concentrações obtidas estavam de acordo com as concentrações adicionadas, com uma boa recuperação (Tabela 17). Diante dos resultados obtidos, a metodologia proposta é uma alternativa confiável para a determinação de PTD e PAF em fluidos biológicos.

5.6. Comportamento de oxidação eletroquímica da queratina humana adsorvida no GCE (biossensor eletroquímico de queratina)

Eletrodos de ouro e platina formam óxidos de seus respectivos metais na região de potencial em torno de $E = + 0,80$ V. Nessas regiões, alguns aminoácidos eletroativos apresentam picos de oxidação. Portanto, os picos de oxidação obtidos pela formação de óxidos metálicos, por exemplo, dos eletrodos de ouro e platina, podem interferir nos estudos de proteínas, tornando impraticável o uso desses eletrodos (54). O GCE, por sua vez, apresenta várias vantagens, como: permitir uma grande janela de varredura em direção a potenciais mais positivos, permitir uma forte adsorção de proteínas em sua superfície sem a necessidade de ligação covalente, e permitir uma detecção sensível de todos os resíduos de

aminoácidos eletroativos (54). Portanto, uma vez que não forma óxidos na região potencial de oxidação dos aminoácidos, como os eletrodos de ouro e platina, o GCE foi escolhido como eletrodo de trabalho, para a realização dos estudos de oxidação eletroquímica da queratina de cabelo humano.

A oxidação eletroquímica do filme multicamadas espesso de queratina capilar humana, adsorvida na superfície do GCE, foi investigada por DPV, em eletrólito suporte de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ a pH 8,0. A Figura 72 apresenta o voltamograma de pulso diferencial obtido para a oxidação do filme multicamadas espesso de queratina humana adsorvido na superfície do GCE.

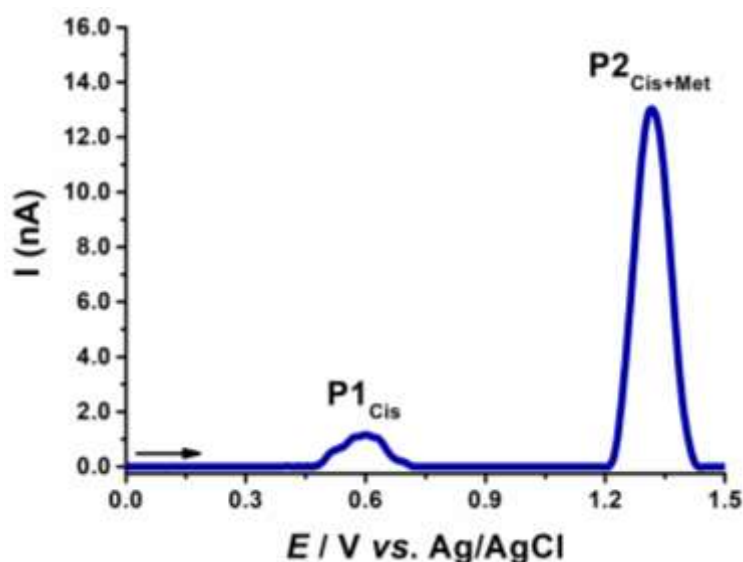


Figura 72. Voltamograma de pulso diferencial obtido, com linha de base corrigida, para o filme multicamadas espesso de queratina humana nativa adsorvida no GCE, em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ a pH 8,0. Velocidade de varredura $v = 5,0 \text{ mV s}^{-1}$.

Fonte: Autor.

O voltamograma de pulso diferencial obtido, com a linha de base corrigida, para o filme multicamadas espessa de queratina humana nativa adsorvida no GCE, em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ a pH 8,0, Figura 72, mostrou dois picos de oxidação, devido aos resíduos de aminoácidos cisteína (Cis), primeiro pico de oxidação, P1_{Cis}, no EP1 = + 0,53 V (56) e segundo pico de oxidação, P2_{Cis + Met}, no EP2 = + 1,28 V, devido a oxidação dos resíduos de aminoácidos cisteína (Cis) e metionina (Met). (56,57,173)

Foi avaliada também a influência do pH na oxidação eletroquímica da queratina humana nativa, por DPV, em soluções de tampão a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em uma ampla faixa de pH, variando de $1,0 < \text{pH} < 12,0$. A Figura 73A apresenta os voltamogramas de pulso diferencial, em 3D, com linha de base corrigida, obtidos para a oxidação do filme multicamadas espesso de queratina humana adsorvido, na superfície do GCE em diferentes pHs de eletrólitos suporte. A Figura 73B mostra o gráfico de potencial de pico de oxidação do filme espesso de multicamadas de queratina capilar humana adsorvido no GCE.

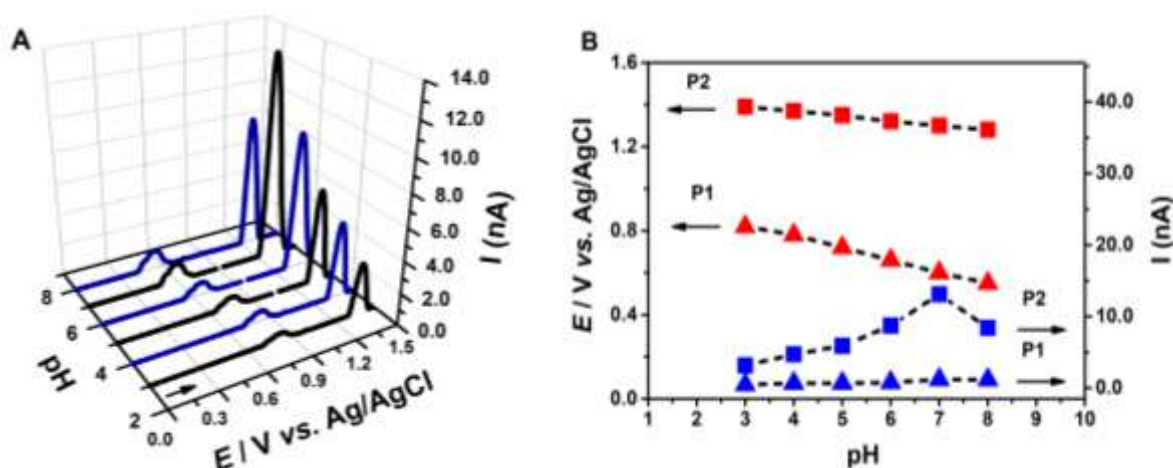


Figura 73. (A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos, em 3D, com linha de base corrigida, para o filme multicamadas espesso de queratina capilar humana adsorvida no GCE, em diferentes pHs de eletrólitos suporte. (B) Gráfico de potencial de pico de oxidação do filme espesso de multicamadas de queratina capilar humana adsorvido no GCE ($\blacktriangle$) $\text{Ep}_{1\text{Cis}}$ e ($\blacksquare$) $\text{Ep}_{2\text{Cis} + \text{Met}}$ e de corrente de pico ($\blacktriangle$) $\text{Ip}_{1\text{Cis}}$ e ($\blacksquare$) $\text{Ip}_{2\text{Cis} + \text{Met}}$ vs. pH. Velocidade de varredura $v = 5,0 \text{ mV s}^{-1}$.

Fonte: Autor.

Nos eletrólitos com pH variando de $3,0 < \text{pH} < 9,0$, Figura 73A, foram observados dois picos de oxidação de resíduos de aminoácidos. O primeiro pico, P1_{Cis} , atribuído ao primeiro pico de oxidação de cisteína (56,57), e o segundo pico, $\text{P2}_{\text{Cis} + \text{Met}}$, ao terceiro pico de oxidação da cisteína e ao segundo pico de oxidação da metionina (56,57,173). Ambos os picos, P1_{Cis} e $\text{P2}_{\text{Cis} + \text{Met}}$, foram deslocados para potenciais mais negativos com o aumento do pH.

Nos eletrólitos com o $\text{pH} \leq 2,0$ e $\text{pH} \geq 9,0$, não foram observados os mesmos picos de oxidação, devido à desnaturação drástica da queratina promovida por meios muito ácidos e muito básicos.

O pico P1_{Cis} apresentou dependência linear com o pH de 55 mV/pH (próximo a 59,0 mV/pH), em $3,0 < \text{pH} < 9,0$, a largura de pico a meia altura foi de $W_{1/2\text{P1Cis}} = 97,0$ mV, Figura 73B, o que correspondente a um processo de oxidação eletroquímica envolvendo o mesmo número de prótons e elétrons, de acordo com o mecanismo de oxidação da cisteína. (56)

O segundo pico, $\text{P2}_{\text{Cis} + \text{Met}}$, tem a contribuição no processo de oxidação de dois resíduos de aminoácidos (cisteína e metionina). Foi obtida uma dependência linear com pH de 22 mV/pH, para $3,0 < \text{pH} < 9,0$, e uma largura de pico a meia altura de $W_{1/2\text{P2Cis} + \text{Met}} = 115,0$ mV (Figura 73B).

Os voltamogramas de pulso diferencial da queratina humana nativa, Figura 73A, apresentaram correntes de pico baixas. Isso são evidências da maior dificuldade dos processos de transferência de elétrons entre a estrutura morfológica 3D da queratina composta por uma sequência de três hélices (Figura 74) e a superfície do GCE.



Figura 74. Estrutura 3D da queratina humana recombinante 36 (ab160141).

Fonte: Imagem adaptada de SOUZA, J. C.; MACHINI, W. B. S.; ZANONI, M. V. B.; BRETT, A. M. O. Human hair keratin direct electrochemistry and in situ interaction with *p*-toluenediamine and *p*-aminophenol hair dye precursors using a keratin electrochemical biosensor. *ChemElectroChem*, v. 7, p. 1277-1285, 2020.

O maior valor das correntes de pico estavam no tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 7,0, Figuras 73A e 73B, devido à região hidrofóbica da molécula de queratina aumentar a adsorção na superfície do GCE, de modo que os resíduos de aminoácidos eletroativos estavam mais acessíveis para serem oxidados na superfície do GCE, P1_{Cis} em $\text{EP1} = + 0,60 \text{ V}$ e o $\text{P2}_{\text{Cis} + \text{Met}}$ em $\text{EP2} = + 1,30 \text{ V}$.

No entanto, embora as correntes de pico de oxidação da queratina humana nativa tenham sido mais altas em pH 7,0, as demais experiências foram realizadas em tampão

fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 8,0, a fim de simular o processo de tingimento de cabelo que ocorre em $8,0 < \text{pH} < 10,0$.

5.7. Estudo eletroquímico da queratina humana desnaturada adsorvida no GCE

A queratina do cabelo humano, Figura 74, apresenta um formato helicoidal, de aproximadamente 20 angstroms de diâmetro (8,13,46), e é composta por aproximadamente 20 tipos diferentes de aminoácidos (53,174,175), nos quais apenas 5 são eletroativos (53,54,55): cisteína (53,56,57), tirosina (53,58,61), histidina (53,59,62), triptofano (53,59,60,63) e metionina (53,56,57). Os cinco aminoácidos eletroativos estão distribuídos nas cadeias de queratina do cabelo humano na seguinte proporção: 17 cisteínas, 11 tirosinas, 6 metioninas, 5 histidinas e 3 triptofanos. (53)

As interações entre as proteínas e o eletrodo são diretamente influenciadas pelas propriedades da superfície do eletrodo e pelas propriedades das proteínas. A orientação da proteína é a propriedade de maior importância, uma vez que os aminoácidos eletroativos presentes nas proteínas estão geralmente enterrados no interior da estrutura da proteína e de certa forma se tornam indisponíveis. Esta falta de disponibilidade dos aminoácidos faz com que o processo de transferência de elétrons seja dificultado (53,54). Assim, considerando que a superfície do GCE é hidrofóbica, as interações com os resíduos de aminoácidos presentes nas regiões hidrofóbicas são mais favorecidas. (53,54)

Na estrutura morfológica 3D da queratina do cabelo humano, Figura 75, composta por uma sequência de três α -hélices, os resíduos de aminoácidos são organizados levando em consideração sua polaridade/hidrofobicidade. A escala de hidropatia de Kyte-Doolittle (176,177) pode ser usada para avaliar a hidrofobicidade e/ou a polaridade dos resíduos de aminoácidos da queratina do cabelo humano. De acordo com a Figura 75, a queratina humana recombinante 36 tem um caráter hidrofílico maior, com algumas sequências hidrofóbicas intercaladas. A maioria dos ácidos residuais dos aminoácidos está nas regiões hidrofílicas e não é capaz de interagir facilmente com a superfície hidrofóbica do GCE, dificultando a oxidação dos resíduos dos aminoácidos da queratina.

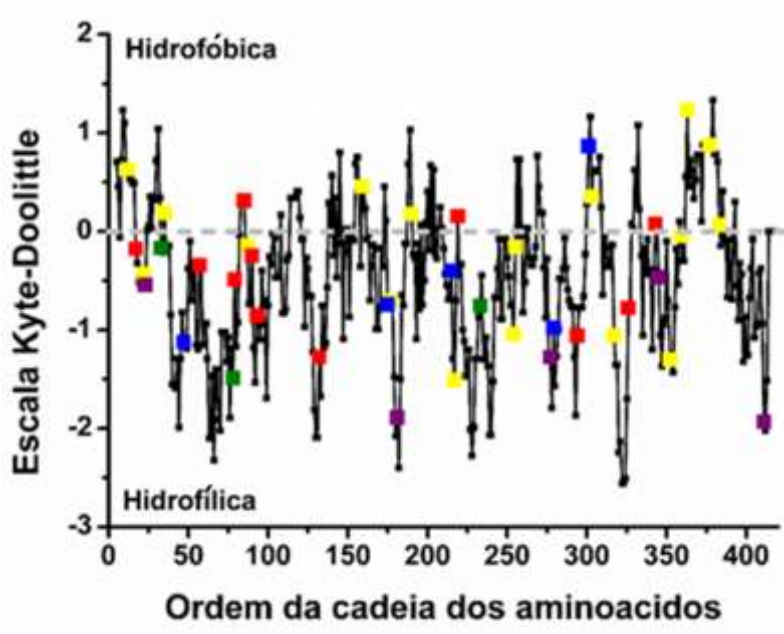


Figura 75. Gráfico de hidropaticidade da sequência da cadeia de aminoácidos da proteína queratina humana recombinante 36. Aminoácidos eletroativos: cisteína (amarelo), tirosina (vermelho), triptofano (verde), histidina (roxo) e metionina (azul).

Fonte: Autor.

Portanto, devido à sua estrutura helicoidal e, dependendo de como é ancorado à superfície do GCE, é possível que alguns resíduos de aminoácidos da queratina não atinjam a superfície do GCE, causando prejuízo no processo de transferência de elétrons nessas regiões. Comportamento proteico semelhante já foi observado em outros estudos com diferentes tipos de proteínas. (54,178-180)

O processo de desnaturação pode causar algumas alterações morfológicas na estrutura da proteína, fazendo com que ela se desdobre uma porção maior da estrutura, aumentando substancialmente o contato com a superfície do eletrodo, facilitando a oxidação de resíduos de aminoácidos eletroativos, fornecendo sinal aumentado e melhorando a detecção eletroquímica. (53)

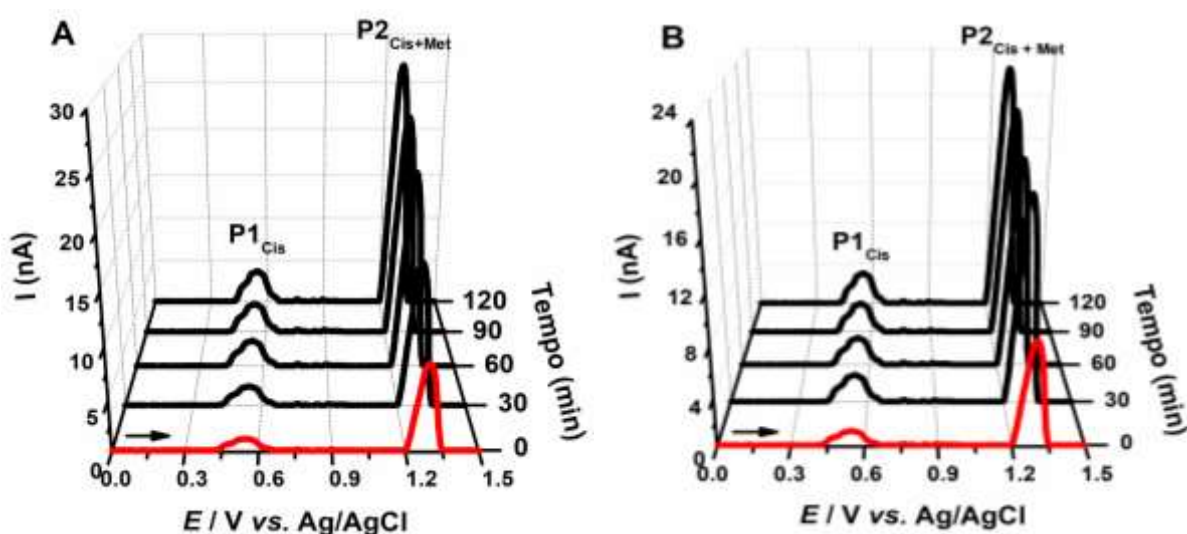
Os agentes desnaturantes comumente usados, principalmente em procedimentos eletroforéticos, são a uréia, SDS e TCEP, que causam desestabilização, desnaturação e desenvolvimento de estruturas proteicas. (149)

Os agentes desnaturantes utilizados neste trabalho, uréia e SDS, não são eletroativos. No entanto, o desnaturante TCEP mostra um pico de oxidação em $ETCEP = + 0,91 \text{ V}$, em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 8,0 no GCE (181). Para identificar e diferenciar os novos

picos de oxidação formados após a desnaturação da queratina, voltamogramas de pulso diferencial de controle foram realizados nas mesmas condições experimentais, como descrito anteriormente na Seção 4.10, usando GCE sem modificação, em $6,0 \text{ mol L}^{-1}$ de uréia, $33,3 \text{ mmol L}^{-1}$ de SDS e $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de TCEP, em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 8,0.

Para investigar o comportamento da oxidação eletroquímica da queratina humana desnaturada, um filme multicamada espesso de queratina foi imobilizado no GCE, conforme descrito na Seção 4.9. Para cada experimento, sempre foi preparado um novo filme multicamadas espessas de queratina adsorvidas no GCE, que foi incubado em $6,0 \text{ mol L}^{-1}$ de uréia, SDS $33,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ou TCEP $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$, em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 8,0, durante diferentes períodos de tempo: 30, 60, 90 e 120 minutos. Posteriormente, cada filme de multicamadas espessas de queratina desnaturada adsorvida no GCE foi retirado, lavado com água ultrapura para remover o excesso de desnaturante e, em seguida, os voltamogramas de pulso diferencial foram registrados e são mostrados na Figura 76.

Os voltamogramas de pulso diferencial do filme de multicamadas espessa de queratina desnaturada adsorvida no GCE, após a incubação em uréia, SDS e TCEP, Figura 75A, 75B e 75C, respectivamente, apresentaram os dois picos de oxidação anteriores. O primeiro pico de oxidação dos resíduos de aminoácidos cisteína, $P1_{\text{Cis}}$, em $EP1 = + 0,55 \text{ V}$ (56,57), e o terceiro pico de oxidação da cisteína e segundo pico de oxidação da metionina, $P2_{\text{Cis} + \text{Met}}$, em $EP2 = + 1,28 \text{ V}$ (56,57,173). Ambas as correntes de pico de oxidação tiveram um aumento progressivo com o tempo de incubação.



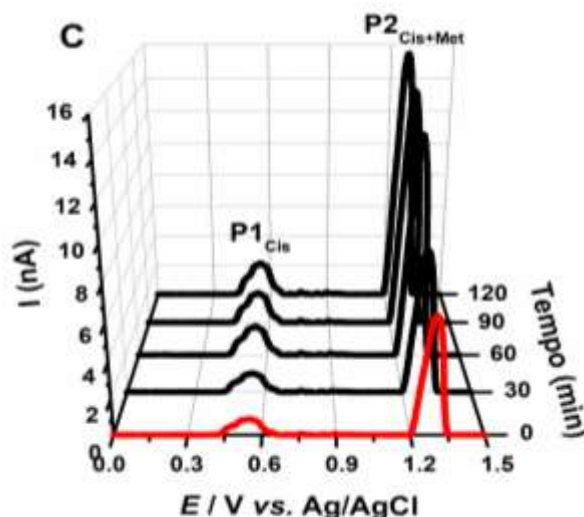


Figura 76. Voltamogramas de pulso diferencial obtidos, com linha de base corrigida, para o filme de multicamadas espesso de queratina humana adsorvido no GCE, em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 8,0: (—) biossensor eletroquímico de queratina nativa e (—) desnaturada em: (A) $6,0 \text{ mol L}^{-1}$ de uréia, (B) SDS $33,3 \text{ mmol L}^{-1}$, (C) TCEP $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$, durante diferentes períodos de tempo de 30, 60, 90 e 120 minutos. Velocidade de varredura de $5,0 \text{ mV s}^{-1}$.

Fonte: Autor.

Todos os três agentes desnaturantes e redutores, uréia, SDS e TCEP, promoveram o desdobramento da estrutura morfológica 3D da queratina humana, causando um aumento nas correntes de pico de oxidação dos resíduos de aminoácidos cisteína e metionina, durante o tempo de incubação, devido ao desdobramento da queratina, desabilitando o aminoácido e melhorando o acesso à superfície do GCE.

5.8. Estudo eletroquímico da interação da queratina capilar humana com PTD e PAF no biossensor eletroquímico de queratina

O biossensor eletroquímico de queratina foi utilizado para avaliar, *in situ* e em tempo real, as alterações ocorridas na queratina do cabelo humano imobilizada na superfície do GCE, após a interação dos precursores de tinta capilar PTD e PAF, pelas alterações na oxidação da queratina, nas correntes de pico e do aparecimento de novos picos de oxidação de resíduos de aminoácidos. Os resultados foram registrados usando o biossensor eletroquímico de queratina após diferentes tempos de incubação e comparados com os resultados obtidos,

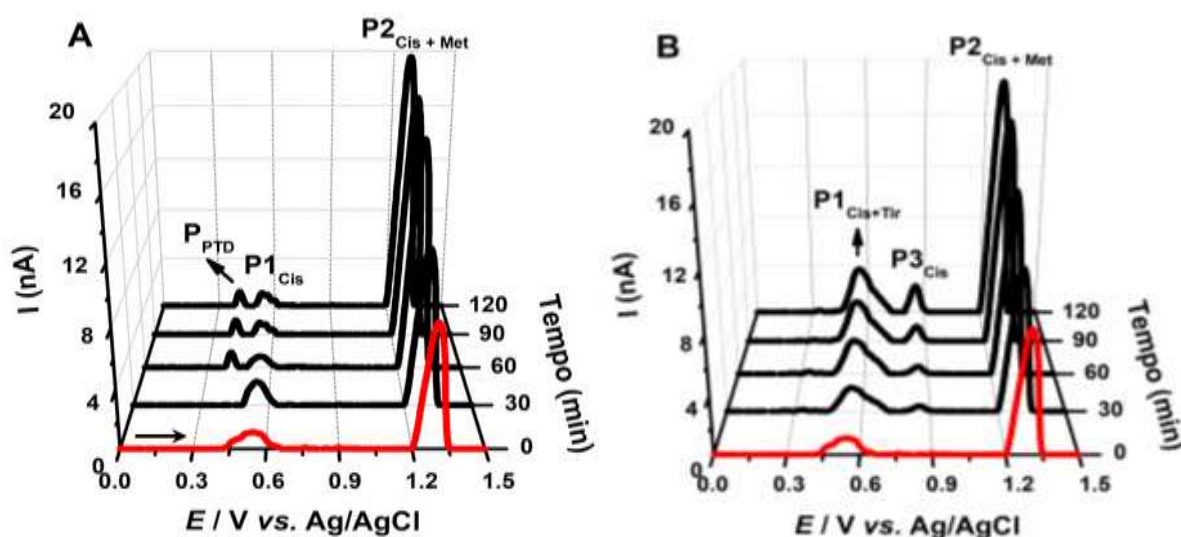
nas mesmas condições experimentais, usando um controle do biossensor eletroquímico de queratina.

Em relação à eletroquímica do agente precursor, a PTD é oxidada reversivelmente, em $E_{OXPTD} = + 0,08$ V, e reduzido em $E_{redPTD} = + 0,16$ V. O PAF também é oxidado reversivelmente, em $E_{OXPAF} = + 0,07$ V, e reduzido em $E_{redPAF} = + 0,16$ V, em pH 8,0 no GCE, conforme visto anteriormente.

O biossensor eletroquímico de queratina, preparado de acordo com o procedimento descrito na Seção 4.9, em simulação ao cabelo humano, foi usado para avaliar a interação da queratina humana com os precursores de corantes capilares PTD, PAF e os dois juntos, conforme mencionado na Seção 4.11.

Foram obtidos voltamogramas de pulso diferencial do biossensor eletroquímico da queratina antes e após a interação com cada precursor do corante capilar, por diferentes períodos de incubação, em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 8,0. Os voltamogramas de pulso diferencial da queratina incubada com o precursor PTD estão mostrados na Figura 77A, com o precursor PAF na Figura 77B, e para a PTD junto com o PAF na Figura 77C.

Os DPVs eletroquímicos de controle de queratina, Figura 77 (—), apresentaram como esperado, dois picos de oxidação correspondentes ao primeiro pico de oxidação, $P1_{Cis}$, em $EP1 = + 0,53$ V, referente aos resíduos de aminoácidos cisteína e o segundo pico, $P2_{Cis + Met}$, em $EP2 = + 1,28$ V, referentes ao terceiro pico de oxidação da cisteína e ao segundo pico de oxidação dos resíduos de aminoácidos metionina. (56,57,173)



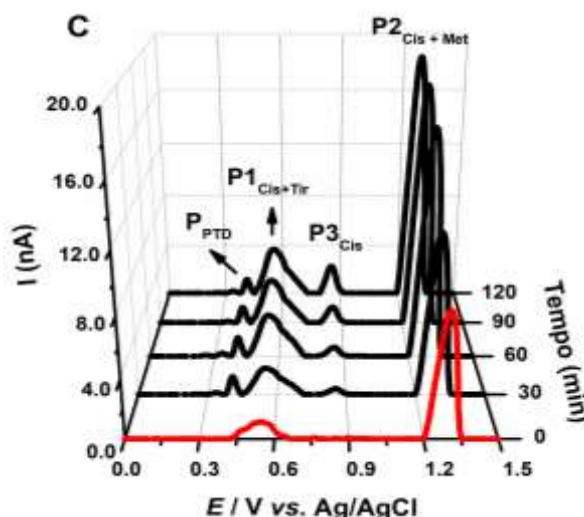


Figura 77. Voltamogramas de pulso diferencial obtidos, com linha de base corrigida, para o filme de multicamadas espesso de queratina humana adsorvido no GCE, em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 8,0: (—) biossensor eletroquímico de queratina nativa e (—) incubada em: (A) PTD $2,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, (B) PAF $2,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, (C) PTD e PAF (1:1) $2,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, durante diferentes períodos de tempo de 30, 60, 90 e 120 minutos. Velocidade de varredura de $5,0 \text{ mV s}^{-1}$.

Fonte: Autor.

O voltamograma de pulso diferencial obtidos para o biossensor eletroquímico de queratina, após 30 minutos de incubação com o precursor PTD, Figura 77A, mostrou um aumento de ambos os picos de oxidação, $P1_{\text{Cis}}$, em $EP1 = +0,53 \text{ V}$, e $P2_{\text{Cis} + \text{Met}}$, em $EP2 = +1,28 \text{ V}$. Por períodos mais longos de incubação a corrente do $P2_{\text{Cis} + \text{Met}}$ continuou a aumentar. Também foi observado um novo pico de oxidação, em $E_{\text{PTD}} = +0,44 \text{ V}$, sem alterações no pico de corrente, Figura 77A. Este é o pico de oxidação do produto da degradação química espontânea em solução do PTD com o tempo. (66)

O voltamograma de pulso diferencial obtido para o biossensor eletroquímico de queratina, após 30 minutos de incubação com o precursor PAF, Figura 77B, mostrou um aumento da corrente de pico do primeiro pico de oxidação, $P1_{\text{Cis} + \text{Tir}}$, em $EP1 = +0,53 \text{ V}$, atribuído à oxidação dos resíduos de aminoácidos cisteína e tirosina (58). Além disso, no pico $P2_{\text{Cis} + \text{Met}}$, em $EP2 = +1,28 \text{ V}$, foi observado um aumento da corrente de pico. Um novo terceiro pico, $P3_{\text{Cis}}$, em $EP3 = +0,85 \text{ V}$, atribuído ao segundo pico de oxidação dos resíduos de aminoácidos cisteína (56,57), foi observado. Para tempos de incubação mais longos, 60, 90 e 120 minutos, ocorreu um aumento progressivo das três correntes de pico de oxidação.

O voltamograma de pulso diferencial obtido para o biossensor eletroquímico de queratina, após 30 minutos de incubação em ambos os precursores, PTD e PAF, Figura 77C, mostrou uma combinação dos efeitos da PTD e do PAF individualmente, Figura 77A e 77B. Um aumento e ampliação das correntes de pico de oxidação do primeiro $P_{1Cis + Tir}$, em $EP1 = + 0,53$ V, e o segundo pico $P_{2Cis + Met}$, em $EP2 = + 1,28$ V, além da aparência dos dois novos picos de oxidação, o primeiro correspondente ao produto de degradação química da PTD com o tempo em solução (66), em $E_{PTD} = + 0,44$ V, e o segundo ao pico de oxidação dos resíduos de aminoácidos cisteína (56,57), P_{3Cis} , em $EP3 = + 0,85$ V.

Como os picos de oxidação da PTD e do PAF estão em torno de $E = 0,1$ V, os picos de oxidação observados após a incubação do biossensor eletroquímico de queratina com os precursores de corante capilar PTD e PAF estão relacionados apenas a alterações na conformação morfológica estrutural 3D da queratina (Figura 74) promovida pela interação com esses agentes precursores.

As alterações na morfologia da queratina 3D foram ainda mais significativas ao interagir com os agentes precursores PTD e PAF, principalmente com a PAF, do que com os agentes desnaturantes e redutores uréia, SDS e TCEP, pois, além do aumento da corrente de pico de oxidação da queratina, a interação com a PTD e o PAF causou a ocorrência de novos picos de oxidação.

A interação da PTD e do PAF com a queratina tornou os resíduos de aminoácidos mais internos mais disponíveis para oxidação na superfície do GCE, e os resíduos de aminoácidos cisteína e tirosina na interface hidrofílica/hidrofóbica (Figura 75) mais disponíveis para serem oxidados.

A interação dos precursores de corantes capilares com a queratina causaram o desdobramento da estrutura morfológica 3D da queratina, composta por uma sequência de três α -hélices, com a estrutura superficial do GCE, promovida pela alta reatividade dos precursores de corantes capilares PTD e PAF, que também causaram perturbações de ligações dissulfeto de queratina, impedindo a formação de ligações intramoleculares e intermoleculares, principalmente entre os resíduos de aminoácidos cisteína.

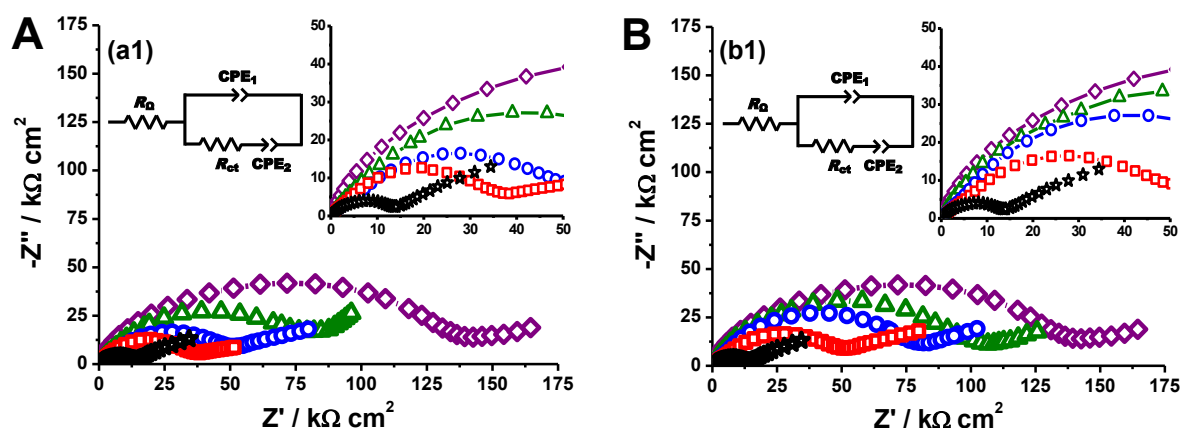
As alterações morfológicas da estrutura 3D da queratina do cabelo humano afetam as propriedades físicas dos cabelos, como resistência, tornando o cabelo mais quebradiço e menos brilhante. No mais, os agentes precursores induzem danos irreversíveis à estrutura da queratina.

5.9. Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS)

A EIS é aplicada com sucesso para caracterizar superfícies contendo elementos de reconhecimento biológico (54,180,182,183), bem como para investigar sua interação com outros compostos (180,184,185). Dessa forma, foram realizadas experiências de EIS, para corroborar e esclarecer a interação dos precursores de corantes capilares com a queratina, utilizando o biossensor eletroquímico de queratina.

Os planos complexos de EIS obtidos, Figura 78, traçam a superfície do GCE sem modificação, modificado com queratina antes e após a interação com os precursores de tinturas capilares, em diferentes períodos de tempo, em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ a pH 8,0, contendo 5,0 mmol L⁻¹ [Fe(CN)₆]⁴⁻/[Fe(CN)₆]³⁻, em Eap = + 0,25 V. Um circuito elétrico equivalente do tipo Randles foi usado para ajustar cada espectro EIS. As alterações nos diâmetros do semicírculo nas parcelas de Nyquist, que são relacionadas à resistência e à transferência de carga (Rct) (186), foram investigadas, e são mostradas na Tabela 18.

O gráfico de EIS do plano complexo para o GCE sem modificação, Figura 78☆, mostrou um semicírculo em altas frequências, como esperado, relacionado à reação de transferência de carga, e em baixas frequências uma linha reta, relacionada ao processo de oxidação limitada por difusão. Para o biossensor eletroquímico de queratina, Figura 78 (violeta), um espectro com semicírculo de maior diâmetro e consequentemente maior Rct foi observado, devido à imobilização de moléculas de queratina na superfície do GCE, o que dificulta a transferência de elétrons entre a sonda redox e a superfície do GCE.



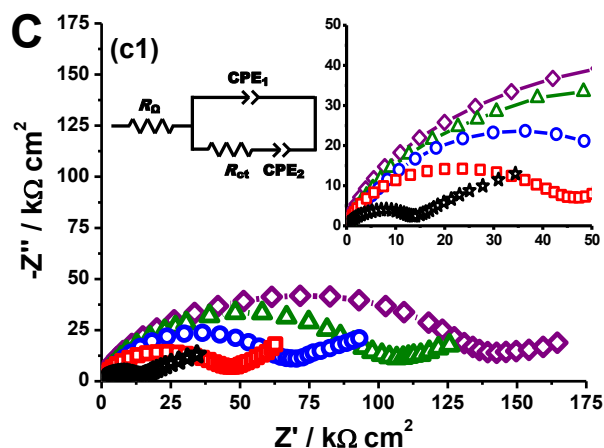


Figura 78. Espectros de impedância de plano complexo, em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ a pH 8,0, em K₄[Fe(CN)₆]/K₃[Fe(CN)₆] a 5,0 mmol L⁻¹, no potencial do ponto médio aplicado, E_{ap} = + 0,25 V: Controle GCE (☆), controle do biossensor eletroquímico de queratina antes (violeta) e após a interação com precursores de tinturas de cabelos: (A) PTD, (B) PAF e (C) PTD + PAF, durante diferentes tempos de incubação: 30 (verde), 60 (azul) e 120 minutos (vermelho). Circuitos elétricos equivalentes (a1), (b1) e (c1).

Fonte: Autor.

Tabela 18. Parâmetros de Randles obtidos para [Fe(CN)₆]⁴⁻/[Fe(CN)₆]³⁻, do plano complexo da EIS, em GCE sem modificação, no biossensor eletroquímico de queratina antes e após a interação com precursores de corantes capilares PTD, PAF e PTD + PAF, durante diferentes períodos de tempo.

Superfície do Eletrodo	Tempo de Incubação (min)	R_{ct} (kΩ cm ²)
GCE	Controle	12,5 ± 4,9
Biossensor eletroquímico queratina	Controle	139,4 ± 3,9
Biossensor eletroquímico PTD-Queratina	30	84,8 ± 1,6
	60	54,9 ± 2,7
	120	37,6 ± 2,0
Biossensor eletroquímico PAF-Queratina	30	93,4 ± 5,1

	60	86,8 ± 2,6
	120	54,9 ± 2,7
Biossensor eletroquímico PTD-PAF-Queratina	30	93,4 ± 5,1
	60	68,3 ± 1,5
	120	36,4 ± 1,1

Fonte: Autor.

O gráfico de EIS do plano complexo obtido após 30 minutos de incubação do biossensor eletroquímico de queratina com $2,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ de PTD, Figura 78A (**verde**), mostrou uma diminuição no diâmetro do semicírculo, resultando em uma diminuição do valor de Rct, em comparação com a queratina controle biossensor eletroquímico, explicado pelo desdobramento da estrutura morfológica da queratina 3D, devido à interação com o precursor de corante capilar PTD, facilitando a reação de transferência de carga. Após 60 minutos, Figura 78A (**azul**) e 120 minutos, Figura 78A (**vermelho**), de incubação, foi observada uma diminuição progressiva dos valores de Rct nos espectros de EIS do plano complexo, confirmando o crescente desdobramento da estrutura 3D da proteína quando em contato com o agente precursor.

Da mesma forma, a interação PAF-queratina, usando o biossensor eletroquímico de queratina, Figura 78B, mostrou uma diminuição contínua dos diâmetros do semicírculo e dos valores de Rct, dependendo do período de incubação, sugerindo que o PAF promoveu uma alteração conformacional na estrutura 3D da queratina, facilitando a reação de transferência de carga.

A interação dos precursores de corantes capilares PTD-PAF-queratina, usando o biossensor eletroquímico de queratina, também foi investigada (Figura 78C). Como esperado, os precursores de tinturas capilares causaram uma forte alteração morfológica da queratina adsorvida na superfície do GCE, o que está relacionado ao seu desdobramento, conforme observado pela diminuição dos diâmetros do semicírculo nos planos complexo dos espectros de EIS e pela diminuição dos valores de Rct.

A interação de ambos os precursores, PTD e PAF, com a queratina não causou grandes alterações quando comparada aos resultados obtidos para a interação com cada agente precursor e a queratina separadamente. Além disso, sugere-se que, analisando os valores de Rct, a PTD mostrou maior influência nas alterações conformacionais da queratina, uma vez

que os resultados obtidos para a interação com os dois agentes precursores estão mais relacionados à interação com a PTD. Finalmente, os resultados obtidos com o biossensor eletroquímico de queratina pela EIS corroboram com os dados obtidos pela DPV.

5.10. Funcionalização das NPM de grupos ácido carboxílicos com L-cisteína

As NPM foram adquiridas já funcionalizadas com grupos ácido carboxílico. Posteriormente, foram funcionalizadas com L-cisteína de acordo com o procedimento descrito na Seção 4.1.4. A Figura 79 mostra a diferença na coloração entre as NPM de ferro funcionalizadas com grupos ácido carboxílico (A) e as NPM de ferro funcionalizadas com grupos ácido carboxílico e L-cisteína (B).

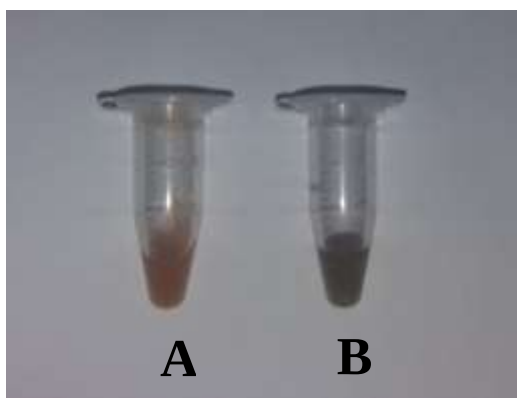


Figura 79. NPM de ferro funcionalizadas com grupos ácido carboxílico (A) e NPM de ferro funcionalizadas com grupos ácido carboxílico e L-cisteína (B).

Fonte: Autor.

Após a funcionalização das NPM de ferro, funcionalizadas com grupos ácido carboxílico, com L-cisteína, observou-se uma mudança de coloração do castanho claro para um coloração castanho escuro (Figura 79). A mudança de coloração é um primeiro indício de que o processo de funcionalização das NPM com a L-cisteína ocorreu com relativo sucesso. No entanto, ainda não se pode afirmar com certeza se essa funcionalização ocorreu, portanto, serão necessárias mais análises a fim de caracterizar as NPM, e avaliar se de fato a funcionalização ocorreu.

5.11. Caracterização das NPM-AC-LC

A fim de caracterizar as NPM-AC-LC e avaliar se a funcionalização com L-cisteína ocorreu, foram realizadas análises de espectrometria de IR, por meio de reflexão atenuada

(ATR). A comprovação do sucesso da funcionalização das nanopartículas magnéticas com L-cisteína foi realizada comparando-se os espectros de IR, obtidos das NPM-AC-LC, com espectros de IR obtidos para as NPM-AC. A Figura 80 mostra os espectros de IR obtidos para a NPM-AC (linha preta) e para as NPM-AC-LC (linha vermelha).

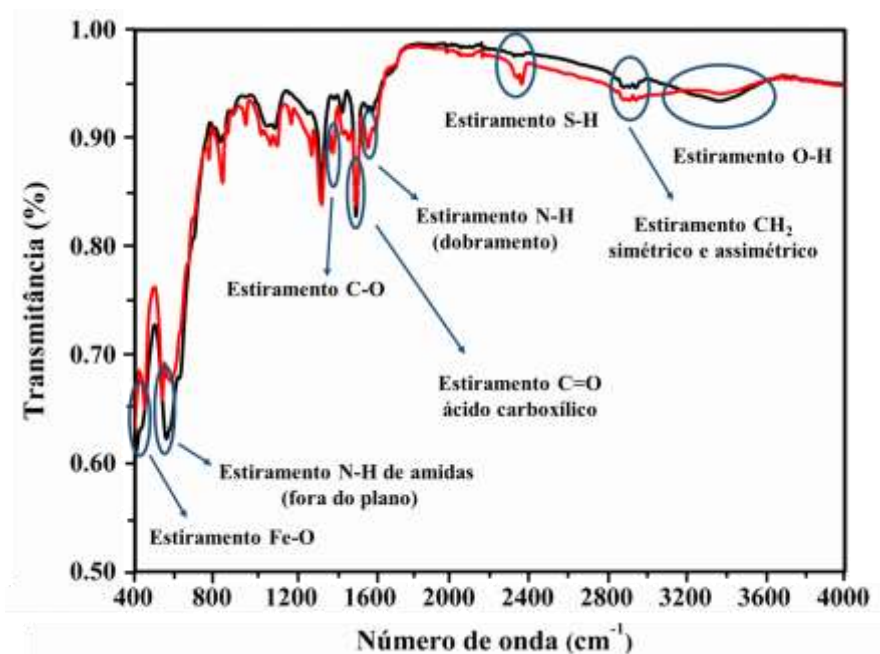


Figura 80. Espectro de IR obtido para NPM-AC (linha preta) e para as NPM-AC-LC (linha vermelha).

Fonte: Autor.

No espectro de IR obtido para as NPM-AC (linha preta, Figura 80) é possível observar uma banda, característica de estiramento Fe-O, em aproximadamente 563 cm^{-1} , uma vez que as NPM de ferro são compostas de Fe_3O_4 . Esta banda deveria ser em aproximadamente 590 cm^{-1} , mas aparece um pouco deslocada. Esse deslocamento é característico de NPM de ferro que sofreram funcionalização, e é um forte indicativo de que essas NPM foram de fato funcionalizadas em sua superfície (150,161). Pode-se observar também uma banda de estiramento O-H, muito longa, no intervalo de 3098 a 3603 cm^{-1} , e outra banda característica de estiramento O-H fora do plano no intervalo de 1059 a 1117 cm^{-1} (151). Observou-se uma banda, característica de estiramento C-O, de intensidade média, próximo a 1345 cm^{-1} (151), e outra banda, característica de estiramento C=O de ácido carboxílico, em 1521 cm^{-1} (150,151,187,188,189). Por fim são observadas bandas características de estiramento CH_2 , simétrico e assimétrico, em aproximadamente 2841 , 2880 e em 2910 e 2941 cm^{-1} , respectivamente (150,151,188,189). No entanto, não é possível

visualizar a banda característica de estiramento C-H, pois essa é coberta pela banda de estiramento O-H. (151)

Para o espectro de IR obtido para as NPM-AC-LC (**linha vermelha**, Figura 80) é possível observar uma banda característica de estiramento Fe-O em 538 cm^{-1} (151,187), semelhante as NPM funcionalizadas somente com grupos ácido carboxílico. Essa banda também sofreu um deslocamento, indicando que as NPM foram modificadas em sua superfície. Portanto, mais uma evidência de que a funcionalização com L-cisteína ocorreu (150). Nota-se uma banda, característica de estiramento N-H de amidas, fora do plano em 583 cm^{-1} (151). Porém, não há a possibilidade de identificar a outra banda característica do estiramento N-H de amidas em 3300 cm^{-1} , pois essa banda está encoberta pela banda de estiramento O-H. No entanto, é possível identificar o dobramento característico do estiramento da banda N-H em 1581 cm^{-1} (150,151). Observou-se uma banda, característica de estiramento C=O de amidas, em 1619 cm^{-1} (150,151,188,189). Foi identificada uma banda característica do estiramento S-H em 2360 cm^{-1} , confirmando a funcionalização das NPM com L-cisteína, uma vez que essas bandas não estão presentes no espectro de IR obtido para as NPM funcionalizadas somente com grupos ácido carboxílico (150,151). Observou-se uma banda de estiramento O-H, muito longa, no intervalo de $3263\text{ a }3603\text{ cm}^{-1}$ (150,151). Observou-se uma banda característica de estiramento C-O, de intensidade média, próximo a 1345 cm^{-1} e outra banda, característica de estiramento C=O de ácido carboxílico, em 1521 cm^{-1} . Por fim são observadas bandas, características de estiramento CH_2 simétrico e assimétrico, em aproximadamente 2841 , 2880 e em 2910 e 2941 cm^{-1} , respectivamente (150,151,188,189). No entanto, não é possível visualizar a banda característica de estiramento C-H, pois está encoberta pela banda de estiramento O-H. (151)

Portanto, as análises de espectrometria de IR confirmam que as NPM de ferro, funcionalizadas inicialmente com ácido carboxílico, foram modificadas e funcionalizadas com L-cisteína. No mais, indicam que o composto formado pela reação entre os grupos ácido carboxílico, presentes na superfície das NPM, e a L-cisteína é uma amida secundária, e assim pode-se concluir que a síntese de funcionalização dessas nanopartículas foi realizada com êxito.

Medidas de MEV foram realizadas, em um microscópio eletrônico de varredura de canhão de emissão de elétrons por efeito de campo (MEV-FEG), com o objetivo de caracterizar e visualizar a superfície das NPM-AC-LC. A Figura 81 mostra as imagens de

MEV-FEG obtidas para as NPM-AC-LC aumentadas 1.500 vezes (A), 5.000 vezes (B), 50.000 vezes (C) e 100.000 vezes (D).

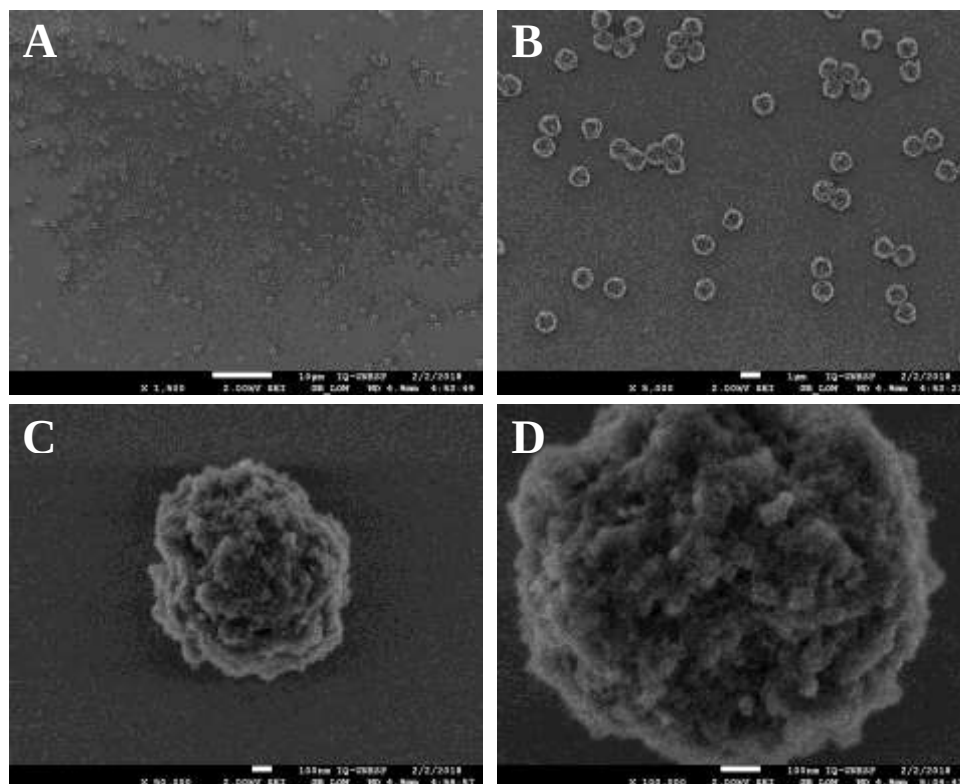


Figura 81. Imagens de MEV-FEG obtidas para as NPM-AC-LC aumentadas 1.500 vezes (A), 5.000 vezes (B), 50.000 vezes (C) e 100.000 vezes (D).

Fonte: Autor.

As NPM-AC-LC, Figura 81, apresentaram uma forma esférica e uma superfície bastante rugosa. A partir de várias imagens de MEV-FEG obtidas das NPM-AC-LC, semelhante às obtidas na Figura 81A, foi possível construir um histograma referente ao diâmetro das NPM-AC-LC, conforme é mostrado na Figura 82.

De acordo com o histograma obtido referente ao diâmetro das NPM-AC-LC, Figura 82, é possível observar que as nanopartículas apresentam um diâmetro que variou de 46 a 115 nm, em um total de 250 nanopartículas contadas, e com um diâmetro médio de 85 ± 20 nm.

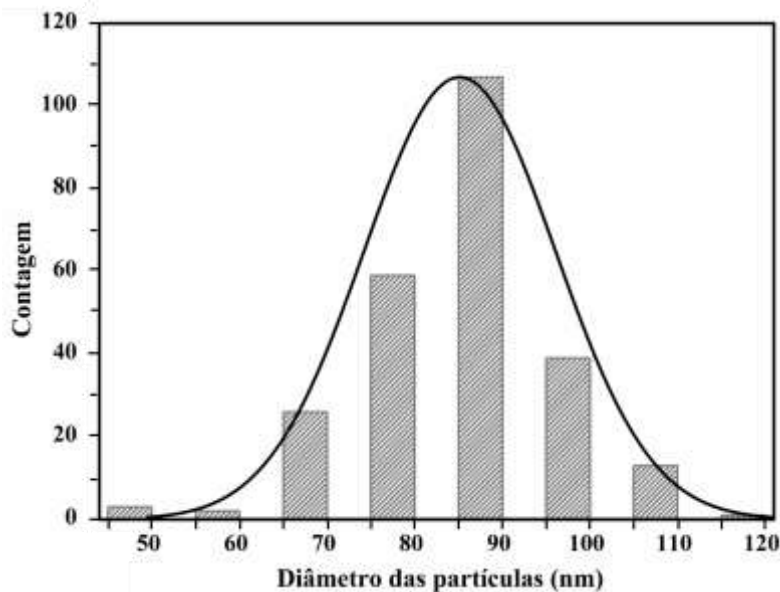


Figura 82. Histograma referente ao diâmetro das NPM-AC-LC.

Fonte: Autor.

Para investigar a composição elementar da superfície das NPM-AC-LC, foi realizada uma análise de energia dispersiva de raios X (EDX). O espectro obtido é apresentado na Figura 83.

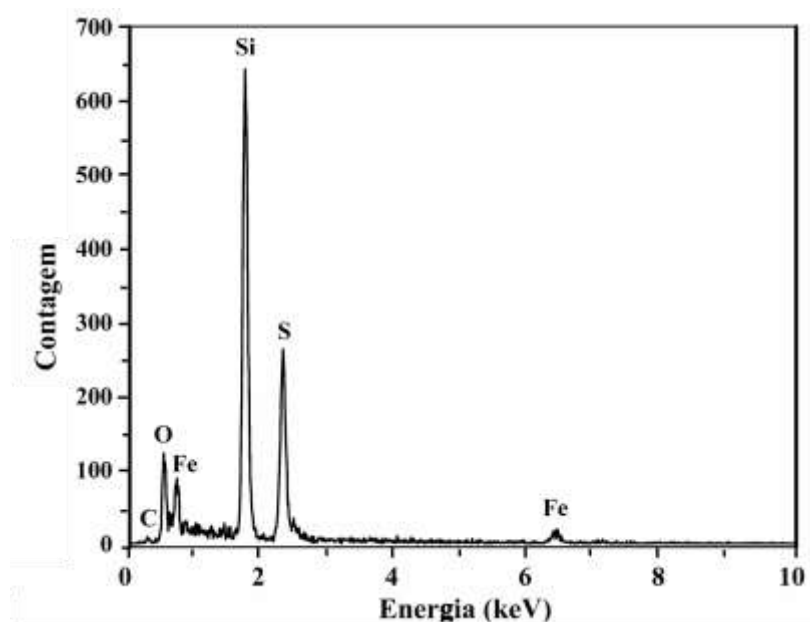


Figura 83. Espectros de energia dispersiva de raios X (EDX) das NPM-AC-LC.

Fonte: Autor.

O espectro de EDX obtido para as NPM-AC-LC, Figura 83, confirma a presença de carbono em 0,26 keV, de oxigênio em 0,53 keV, ferro em 0,71 e 6,41 keV, silício em 1,73 keV e enxofre em 2,30 keV. Este resultado indica que as NPM de ferro foram funcionalizadas com grupos de compostos que contém em sua estrutura carbono, oxigênio e enxofre, como é o da L-cisteína. Porém pela baixa sensibilidade do método, não foi possível observar bandas relacionadas ao nitrogênio.

A Figura 84 mostra imagens de MEV-FEG da superfície do eletrodo de carbono impresso aumentada 15.000 vezes (A), das NPM-AC-LC sobre a superfície do eletrodo de carbono impresso aumentadas 1.500 vezes (B), 5.000 vezes (C) e 25.000 vezes (D).

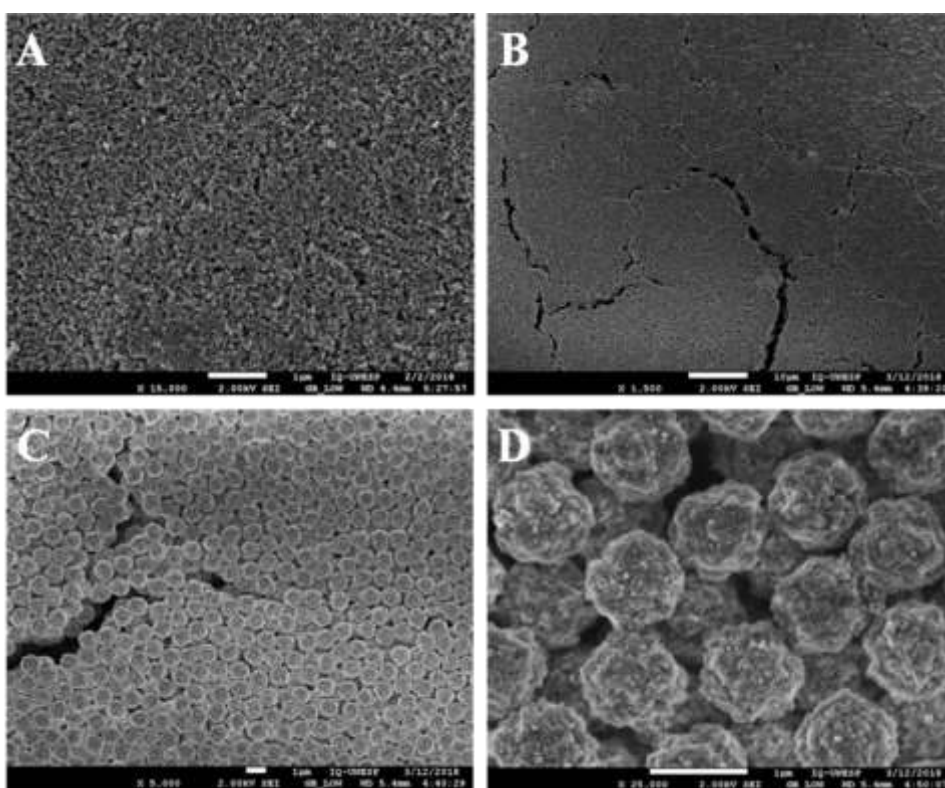


Figura 84. Imagens de MEV-FEG da superfície do eletrodo de carbono impresso aumentada 15.000 vezes (A), das NPM-AC-LC sobre a superfície do eletrodo de carbono impresso aumentadas 1.500 vezes (B), 5.000 vezes (C) e 25.000 vezes (D).

Fonte: Autor.

A Figura 85 mostra imagens de TEM das NPM-AC-LC (A), imagens HR-TEM das NPM-AC-LC (B), imagem ampliada da área das NPM-AC-LC (C) e padrão de difração cristalina de uma NPM-AC-LC (D).

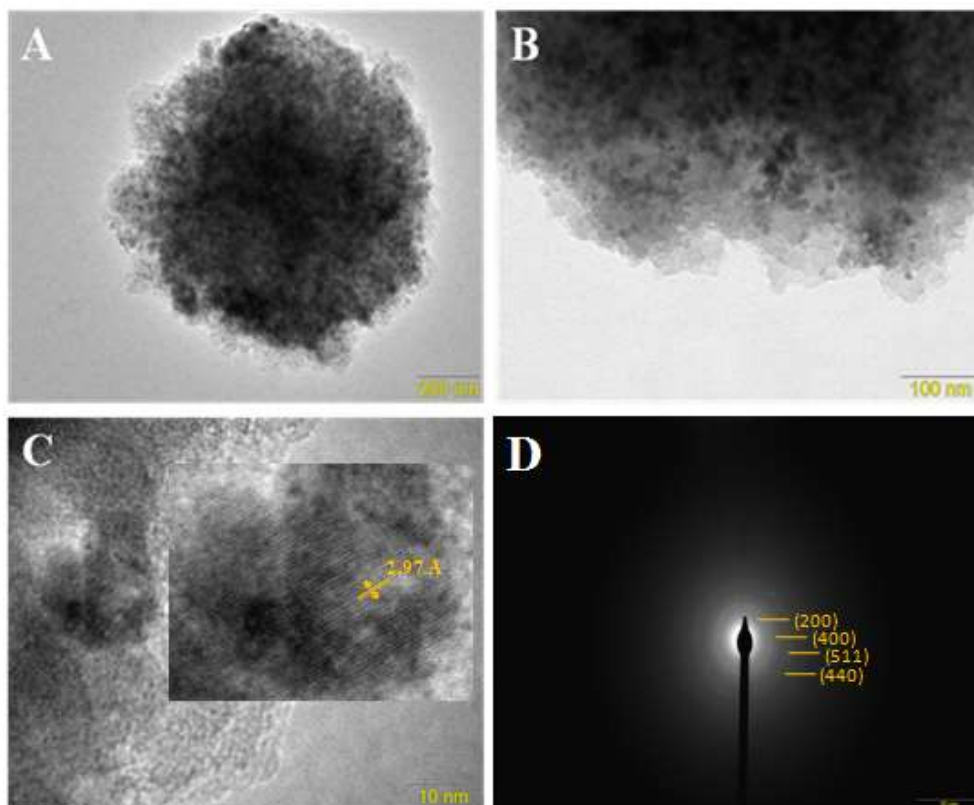
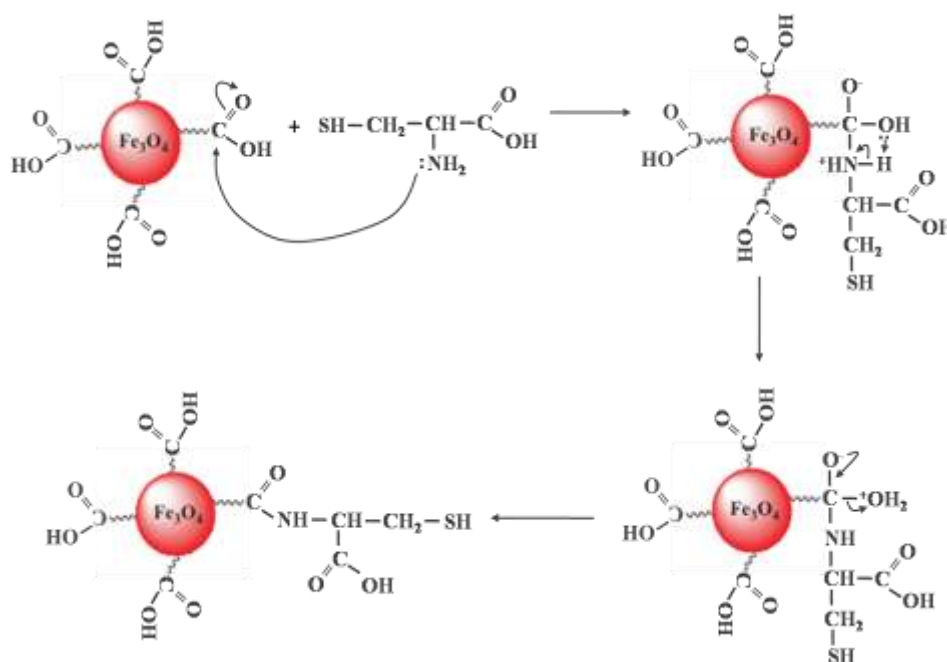


Figura 85. Imagens de TEM das NPM-AC-LC (A), imagens HR-TEM das NPM-AC-LC (B), imagem ampliada da área das NPM-AC-LC (C) e padrão de difração cristalina de uma NPM-AC-LC (D).

Fonte: Autor.

As imagens de TEM, Figuras 85A e 85B, mostraram que as NPM estão aglomeradas dentro de uma rede amorfa composta de matéria orgânica, provavelmente compostos com grupamentos ácido carboxílico e L-cisteína, uma vez que as NPM foram modificadas com esses compostos. Na Figura 85C, é possível visualizar a natureza policristalina das partículas, onde temos em destaque um plano atômico de uma NPM, que tem uma distância interplanar de 2,97 Å, distância que está associada ao plano (220) da magnetita [94]. No entanto, é possível observar com maior detalhe uma camada amorfa revestindo a NPM, provavelmente composta de compostos com grupamentos ácido carboxílico e L-cisteína.

Diante disso, pressupõe-se que os grupos amino da L-cisteína se liguem covalentemente ao grupo carboxílico da NPM (150), conforme é mostrado no Esquema 9.



Esquema 9. Representação esquemática da reação de funcionalização das NPM funcionalizadas com grupos ácidos carboxílicos com a L-cisteína.

Fonte: Autor.

Na Figura 85D, é apresentado o padrão de difração cristalina de uma NPM, onde são mostrados os planos cristalográficos (200), (400), (440) e (511) da magnetita [94]. Nota-se que os anéis de difração são formados por poucos pontos, isto é, devido à dificuldade da obtenção da imagem, uma vez que a NPM está aglomerada dentro de uma rede amorfa de cadeia orgânica. Para a confirmação de que a NPM é de fato magnetita, análise de difração de raios X foi realizada. O difratograma de raios X da NPM-AC-LC é mostrado na Figura 86.

O difratograma de raios X das NPM-AC-LC, Figura 86, mostra a formação de nanopartículas de uma única fase. Os picos de difração de raio X característicos das distâncias interplanares das fases de Fe_3O_4 foram indexados de acordo com o banco de dados de estruturas cristalina do JCPDS - 2003, e confirmam que as NPM-AC-LC são de fato cristais de magnetita.

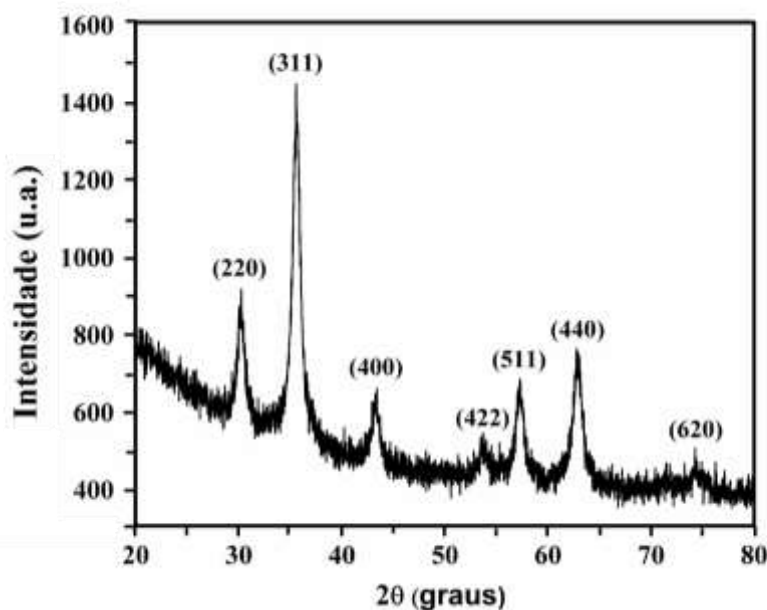


Figura 86. Difratoograma de raios X das NPM-AC-LC.

Fonte: Autor.

5.12. Comportamento eletroquímico da PTD e do PAF sobre as NPM-AC-LC

Medidas de voltametria cíclica foram obtidas, com velocidade de varredura de 50,0 mV s⁻¹, em uma cela eletroquímica de 10,0 mL e um sistema contendo o eletrodo impresso, acoplado ao suporte magnético e conectado por um cabo adaptador para eletrodo impresso a um potenciostato/galvanostato. As NPM funcionalizadas foram depositadas sobre o eletrodo de trabalho através de uma ponteira de pipetador automático de plástico, e mantidas por atração magnética do ímã de neodímio fixado no suporte, conforme é mostrado na Figura 16 (parte experimental).

Posteriormente, o comportamento eletroquímico da solução de PTD, a uma concentração de $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, foi investigado sobre o eletrodo impresso de carbono (B), eletrodo impresso modificado com NPM-AC (C) e eletrodo impresso modificado com NPM-AC-LC (D), por CV, em solução de eletrólito suporte de tampão BR 0,1 mol L⁻¹ a pH 4,0. Os voltamogramas cíclicos obtidos para a PTD estão dispostos na Figura 87.

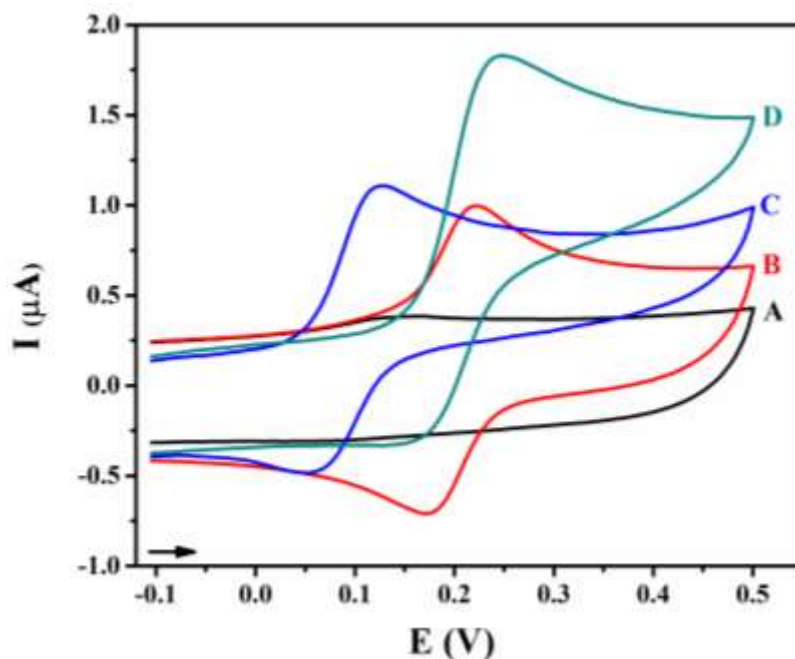


Figura 87. Voltamogramas cíclicos obtidos para a oxidação $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão BR (pH 4,0) (A) e para $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de PTD em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão BR (pH 4,0) em eletrodo impresso de carbono (B), eletrodo impresso modificado com NPM-AC (C) e eletrodo impresso modificado com NPM-AC-LC (D). Velocidade de varredura $\nu = 50,0 \text{ mV s}^{-1}$.

Fonte: Autor.

A oxidação voltamétrica da PTD sobre o eletrodo impresso de carbono, Figura 87B, mostrou que a oxidação do grupo amina da PTD ocorre em potencial de $E_{ox} = 0,23 \text{ V}$ e um pico na varredura reversa em potenciais de $E_{red} = 0,17 \text{ V}$. A variação entre $E_{pa} - E_{pc} = 60,0 \text{ mV}$ e os valores da relação entre $I_{pa}/I_{pc} = 0,99$ obtidos, indicam características de um processo reversível de 1 elétron (e^-) (134,171). Para o voltamograma obtido para a PTD no eletrodo impresso de carbono modificado com NPM-AC, Figura 87C, observou-se um par de picos em potenciais de $E_{ox} = 0,12 \text{ V}$ e $E_{red} = 0,06 \text{ V}$, com valores de $E_{pa} - E_{pc} = 60,0 \text{ mV}$ e os valores da relação entre $I_{pa}/I_{pc} = 0,47$, mostrando comportamento de um processo reversível com reações químicas envolvendo o produto (134,171). Para o voltamograma obtido para a PTD no eletrodo impresso de carbono modificado com NPM-AC-LC, Figura 87D, observa-se um processo de oxidação irreversível (134,171) em $E_{ox} = 0,25 \text{ V}$.

A comparação entre os valores de corrente de pico anódica para a PTD mostrou que para o eletrodo modificado com NPM-AC-LC, a corrente de pico é 22,2% maior comparada a corrente de pico observada para o eletrodo impresso sem as NPM. Para o eletrodo modificado com as NPM-AC-LC, a corrente de pico é 56,3% maior comparada a corrente de pico

observada para o eletrodo impresso sem NPM, indicando que a metodologia poderia ser usada para incrementar a resposta dos sinais voltamétricos.

Voltamogramas cíclicos obtidos para $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de PAF em tampão BR 0,1 mol L⁻¹ a pH 4,0 em eletrodo impresso de carbono (B), eletrodo impresso modificado com NPM-AC (C) e eletrodo impresso modificado com NPM-AC-LC (D) são mostrados respectivamente na Figura 88.

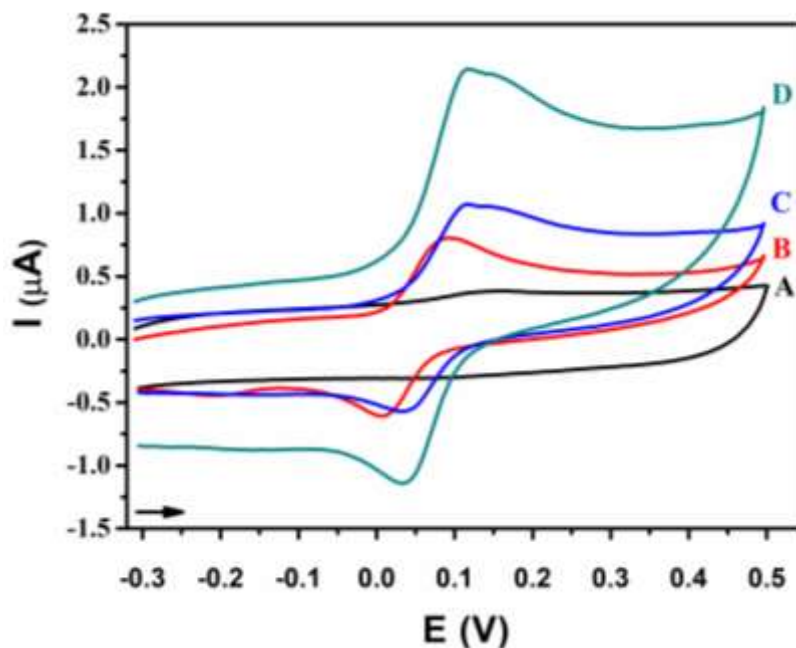


Figura 88. Voltamogramas cíclicos obtidos para a oxidação 0,1 mol L⁻¹ de tampão BR (pH 4,0) (A) e para $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de PAF em 0,1 mol L⁻¹ de tampão BR (pH 4,0) em eletrodo impresso de carbono (B), eletrodo impresso modificado com NPM-AC (C) e eletrodo impresso modificado com NPM-AC-LC (D). Velocidade de varredura $\nu = 50,0$ mV s⁻¹.

Fonte: Autor.

O voltamograma obtido para o PAF no eletrodo impresso de carbono sem as NPM, Figura 88B, apresentou um par de pico em potenciais de $E_{ox} = 0,07$ V e $E_{red} = 0,01$ V, com $E_{pa} - E_{pc} = 60$ mV e valores da relação entre $I_{pa}/I_{pc} = 0,95$, apresentando características de um processo reversível de 1 elétron (e^-) (134,171). Para o voltamograma obtido para o PAF, no eletrodo impresso de carbono modificado com NPM-AC, Figura 88C, observou-se um par de picos em potenciais de $E_{ox} = 0,10$ V e $E_{red} = 0,04$ V, com valores de $E_{pa} - E_{pc} = 60$ mV e os valores da relação entre $I_{pa}/I_{pc} = 0,64$; mostrando comportamento de um processo reversível com reações químicas do produto (134,171). Para o voltamograma obtido para o PAF, no eletrodo impresso de carbono modificado com NPM-AC-LC, Figura 88D, observou-

se um par de picos em $E_{ox} = 0,15$ V e $E_{red} = 0,09$ V, com valores de $E_{pa} - E_{pc} = 60$ mV e os valores da relação entre $I_{pa}/I_{pc} = 0,45$, mostrando também comportamento de um processo reversível com reações químicas envolvendo o produto. (134,171)

A comparação entre os valores de corrente de pico anódica para o PAF, mostra que no eletrodo modificado com NPM-AC, a corrente de pico é 27,8% maior comparada a corrente de pico observada para o eletrodo impresso sem NPM. Para as NPM-AC-LC a corrente de pico é 54,5% maior comparada a corrente de pico observada para o eletrodo impresso sem NPM, indicando que a metodologia poderia ser usada para incrementar a resposta dos sinais voltamétricos.

5.13. Otimização dos parâmetros eletroquímicos

A influência do tempo de deposição na corrente de pico anódico foi investigada, registrando-se voltamogramas cíclicos obtidos para $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de PTD e PAF, respectivamente, em tampão BR 0,1 mol L⁻¹ a pH 4,0, sobre o eletrodo impresso de carbono modificado com NPM-AC-LC. As respectivas curvas de corrente de pico anódica (I_{pa}) vs tempo de deposição que estão mostradas na Figura 89.

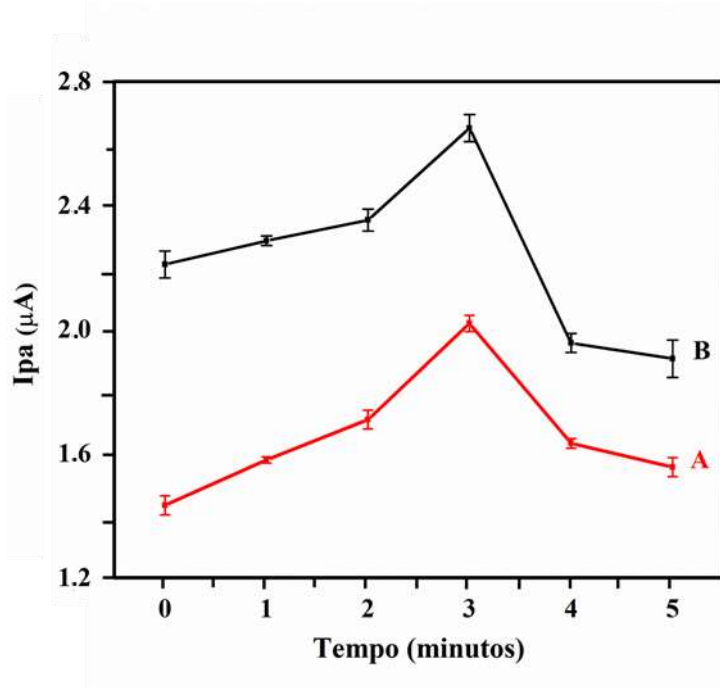


Figura 89. Tempo de deposição de $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de PTD (A) e PAF (B), em tampão BR 0,1 mol L⁻¹ a pH 4,0, em eletrodo impresso de carbono modificado com NPM-AC-LC.

Fonte: Autor.

Observa-se que a maior intensidade de corrente de pico anódica é obtida no tempo de 3 minutos, tanto para a PTD quanto para o PAF, depositados sobre o eletrodo modificado. Portanto, o tempo de 3 minutos foi adotado nos experimentos posteriores.

O efeito da concentração das NPM-AC-LC depositadas sobre a superfície do eletrodo impresso também foi avaliada, entre 0,5 e 2,0 mg mL⁻¹. A Figura 90 mostra o gráfico de I_{pa} vs concentração nanopartículas em 1,0×10⁻⁵ mol L⁻¹ de PTD e PAF, respectivamente, em tampão BR 0,1 mol L⁻¹ a pH 4,0.

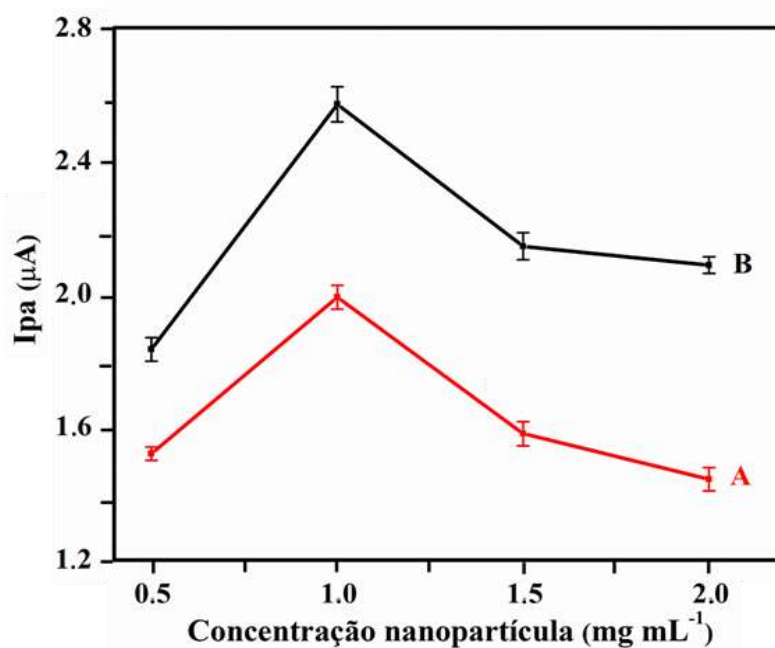


Figura 90. Concentração de NPM-AC-LC em 1,0×10⁻⁵ mol L⁻¹ de PTD (A) e PAF (B) em tampão BR 0,1 mol L⁻¹ a pH 4,0.

Fonte: Autor.

O gráfico de I_{pa} vs Concentração de NPM-AC-LC, Figura 90, mostra que tanto para a PTD quanto para o PAF, a corrente de pico anódica (I_{pa}) aumenta até concentração de 1,0 mg mL⁻¹. Porém concentrações de NPM-AC-LC maiores que 1,0 mg mL⁻¹, diminuem significativamente para ambos os analitos. Isto pode ser atribuído ao excesso de reconstituintes que interferem no processo de transferência de carga. Portanto, diante dos resultados apresentados, escolheu-se a concentração de 1,0 mg mL⁻¹ de NPM-AC-LC para a determinação de PTD e de PAF.

Considerando que o volume adicionado das NPM-AC-LC, que seriam depositadas na superfície do eletrodo impresso, poderiam interferir na corrente de pico, voltamogramas

foram registrados para adições de 10,0 a 70,0 μL da solução de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ de NPM-AC-LC. A Figura 91 compara o efeito do volume adicionado de NPM-AC-LC adicionadas sobre o eletrodo em $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de PTD (linha preta) e PAF (linha vermelha) em tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 4,0.

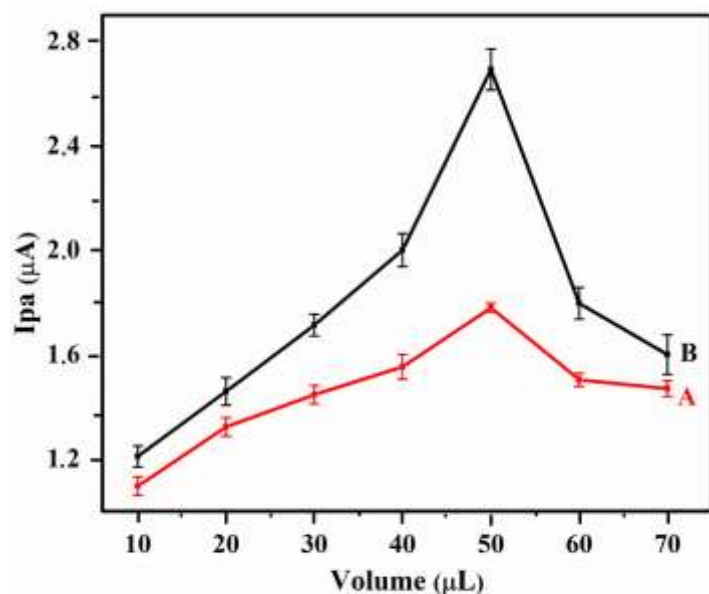


Figura 91. Volume de NPM-AC-LC em $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de PTD (A) e PAF (B) em tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 4,0.

Fonte: Autor.

O gráfico de Ipa vs volume de NPM-AC-LC, Figura 91, mostra que o volume de NPM-AC-LC interfere na pré-concentração dos analitos, e que a corrente de pico anódica (Ipa) aumenta entre os volume de 10,0 e 50,0 μL da solução de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ de NPM-AC-LC. Porém volumes de NPM-AC-LC superiores a 50,0 μL , tem uma queda significativa na Ipa para ambos os analitos. Portanto, escolheu-se adições de 50,0 μL da solução de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ NPM-AC-LC para as determinações posteriores.

No entanto, ainda será necessário avaliar outras técnicas eletroquímicas, como a voltametria linear e a pulso diferencial, na determinação da PTD e do PAF, bem como realizar um estudo de pH, e validar a metodologia proposta com o objetivo de realizar a determinação simultânea, com maior sensibilidade e seletividade, dos analitos em diferentes amostras ambientais e biológicas.

6. Considerações Finais

Neste trabalho foi investigada a reação de oxidação da PTD, do PAF e da reação entre os dois em tampão amônio a pH 8,0 em atmosfera de oxigênio dissolvido e na presença de peróxido de hidrogênio. A reação de oxidação da PTD apresentou a formação de vários intermediários de reação como os derivados do radical semi-quinonadiimina, quinonadiimina, difenilamina e o produto derivado da BB. A oxidação do PAF apresentou a formação de vários intermediários de reação como os derivados do radical semi-quinonaimina, quinonaimina, além da formação de dímeros, trímeros e tetrâmero. A reação entre a PTD e o PAF apresentou a formação de vários intermediários e produtos finais de reação oriundos da oxidação tanto da PTD quanto do PAF. Além desses produtos, foram identificados ao todo a formação de seis produtos diferentes, sendo que grande parte desses produtos formaram uma mistura de precipitados.

Nos testes de mutagenicidade realizados, o derivado da BB mostrou alta mutagenicidade juntamente com os produtos de reação da PTD e do PAF juntos. Os produtos finais de reação da oxidação do PAF, trímero e tetrâmero não foram mutagênicos. Testes de toxicidade aguda, realizados para os produtos reação entre a PTD e o PAF mostraram alta toxicidade.

Uma metodologia analítica foi desenvolvida para a determinação de PTD e PAF por CLAE/DAD. O método obteve relações boas lineares, bons limites de detecção de quantificação e boa recuperação. O método foi aplicado de maneira satisfatória em amostras de água, bem como em amostra de efluente de salão de cabeleireiros. As concentrações encontradas, de PTD e de PAF, para amostra de água antes do tratamento foi de $2,48 \pm 0,10 \times 10^{-3}$ e $1,90 \pm 0,30 \times 10^{-3}$ mg L⁻¹, para a amostra de água após o tratamento foi de $1,77 \pm 0,10 \times 10^{-3}$ e $1,90 \pm 0,30 \times 10^{-3}$ mg L⁻¹, e para amostra de efluente de salão de cabeleireiros foi de $2,08 \pm 0,20$ mg L⁻¹ e $2,10 \pm 0,50$ mg L⁻¹, respectivamente. Na amostra de efluente foram identificados vários produtos da oxidação da PTD, do PAF e da reação entre ambos. Isso mostra que quantidades consideráveis desses produtos estão sendo descartados no esgoto comum diariamente.

O comportamento eletroquímico oxidativo da PTD e do PAF foi investigado. As reações de oxidação da PTD e do PAF mostraram ser reversíveis. A reação foi controlada por difusão, pela transferência de dois elétrons e dois prótons para a PTD, que ocorreu nos átomos de nitrogênio dos grupos amina da molécula. A oxidação do PAF foi controlada por

difusão, e pela transferência de dois elétrons e dois prótons, que ocorreu nos átomos de oxigênio e nitrogênio dos grupos hidroxila e amina da molécula, respectivamente.

Uma metodologia analítica para quantificação desses precursores, em amostras de fluidos biológicos de soro fetal bovino (simulando o plasma sanguíneo humano) e de urina artificial (simulando a urina humana), foi desenvolvida. O método eletroanalítico desenvolvido foi aplicado satisfatoriamente para a determinação de PTD e PAF em amostras de soro fetal bovino e de urina artificial.

O comportamento eletroquímico da queratina capilar humana foi investigado pela construção de um biossensor de queratina. O comportamento eletroquímico da queratina mostrou dois picos de oxidação dependentes do pH. O primeiro pico correspondeu ao primeiro pico de oxidação dos resíduos de aminoácidos cisteína, P1Cis, em $EP1 = + 0,53 \text{ V}$, e o segundo pico correspondeu ao terceiro pico de oxidação dos resíduos aminoácidos cisteína e o segundo pico de aminoácidos metionina P2Cis + Met, em $EP2 = + 1,28 \text{ V}$.

Os resultados dos experimentos de desnaturação e da interação da queratina com os precursores, a fim de entender o processo de tingimento dos cabelos e a fixação desses compostos no interior da fibra capilar, mostraram que tanto os agentes desnaturantes, quanto os agentes redutores e precursores promoveram um aumento nas correntes de pico dos resíduos de aminoácidos eletroativos, ao longo do tempo de incubação. Provavelmente, esses compostos não induziram dano oxidativo à queratina, mas causaram um desdobramento da estrutura morfológica, e isso proporcionou que resíduos de aminoácidos, que estavam enterrados ou encobertos, ficassem mais expostos à superfície do biossensor, facilitando sua oxidação. Além disso, foi verificado o aparecimento de novos picos de resíduos de outros aminoácidos presentes na estrutura da queratina, que também pelo desdobramento da estrutura da molécula da queratina, estavam enterrados e/ou encobertos.

O eletrodo modificado com as NPM mostrou-se bastante promissor na determinação da PTD e do PAF, com um ganho de corrente de 34,0% para a PTD e de 51,7% vezes para o PAF comparado ao eletrodo impresso sem as NPM. O método foi otimizado quanto ao tempo de deposição dos analitos, concentração e volume de NPM a serem depositadas sobre o eletrodo, e as otimizações apresentaram como condições ótimas um tempo de deposição de 3 minutos, concentração e volume de NPM de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ e $50,0 \text{ }\mu\text{L}$, respectivamente.

Diante dos resultados obtidos nas determinações, quantidades de PTD e PAF estão sendo descartadas no esgoto comum das cidades juntamente com o resíduo de lavagem dos cabelos após o procedimento de tingimento dos cabelos com formulações comerciais de

tinturas capilares permanentes. Levando em consideração que nem todo o esgoto das cidades é tratado, devido ainda pela não captação de 100% do esgoto, por ainda existirem ligações clandestinas de descarte e pela ineficiência do processo de tratamento convencional para esse tipo de efluente, parte desse resíduo acaba por ser despejado em rios, lagos, represas e mananciais das cidades, podendo contaminar essas fontes de água com PTD e PAF, que podem sofrer oxidação e formar seus produtos de oxidação com alta mutagenicidade e toxicidade.

Além disso, as cidades utilizam dessas fontes para o abastecimento de água de sua população, e conforme mostrou as análises de PTD e de PAF, as estações de tratamento de água convencionais não conseguem tratar adequadamente, ou eliminar por completo esses compostos e seus produtos de oxidação. Isso leva as pessoas a consumirem diariamente água contaminada com esses produtos que possuem alta toxicidade, de acordo com os testes de realizados.

Deste modo, é importante ressaltar a importância do monitoramento não apenas destes corantes, mas também dos subprodutos provenientes da tintura de cabelos em efluentes, esgotos domésticos, águas naturais e destinadas ao consumo humano, com vistas a obter mais dados sobre a sua persistência, biotransformação, transporte e destino no meio ambiente, contribuindo para uma avaliação dos riscos envolvidos na utilização desses corantes em processos de tintura de cabelo.

7. Referências bibliográficas

- (1) HOREV, L. Exogenous factors in hair disorders. **Exogenous Dermatology**, v. 3, p. 237-245, 2004.
- (2) GUERRA-TAPIA, A.; GONZALEZ-GUERRA, E. Hair Cosmetics: Dyes. **Actas Dermo-Sifiliográficas**, v. 105, p. 833-839, 2014.
- (3) SHIEL, S. Hair health and management of common hair disorders. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 6, p. 12-17, 2007.
- (4) TRÜEB, R. M. Aging of hair. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 4, p. 60-72, 2005.
- (5) BOLDUC, C.; SHAPIRO, J. Hair care products: Waving, straightening, conditioning, and coloring. **Clinics in Dermatology**, v. 19, p. 431-436, 2001.

- (6) SINCLAIR, R. D. Healthy hair: What is it? **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 12, p. 2-5, 2007.
- (7) MOITA, G. C. **Propriedades físico-químicas de cabelo: avaliação de interações com corante e surfactantes**. 1989. 145 f. Dissertação (Mestrado em Química) Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1989.
- (8) OLIVEIRA, R. A. G.; ZANONI, T. B.; OLIVEIRA, D. P.; UMBUZEIRO, G. A.; ZANONI, M. V. B. A química e toxicidade dos corantes de cabelo. **Química Nova**, v. 37, n. 6, p. 1037-1046, 2014.
- (9) NEUSER, F.; SCHATTER, H. Hair dyes. In: DRAELOS, Z. D. (Ed.). **Cosmetic dermatology: products and procedures**. Oxford: Wiley-Blackwell, 2010. Chap. 3, p. 256-310.
- (10) HARRISON, S.; SINCLAIR, R. Hair colouring, permanent styling and hair structure. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 2, p. 180-185, 2003.
- (11) GHOSH, P.; SINHA, A. K. Hair colors: classification, chemistry and a review of chromatographic and electrophoretic methods for analysis. **Analytical Letters**, v. 41, p. 2291–2321, 2008.
- (12) HUDARI, F. F.; ALMEIDA, L. C.; SILVA, B. F.; ZANONI, M. V. B. Voltametric sensor for simultaneous determination of p-phenylenediamine and resorcinol in permanente hair dyeing and tap water by composite carbon nanotubes/chitosan modified electrode. **Microchemical Journal**, v. 116, p. 261-268, 2014.
- (13) MOREL, O. J. X.; CHRISTIE, R. M. Current trends in the chemistry of permanent hair dyeing. **Chemical Reviews**, v. 111, p. 2537-2561, 2011.
- (14) PÜNTENER, A. G.; SCHLESINGER, U. Natural dyes. In: FREEMAN, H. S. F.; PETERS, A. T. (Eds.). **Colorants for non-textile applications**. Amsterdam: Elsevier Science, 2000. Chap. 9, p. 382-455.
- (15) CHARLE, R.; SAG, G. Early synthetic organic hair dyes. **Manufacturing Chemist and Aerosol News**, v. 1, p. 33-37, 1967.

- (16) CORBETT, J. F. An historical review of the use of dye precursors in the formulation of commercial oxidation hair dyes. **Dyes and pigments**, v. 41, p. 127-136, 1999.
- (17) CORBETT, J. F. **Hair colorants: chemistry and toxicology**. 2nd ed. Weymouth: Micelle Press, 1998.
- (18) DRAELOS, Z. D. **Hair Care - An Illustrated Dermatologic**. 1st ed. London: Taylor & Francis, 2005.
- (19) BOUILLON, C.; WILKINSON, J. **The Science of Hair Care**. 2nd ed. London: Francis & Taylor, 2005.
- (20) SOSTED, H.; RASTOGI, S. C.; ANDERSEN, K. E.; JOHANSEN, J.D.; MENNE, T. Hair dye contact allergy: quantitative exposure assessment of selected products and clinical cases. **Contact Dermatitis**, v. 50, p. 3444-3448, 2004.
- (21) ZANONI, T. B.; HUDARI, F. F.; MUNNIA, A.; PELUSO, M.; GODSCHALK, R. W.; ZANONI, M. V. B.; DEN HARTOG, G. J. M.; BAST, A.; BARROS, S. B. M.; MARIA-ENGLER, S. S.; HAGEMAN, G. J.; OLIVEIRA, D. P. The oxidation of p-phenylenediamine, an ingredient used for permanent hair dyeing purposes, leads to the formation of hydroxyl radicals: oxidative stress and DNA damage in human immortalized keratinocytes. **Toxicology Letters**, v. 239, p. 194-204, 2015.
- (22) ANDREW, A. S.; SCHNED, A. R.; HEANY, J. A.; KARAGAS, M. R. Bladder cancer risk and personal hair dye use. **International Journal of Cancer**, v. 109, p. 581-586, 2004.
- (23) SCARPI, C.; NINCI, F.; CENTINI, M.; ANSELMINI, C. High-performance liquid chromatography determination of direct and temporary dyes in natural hair colourings. **Journal of Chromatography A**, v. 796, n. 2, p. 319-325, 1998.
- (24) CHISVERT, A.; CHÁFER, A.; SALVADOR, A. Hair dye in cosmetics. Regulatory aspects an analytical methods. In: ELSEVIER (Ed.). **Analysis of Cosmetic Products**. Amsterdam: Elsevier Science, 2007. Chap. 4, p.190-209.
- (25) MUKUND, J. S.; TOLGYESI, W. S.; BRITT, A. D. Cooxidation of p-phenylenediamine and resorcinol in hair dyes. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, v. 25, p. 853-861, 1972.

- (26) BROWN, K. C.; CORBETT, J. F. The role of meta difunctional benzene derivatives in oxidative hair dyeing. II. Reactions with p-aminophenol. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, v. 30, n. 4, p. 191-211, 1979.
- (27) NOHYNEK, G. J.; FAUTZ, R.; BENECH-KIEFFER, F.; TOUTAIN, H. Toxicity and human health risk of hair dyes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, n. 4, p. 517-543, 2004.
- (28) MEYER, A.; FISCHER, K. Oxidative transformation processes and products of para-phenylenediamine (PPD) and para-toluenediamine (PTD) – a review. **Environmental Sciences Europe**, v. 27, n. 11, p.1-16, 2015.
- (29) SCHEMAN, A.; CHA, C.; BHINDER, M. Alternative hair dye products for persons allergic to para-phenylenediamine. **Dermatitis**, v. 22, n. 4, p. 189-192, 2011.
- (30) BURNETT, C. L.; BERGFELD, W. F.; BELSITO, D. V.; KLAASSEN, C. D.; MARKS, J. G.; SHANK, R. C.; SLAGA, T. J.; SNYDER, P. W.; ANDERSSSEN, F. A. Final amended report of the safety assessment of toluene-2,5-diamine, toluene-2,5-diamine sulfate, and toluene-3,4-diamine as used in cosmetics. **International Journal of Toxicology**, v. 29, p. 61-83, 2010.
- (31) YABE, K.; SAITO, K.; MURAI, T.; HARA, M. A.; WATANABE, H. An experimental rhabdomyolysis due to para-phenylenediamine contained in hair dyes. *Research and Practice of Forensic Medicine*, v. 34, p. 109–115, 1991.
- (32) YAGI, H.; EL HENDI, A.M.; DIAB, A.; ELSHIKH, A. A. Paraphenylenediamine induced optic atrophy following hair dye poisoning. **Human and Experimental Toxicology**, v. 15, p. 617–618, 1996.
- (33) NOHYNEK, G. J.; DUCHE, D.; GARRIGUES, A.; MEUNIER, P. A.; TOUTAIN, H.; LECLAIRE, J. Under the skin: biotransformation of para-aminophenol and para-phenylenediamine in reconstructed human epidermis and human hepatocytes. **Toxicology Letters**, v. 158, n. 3, p. 196-212, 2005.
- (34) RAND, G. M. **Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment**. 2nd ed. New York: Taylor & Francis, 1995.

- (35) CHEN, Y. H.; LIU, Y. Y.; LIN, R. H.; YEN, F. S. Photocatalytic degradation of p-phenylenediamine with TiO₂-coated magnetic PMMA microspheres in an aqueous solution. **Journal of Hazardous Materials**, v. 163, p. 973–981, 2009.
- (36) COULTER, E. M.; MATHEWS, K. L.; MAGGS, J. L.; PEASE, C. K.; LOCKLEY, D. J.; BASKETTER, D. A.; PARK, B. K.; NAISBITT, D. J. Activation of human dendritic cells by p-phenylenediamine. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 320, p. 885–892, 2007.
- (37) HUEBER-BECKER, F.; NOHYNEK, G. J.; MEULING, W. J. A.; BENECHKIEFFER, F.; TOUTAIN, H. Human systemic exposure after hair dyeing with a [14C]-para-phenylenediamine-containing oxidative hair dye and correlation with in vitro percutaneous absorption in human and pig skin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 1227-1236, 2004.
- (38) GOETZ, N.; LASERRE, P.; BORÉ, P.; KALOPISSIS, G. Percutaneous absorption of p-phenylenediamine during an actual hair dyeing procedure. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 10, n. 2, p. 63–73, 1988.
- (39) DRESSLER, W. Hair dye absorption. In: BRONOUGH, R. L.; MAIBACH, H. I. (Eds.). **Percutaneous absorption of drugs and the pharmaceutical sciences**. New York: Marcel Dekker, 1999, p. 685–716.
- (40) KAWAKUBO, Y.; YAMAZOE, Y.; KATO, R.; NISHIKAWA, T. High capacity of human skin for N-acetylation of arylamines. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 3, p. 180–185, 1990.
- (41) KIRKLAND, D. J.; HENDERSON, L.; MARZIN, D.; MÜLLER, L.; PARRY, J. M.; SPEIT, G.; TWEATS, D. J.; WILLIAMS, G. M. Testing strategies in mutagenicity and genetic toxicology: an appraisal of the guidelines of the European Scientific Committee for Cosmetics and Non-Food Products for the evaluation of hair dyes. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 588, n. 2, p. 88-105, 2005.

- (42) WATANABE, T.; HIRAYAMA, T.; FUKUI, S. Mutagenicity of commercial hair dyes and detection of 2,7-diaminophenazine. **Mutation Research**, v. 244, p. 303-308, 1990.
- (43) BESSEGATO, G. G.; SOUZA, J. C.; CARDOSO, J. C.; ZANONI, M. V. B. Assessment of several advanced oxidation processes applied in the treatment of environmental concern constituents from a real hair dye wastewater. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 6, n. 1, p. 2794-2802, 2018.
- (44) SOUZA, J. C.; SILVA, B. F.; MORALES, D. A.; UMBUZEIRO, G. A.; ZANONI, M. V. B. Assessment of the autoxidation mechanism of p-toluenediamine by air and hydrogen peroxide and determination of mutagenic environmental contaminant in beauty salon effluent. **Science of The Total Environment**, v. 685, p. 911-922, 2019.
- (45) SOUZA, J. C.; SILVA, B. F.; MORALES, D. A.; UMBUZEIRO, G. A.; ZANONI, M. V. B. Assessment of p-aminophenol oxidation by simulating the process of hair dyeing and occurrence in hair salon wastewater and drinking water from treatment plant. **Journal of Hazardous Materials**, v. 387, 122000, 2020.
- (46) ROBBINS, C. R. **Chemical and physical behavior of human hair**. 2nd ed. New York: Springer Science and Business Media, 1988.
- (47) Aula de anatomia.com. **Sistema tegumentar**. <<https://www.auladeanatomia.com/novosite/sistemas/sistema-tegumentar>>. Acesso em: 03 jan. 2020.
- (48) Tricologia. **As características dos cabelos**. <https://www.tricologia.com.br/sobre_cabelos_2.asp>. Acesso em: 03 jan. 2020.
- (49) Cabelos e sonhos. **Quais as fases de crescimento do cabelo**. <<https://www.cabelosesonhos.com/2015/03/quais-as-fases-de-crescimento-do-cabelo.html>>. Acesso em: 17 dez. 2019.
- (50) De química no cabelo. **Porque existem diferentes tipos de cabelo?** <<https://dequimicanocabelo.blogspot.com/p/blog-page.html>>. Acesso em: 03 jan. 2020.

- (51) RIGG, B. **Colorimetry and the CIE system**. In: MCDONALD, R. (Ed.). *Colour physics for industry*, 2nd ed. Bradford: Society of Dyers and Colourists, 1997. Chap. 3, p. 81-119.
- (52) LANG, J. M.; LUCAS, C. C. The analysis of hair keratin: 1. Application of microbiological techniques to hydrolysates of human hair. **Biochemical Journal**, v. 52, n. 1, p. 84-87, 1952.
- (53) SOUZA, J. C.; MACHINI, W. B. S.; ZANONI, M. V. B.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. of Human hair keratin direct electrochemistry and in situ interaction with *p*-toluenediamine and *p*-aminophenol hair dye precursors using a keratin electrochemical biosensor. **ChemElectroChem**, v. 7, p. 1277-1285, 2020.
- (54) MACHINI, W. B. S.; MARQUES, N. V.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Nivolumab anticancer monoclonal antibody native and denatured direct electrochemistry at a glassy carbon electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 851, 113251, 2019.
- (55) CHIORCEA-PAQUIM, A. M.; ENACHE, T. A.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Electrochemistry of alzheimer disease amyloid beta peptides. **Current Medicinal Chemistry**, v. 25, p. 4066-4083, 2018.
- (56) ENACHE, T. A.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Boron doped diamond and glassy carbon electrodes comparative study of the oxidation behaviour of cysteine and methionine. **Bioelectrochemistry**, v. 81, p. 46-52, 2011.
- (57) REYNAUD, J. A.; MALFOY, B.; Canesson, P. Electrochemical investigations of amino acids at solid electrodes: Part I. Sulfur components: cystine, cysteine, methionine. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, v. 114, p. 195-211, 1980.
- (58) ENACHE, T. A., OLIVEIRA-BRETT, A. M. Phenol and para-substituted phenols electrochemical oxidation pathways. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 655, p. 9-16, 2011.
- (59) MALFOY, B.; REYNAUD, J. A. Electrochemical investigations of amino acids at solid electrodes: Part II. Amino acids containing no sulfur atoms: tryptophan, tyrosine, histidine and derivatives. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, v. 114, p. 213-223, 1980.

- (60) CAI, X.; RIVAS, G.; FARIAS, P. A. M.; SHIRAISHI, H.; WANG, J.; PALEČEK, E. Potentiometric stripping analysis of bioactive peptides at carbon electrodes down to subnanomolar concentrations, **Analytica Chimica Acta**, v. 332, p. 49-57, 1996.
- (61) DICULESCU, V. C.; ENACHE, T. A. Electrochemical evaluation of Abelson tyrosine-protein kinase 1 activity and inhibition by imatinib mesylate and danusertib. **Analytica Chimica Acta**, v. 845, p. 23-29, 2014.
- (62) ENACHE, T. A.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Peptide methionine sulfoxide reductase A (MsrA): direct electrochemical oxidation on carbon electrodes. **Bioelectrochemistry**, v. 89, p. 11-18, 2013.
- (63) ENACHE, T. A.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Pathways of electrochemical oxidation of indolic compounds. **Electroanalysis**, v. 23, p. 1337-1344, 2011.
- (64) FCIências. Queratina – **Molécula da semana**. Disponível em: <<https://www.fcencias.com/2014/07/31/queratina-molecula-da-semana/>>. Acesso em: 03 jan. 2020.
- (66) SOUZA, J. C.; ZANONI, M. V. B.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Genotoxic permanent hair dye precursors p-aminophenol and p-toluenediamine electrochemical oxidation mechanisms and evaluation in biological fluids. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 857, 113509, 2020.
- (67) TRÜEB, R. M. Dermocosmetic aspects of hair and scalp. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 10, p. 289-292, 2005.
- (68) CORBETT, J. F. Hair coloring. **Clinics in Dermatology**, v. 6, n. 3, p. 93-101, 1988.
- (69) A Química da Beleza. **Cosméticos**. <<https://www.quimicadabeleza.com/a-arte-de-colorir-os-cabelos/>>. Acesso em: 22 jan. 2020.
- (70) GUARATINI, C. C. I.; ZANONI, M. V. B. Corantes têxteis. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 71-78, 2000.
- (71) DRAELOS, Z. D. **Hair care: an illustrated dermatologic**. 1st ed. London: Taylor & Francis, 2005.

- (72) FRANÇA, S. A.; DARIO, M. F.; ESTEVES, V. B.; BABY, A. R.; VELASCO, M. V. R. Types of hair dye and their mechanisms of action. **Cosmetics**, v. 2, p. 110-126, 2015.
- (73) KAWAKUBO, Y.; MERK, H. F.; AL MASAUDI, T.; SIEBEN, S.; BLOEMEKE, B. N-acetylation of paraphenylenediamine in human skin and keratinocytes. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 292, p. 150-155, 2000.
- (74) HOOFF, G. P.; VAN HUIZEN, N. A.; MEESTERS, R. J. W.; ZIJLSTRA, E. E.; ABDELRAHEEM, M.; ABDELRAHEEM, W.; HAMDOK, M.; LINDEMANS, J.; LUIDER, T. M. Analytical investigations of toxic p-phenylenediamine (PPD) levels in clinical urine samples with special focus on MALDI-MS/MS. **PLoS One**, v. 6, p. 1-8, 2011.
- (75) KIESE, M.; RAUSCHER, E. The absorption of p-toluenediamine through human skin in hair dyeing. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 13, p. 325-331, 1968.
- (76) BEIGINEJAD, H.; NEMATOLLAHI, D.; VARMAGHANI, F. Electrochemical oxidation of some aminophenols in various pHs. **Journal of the Electrochemical Society**, v. 160, p. 41-46, 2013.
- (77) WANG, L-H.; TSAI, S-J. Simultaneous determination of oxidative hair dye p-phenylenediamine and its metabolites in human and rabbit biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 312, p. 201-207, 2003
- (78) NOHYNEK, G. J.; ANTIGNAC, E.; RE, T.; TOUTAIN, H. Safety assessment of personal care products/cosmetics and their ingredients. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 243, n. 2, p. 239-259, 2010.
- (79) SEO, J. A.; BAE, I. H.; JANG, W. H.; KIM, J. H.; BAK, S.Y.; HAN, S. H.; PARK, Y. H.; LIM, K. M. Hydrogen peroxide and monoethanolamine are the key causative ingredients for hair dye-induced dermatitis and hair loss. **Journal of Dermatological Science**, v. 66, n. 1, p. 12-19, 2012.
- (80) JOSEPHY, P. D.; ELING, T. E., MASON, R. P. Oxidation of p-aminophenol catalyzed by horseradish peroxidase and prostaglandin synthase. **Molecular Pharmacology**, v. 23, p. 461-466, 1983.

- (81) KLOS C.; KOOB, M.; KRAMER, C.; DEKANT, W. P-Aminophenol nephrotoxicity: biosynthesis of toxic glutathione conjugates. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 115, p. 98-106, 1992.
- (82) CROWE, C. A.; YONG, A. C.; CALDER, I. C.; HAM, K. N.; TANGE, J. D. The nephrotoxicity of p-aminophenol: I. The effect on microsomal cytochromes, glutathione, and covalent binding in kidney and liver. **Chemical-Biological Interactions**, v. 27, p. 235-243, 1979.
- (83) NASCIMENTO, T. S.; PEREIRA, R. O. L.; MELLO, H. L. D.; COSTA, J. Metemoglobinemia: do diagnóstico ao tratamento. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 58, n. 6, p. 651-664, 2008.
- (84) CARVALHO, C.; RIBEIRO, N.; ALVES, C. L.; GOMES, H.; SARMENTO, A. Metemoglobinemia: revisão a propósito de um caso. **Arquivos de Medicina**, v. 25, n. 3, p. 100-106, 2011.
- (85) WOLFRAM, L. J.; MAIBACH, H. I. Percutaneous penetration of hair dyes. **Archives of Dermatological Research**, v. 277, p. 235-241, 1985.
- (86) LYNCH, B. S.; DELZELL, E. S.; BECHTEL, D. H. Toxicology review and risk assessment of resorcinol: thyroid effects. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 36, n. 2, p. 198-210, 2002.
- (87) GRANT, W. M. **Toxicology of the eye**. 3rd ed. Springfield: Charles C. Thomas Publisher, 1986.
- (88) KRASTEVA, M.; BONS, B.; TOZER, S.; RICH, K.; HOTING, E.; HOLLENBERG, D.; FUCHS, A.; FAUTZ, R. Contact allergy to hair colouring products. The cosmetovigilance experience of four companies (2003-2006). **European Journal of Dermatology**, v. 20, n. 1, p. 1-11, 2010.
- (89) REDLICK, F.; DEKOVEN, J. Allergic contact dermatitis to parapàhenylenediamine in hair dye after sensitization from black henna tattoos: a report of 6 cases. **Canadian Medical Association Journal**, v. 176, n. 4, p. 445-446, 2007.

- (90) DELEO, V. P-phenylenediamine. **Dermatitis**, v. 17, n. 2, p. 53–55, 2006.
- (91) R7. **Adolescente quase fica cega após passar tintura nas sobrancelhas**. <<https://recordtv.r7.com/hoje-em-dia/videos/adolescente-quase-fica-cega-apos-passar-tintura-nas-sobrancelhas-14102018>>. Acesso em: 24 jan. 2020.
- (92) BRANCACCIO, R. R.; BROWN, L. H.; CHANG, Y. T.; FOGELMAN, J. P.; MAFONG, E. A.; COHEN, D. E. Identification and quantification of para-phenylenediamine in a temporary black henna tattoo. **American Journal of Contact Dermatitis**, v. 13, n. 1, p. 15-18, 2002.
- (93) YAHOO. **Reação à tatuagem de henna destrói braço de criança**. <<https://br.noticias.yahoo.com/reacao-tatuagem-de-henna-destroi-braco-de-crianca-073859783.html>>. Acesso em: 24 jan. 2020.
- (94) AEBY, P.; SIEBER, T.; BECK, H.; GERBERICK, G. F.; GOEBEL, C. Skin sensitization to p-phenylenediamine: the diverging roles of oxidation and N-acetylation for dendritic cell activation and the immune response. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 129, n. 1, p. 99-109, 2009.
- (95) WHITE, J. M. L.; BASKETTER, D. A.; PEASE, C. K.; SANDERS, D. A.; MCFADDEN, J. P. Intermittent exposure to low-concentration paraphenylenediamine can be equivalent to single, higher-dose expose. **Contact Dermatitis**, v. 56, n. 5, p. 262–265, 2007.
- (96) BAAN, R.; STRAIF, K.; GROSSE, Y.; SECRETAN, B.; EL GHISSASSI, F.; BOUVARD, V.; BENBRAHIM-TALLAA, L.; COGLIANO, V. Carcinogenicity of some aromatic amines, organic dyes and related exposures. **The Lancet Oncology**, v. 9, p. 322–323, 2008.
- (97) INTERNATIONAL AGENCY FOR THE RESEARCH OF CANCER. **Occupational exposure of hairdressers and barbers and personal use of hair colorants: some hair dyes, cosmetic colorants, industrial dyestuffs and aromatic amines**. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Volume 57. Geneva: World Health Organisation, 1993.

- (98) AMES, B. N.; KAMMEN, H. O.; YAMASAKI, E. Hair dyes are mutagenic: identification of a variety of mutagenic ingredients. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 72, n. 6, p. 2423-2427, 1975.
- (99) RAUSCHER, G. H.; SHORE, D.; SANDLER, D. P. Hair dye and risk of adult acute leucemia. **American Journal of Epidemiology**, v. 160, n. 1, p. 19-25, 2004.
- (100) CZENE, K.; TIIKKAJA, S.; HEMMINKI, K. Cancer risks in hairdressers: assessment of carcinogenicity of hair dyes and gels. **International Journal of Cancer**, v. 105, n. 1, p. 108-112, 2003.
- (101) ZAHM, S. H.; WEISENBURGER, D. D.; BABBITT, P. A.; SAAL, R. C.; VAUGHT, J. B.; BLAIR, A. Use of hair coloring products and the risk of lymphoma, multiple myeloma, and chronic lymphocytic leukemia. **American Journal of Public Health**, v. 82, n. 7, p. 990-997, 1992.
- (102) GAGO-DOMINGUEZ, M.; CASTELAO, J. E.; YUAN, J. M.; YU, M. C.; ROSS, R.K. Use of permanent hair dyes and bladder cancer risk. **International Journal of Cancer**, v. 91, p. 575-579, 2001.
- (103) GAGO-DOMINGUEZ, M.; BELL, D. A.; WATSON, M. A.; JIAN-MIN, Y.; CASTELAO, J. E.; HEIN, D. W.; CHAN, K. K.; COETZEE, G. A.; ROSS, R. K.; YU, M. C. Permanent hair dyes and bladder cancer: risk modification by cytochrome P450A2 and N-Acetyltransferase 1 and 2. **Carcinogenesis**, v. 24, n. 3, p. 483-489, 2003.
- (104) GOLKA, K., PRIOR, V., BLASZKEWICZ, M., BOLT, H. M. The enhanced bladder cancer susceptibility of NATY2 slow acetylators towards aromatic amines: a review considering ethnic differences. **Toxicology Letters**, v. 128, p. 229-241, 2002.
- (105) RYLANDER, L.; AXMON, A.; TOREN, K.; ALBIN, M. Reproductive outcome among female hairdressers. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**, v. 59, p. 517-522, 2002.
- (106) HERDT-LOSAVIO, M. L.; LIN, S.; DRUSCHEL, C. M.; HWANG, S. A.; MAUER, M. P.; CARLSON, G.A. The risk of having a low birth weight or preterm infant among

cosmetologists in New York State. **Maternal and Child Health Journal**, v. 13, p. 90–97, 2009.

(107) HALLIDAY-BELL, J.; GISSLER, M.; JAAKOLA, J. K. Work as hairdresser and cosmetologist and adverse pregnancy outcomes. **Occupational Medicine**, v. 59, p. 180–184, 2009.

(108) AXMON, A, RYLANDER, L. Birth weight and fetal growth in infants born to female hairdressers and their sisters. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**, v. 66, n. 3, p. 198–204. 2009.

(109) GALLICCHIO, L.; MILLER, S.; GREENE, T.; ZACUR, H.; FLAWS, J. A. Cosmetologists and reproductive outcomes. **Obstetrics and Gynecology**, v. 113, n. 5, p. 1018–1025, 2009.

(110) GOULET, L.; THÉRIAULT, G. Stillbirth and chemical exposure of pregnant workers. **Scandinavian Journal of Work, Environment and Health**, v. 17, p. 25–31, 1991.

(111) KERSEMAEKERS, W.; ROELEVELD, N.; ZIELHUS, G. Reproductive disorders due to chemical exposure among hairdressers. **Scandinavian Journal of Work, Environment and Health**, v. 21, p. 325–334, 1995.

(112) KERSEMAEKERS, W.; ROELEVELD, N.; ZIELHUS, G. Reproductive disorders among hairdressers. **Epidemiology**, v. 8, n. 4, p. 396–401, 1997.

(113) MCDONALD, A. D.; MCDONALD, J. M. C.; ARMSTRONG, B.; CHERRY, N. M.; NOLIN, A. D.; ROBER, D. Prematurity and work in pregnancy. **British Journal of Industrial Medicine**, v. 45, p. 56–62, 1988.

(114) ZHENG, T.; HOLFORD, T. R.; MAYNE, S. T.; OWENS, P. H.; BOYLE, P.; ZHANG, B.; ZHANG, Y. W.; ZAHM, S. H. Use of hair colouring products and breast cancer risk: a case-control study in Connecticut. **European Journal of Cancer**, v. 38, n. 12, p. 1647–1652, 2002.

- (115) COOK, L. S.; MALONE, K. E.; DALING, J. R.; VOIGT, L. F.; WEISS, N. S. Hair product use and the risk of breast cancer in young women. **Cancer Causes and Control**, v. 10, n. 6, p. 551-559, 1999.
- (116) NAGATA, C.; SHIMIZU, H.; HIRASHIMA, K.; KAKISHITA, E.; FUJIMURA, K.; NIHO, Y.; KARASAWA, M.; OGUMA, S.; YOSHIDA, Y.; MIZOGUCHI, H. Hair dye use and occupational exposure to organic solvents as risk factors for myelodysplastic syndrome. **Leukemia Research**, v. 23, n. 1, p. 57-62, 1999.
- (117) Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_79_2000_COMP.pdf/e7cc09b7-6804-432c-9b92-b655972e886a>. Acesso em: 28/01/2020.
- (118) MAGUIRE, R. J. Occurrence and persistence of dyes in a canadian river. **Water Science and Technology**, v. 25, n. 11, p. 265–270, 1992.
- (119) OHE, T., TAKEUCHI, N., WATANABE, T., TADA, A., NUKAYA, H., TERAQ, Y., SAWANISHI, H., HIRAYAMA, T., SUGIMURA, T., WAKABAYASHI, K. Quantification of two aromatic amine mutagens, PBTA-1 and PBTA-2, in the yodo river system. **Environmental Health Perspectives**, v. 107, p. 701–704, 1999.
- (120) OLIVEIRA, D. P.; CARNEIRO, P. A.; SAKAGAMI, M. K.; ZANONI, M. V. B.; UMBUZEIRO, G. A. Chemical characterization of a dye processing plant effluent - identification of the mutagenic components. **Mutation Research**, v. 626, p. 135–142, 2007.
- (121) UMBUZEIRO, G. A.; FREEMAN, H. S.; WARREN, S. H.; OLIVEIRA, D. P.; TERAQ, Y.; WATANABE, T.; CLAXTON, L. D. The contribution of azo dyes to the mutagenic activity of the Cristais River. **Chemosphere**, v. 60, p. 55–64, 2005.
- (122) VACCHI, F. I.; VENDEMIATTI, J. A. S.; BROSELIN, V.; SILVA, B. F.; ZANONI, M. V. B.; DEMEO, M.; BONY, S.; DEVAUX, A.; UMBUZEIRO, G. A. Combining different assays and chemical analysis to characterize the genotoxicity of waters impacted by textile discharges. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 57, p. 559-571, 2016.
- (123) VACCHI, F. I.; VENDEMIATTI, J. A. S.; SILVA, B. F.; ZANONI, M. V. B.; UMBUZEIRO, G. A. Quantifying the contribution of dyes to the mutagenicity of waters

under the influence of textile activities. **Science of the Total Environment**, v. 601-602, p. 230-236, 2017.

(124) ZOCCOLO, G. J.; SANTOS, G. P.; VENDEMIATTI, J.; VACCHI, F. I.; UMBUZEIRO, G. A.; ZANONI, M. V. B. Using SPE-LC-ESI-MS/MS analysis to assess disperse dyes in environmental water samples. **Journal of Chromatographic Science**, v. 53, p. 1257–1264, 2015.

(125) CARNEIRO, P. A.; UMBUZEIRO, G. A.; OLIVEIRA, D. P.; ZANONI, M. V. B. Assessment of water contamination caused by a mutagenic textile effluent/dye house effluent bearing disperse dyes. **Journal of Hazardous Materials**, v. 174, p. 694-699, 2010.

(126) SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. I. **Practical HPLC method development**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 1997.

(127) SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. I. **Introduction to modern liquid chromatography**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 1979.

(128) SILVA, B. F.; SOUZA, J.C.; ZANONI, M. V. B. Cromatografia aplicada na análise de corantes. In: YAMANAKA, H.; ZANONI, M.V.B. (Eds.). **Corantes: caracterização química, toxicológica, métodos de detecção e tratamento**. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2016. Cap. 11, p. 179–197.

(129) NARITA, M.; MURAKAMI, K.; KAUFFMANN, J-M. Determination of dye precursors in hair coloring products by liquid chromatography with electrochemical detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 588, p. 316-320, 2007.

(130) RASTOGI, S. C. A method for the analysis of intermediates of oxidative hair dyes in cosmetic products. **Journal of Separation Science**, v. 24, p. 173-178, 2001.

(131) MOHAMED, K. M.; CROMARTY, D.; STEENKAMP, V. Development and validation of na LC-MS/MS method for determination of *p*-phenylenediamine and its metabolites in blood samples. **Journal of Chromatography B**, v. 997, p. 1-6, 2015.

- (132) YIN, H.; MA, Q.; ZHOU, Y.; AI, S.; ZHU, L. Electrochemical behavior and voltammetric determination of 4-aminophenol based on graphene–chitosan composite film modified glassy carbon electrode. **Electrochimica Acta**, v. 55, p. 7102-7108, 2010.
- (133) PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. D. S.; KUBOTA, L. T. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalítica. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 1012-1021, 2002.
- (134) BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods: fundamentals and applications**. 2nd ed. New York: John Wiley, 2001.
- (135) KUMARAVEL, A.; CHANDRASEKARAN, M. A biocompatible nano TiO₂/nafion composite modified glassy carbon electrode for the detection of fenitrothion. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 650, p. 163-170, 2011.
- (136) AKYUZ, M.; ATA, S. Determination of aromatic amines in hair dye and henna samples by ion-pair extraction and gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 47, p. 68–80, 2008.
- (137) TANADA, N.; KAGEURA, M.; HARA, K.; HIEDA, Y.; TAKAMOTO, M.; KASHIMURA, S. Identification of human hair stained with oxidation hair dyes by gas chromatographic-mass spectrometric analysis. **Forensic Science International**, v. 52, p. 5-11, 1991.
- (138) CHOWDHARY, G. Gas liquid chromatographic determination of toxic diamines in permanent hair dyes. **Journal of Chromatography A**, v. 193, p. 277-284, 1980.
- (139) CHU, Q.; JIANG, L.; XIUHUI, T.; JIANNONG, Y. Rapid determination of acetaminophen and *p*-aminophenol in pharmaceutical formulations using miniaturized capillary electrophoresis with amperometric detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 606, p. 246-251, 2008.
- (140) ZATAR, N. A.; ABU-ZUHRI, A. Z.; ABU-SHAWEESH, A. A. Spectrophotometric determination of some aromatic amines. **Talanta**, v. 47, p. 883–890, 1998.

- (141) ZWARG, J. R. R. M.; MORALES, D. A.; MASELLI, B. S.; BRACK, W.; UMBUZEIRO, G. A. Miniaturization of the microsuspension Salmonella/microsome assay in agar microplates. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 59, p. 488-501, 2018.
- (142) HAGIWARA, Y.; WATANABE, M.; ODA, Y.; SOFUNI, T.; NOHMI, T. Specificity and sensitivity of *Salmonella typhimurium* YG1041 and YG1042 strains possessing elevated levels of both nitroreductase and acetyltransferase activity. **Mutation Research**, v. 291, p. 171-180, 1993.
- (143) MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research**, v. 455, p. 29-60, 2000.
- (144) BERNSTEIN, L.; KALDOR, J.; MCCANN, J.; PIKE, M. C. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the Salmonella test. **Mutation Research**, v. 97, p. 267-281, 1982.
- (145) ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Test No. 202: Daphnia sp. acute immobilisation test**. OECD guidelines for the testing of chemicals, section 2. Paris: OECD Publishing, 2004.
- (146) AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 20th ed. Washington, DC: American Water Works Association and Water Environmental Federation, 1998.
- (147) UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Manual for the certification of laboratories analyzing drinking water: criteria and procedures quality assurance**. 50th ed. Cincinnati: United States Environmental Protection Agency, 2005.
- (148) HUDARI, F. F.; SOUZA, J. C.; ZANONI, M. V. B. Adsorptive stripping voltammetry for simultaneous determination of hydrochlorothiazide and triamterene in hemodialysis samples using a multi-walled carbon nanotube-modified glassy carbon electrode. **Talanta**, v. 179, p. 652-657, 2018.
- (149) WESTERMEIER, R.; NAVEN, T.; HÖPKER, H. R. **Proteomics in practice: a guide to successful experimental design**. Berlin: Wiley-Blackwell, 2008.

- (150) REHANA, D.; HALEEL, A.; RAHIMAN, A. K. Hydroxy, carboxylic and amino acid functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, characterization and in vitro anti-cancer studies. **Journal of Chemical Sciences**, v. 127, n. 7, p. 115-1166, 2015.
- (151) PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**, 4^o ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.
- (152) GOUX, A.; PRATT, D.; DUNSCH, L. The reaction mechanism of *p*-toluenediamine anodic oxidation: an in situ ESR-UV/Vis/NIR spectroelectrochemical study. **ChemPhysChem**, v. 8, p. 2101-2106, 2007.
- (153) SONG, Y. Theoretical studies on electrochemistry of *p*-aminophenol. **Spectrochimica Acta A**, v. 671, p. 611–618, 2007.
- (154) SNEAD, W. K.; REMICK, A. E. Studies on oxidation-reduction mechanism. II. The anodic oxidation of *p*-aminophenol. **Journal of American Chemical Society**, v. 79, p. 6121-6127, 1957.
- (155) HERAS, A. M.; AVILA, J. L.; RUIZ, J. J.; GARCÍA-BLANCO, F. A contribution to the study of the electrochemical oxidation of *p*-aminophenol on a mercury electrode. **Electrochimica Acta**, v. 29, p. 541-545, 1984.
- (156) CLAXTON, L. D. The integration of bioassay and physiochemical information for complex mixtures. In: WATERS, M. D.; SANDHU, S. S.; LEWTAS, J.; CLAXTON L. D.; CHERNOFF N.; NESNOW, S. (Eds.). **Short-term bioassays in the analysis of complex environmental mixtures III**. Boston: Springer, 1983, Chap. 1, p. 153–162.
- (157) MCCANN, J. CHOI, E.; YAMASAKI, E.; AMES, B. N. Detection of carcinogen as mutagen in the Samonella/microsome test: assay of 300 chemicals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 72, p. 5135-5139, 1975.
- (158) MCCANN, J.; SPINGARN, N. E.; KOBORI, J.; AMES, B. N. Detection of carcinogen as mutagens: bacterial tester strains with R factor plasmids. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 72, p. 979-983, 1975.

- (159) GARNER, R. C.; NUTMAN, C. A. Testing of some azo dyes and their reduction products for mutagenicity using *Salmonella Typhimurium* TA 1538. **Mutation Research**, v. 44, p. 9-19, 1977.
- (160) MILLER, J. A. Carcinogenesis by chemicals; an overview – G. H. A. clowes memorial lecture. **Cancer Research**, v. 30, p. 559-576, 1970.
- (161) BENEDICT, W. F. Morphological transformation and chromosome aberrations produced by two hair-dye components. **Nature**, v. 260, p. 368-369, 1976.
- (162) KIRKLAND, D. J.; VENITT, S. Cytotoxicity of hair colourant constituents: chromosome damage induced by two nitrophenylene-diamines in cultured Chinese hamster cells. **Mutation Research**, v. 40, p. 47-56, 1976.
- (163) SEARLE, C. E.; HARDEN, D. G.; VENITT S.; GYDE, O. H. B. Carcinogenicity and mutagenicity tests of some hair colourants and constituents. **Nature**, v. 255, p. 506-507, 1975.
- (164) AMES, B. N. The detection of chemical mutagens with enteric bacteria. In: HOLLAENDER, A. (Ed.). **Chemical mutagens: principles and methods for their detection**. New York: Plenum Press, 1971, Chap. 9, p. 267-282.
- (165) AMES, B. N.; LEE, F. D.; DURSTON, W. E. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 70, n. 3, p. 782-786, 1973.
- (166) AMES, B. N.; DURSTON, W. E.; YAMASAKI, E.; LEE, F. D. Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 70, n. 8, p. 2281-2285, 1973.
- (167) KADO, N. Y.; LANGLEY, D.; EISENSTADT, E. A simple modification of the *Salmonella* liquid-incubation assay. Increased sensitivity for detecting mutagens in human urine. **Mutation Research**, v. 121, n. 1, p. 25-32, 1983.
- (168) ZAGATTO, A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática - princípios e aplicações**. São Carlos: Editora Rima, 2006.

- (169) RUPPERT, E. E.; BARNES, R. D. **Zoologia dos invertebrados**. São Paulo: Roca Ltda, 1996.
- (170) MAZZO, T. M.; SACZK, A. A.; UMBUZEIRO, G. A.; ZANONI, M. V. B. Analysis of aromatic amines in surface waters receiving wastewater from a textile industry by liquid chromatographic with electrochemical detection. **Analytical Letters**, v. 39, p. 2671-2685, 2006.
- (171) BRETT, C. M. A.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. **Electrochemistry: principles, methods, and applications**. Oxford: Oxford University Press, 1993.
- (172) MACHINI, W. B. S.; ENACHE, T. A.; JORGE, S. M. A.; OLIVEIRA-BRETT A. M. Isotretinoin oxidation and electroanalysis in a pharmaceutical drug using a boron-doped diamond electrode. **Electroanalysis**, v. 28, p. 2709-2712, 2016.
- (173) DICULESCU, V. C.; ENACHE, T. A. Voltammetric and mass spectrometry investigation of methionine oxidation. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 834, p. 124-129, 2019.
- (174) FEUGHELMAN, M. The physical properties of alpha-keratin fibers. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, v. 33, p. 385-406, 1982.
- (175) FEUGHELMAN, M. **Mechanical properties and structure of alpha-keratin fibres: wool, human hair and related fibres**. Sydney: UNSW Press, 1997.
- (176) KYTE, J.; DOOLITTLE, R. F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. **Journal of molecular biology**, v. 157, p. 105-132, 1982.
- (177) NEMOTO, E. M.; YONAS, H.; KUWABARA, H.; PINDZOLA, R.; SASHIN, D.; CHANG, Y.; JOVIN, T.; GEBEL, J.; HAMMER, M. D.; WECHSLER, L. Differentiating hemodynamic compromise by the OEF response to acetazolamide in occlusive vascular disease. **Oxygen Transport to Tissue Xxvi**, v. 566 135-141, 2005.
- (178) ISSAAD, F. Z; TOMÉ, L. I. N.; MARQUES, N. V.; MOUATS, C.; DICULESCU, V. C.; OLIVEIRA-BRETT, A. M.. Bevacizumab anticancer monoclonal antibody: native and denatured redox behaviour. **Electrochimica Acta**, v. 206, p. 246-253, 2016.

- (179) OLIVEIRA, S. C. B.; MACHINIRINO, I. B.; OLIVEIRA-BRETT, A. M.. Direct electrochemistry of native and denatured anticancer antibody rituximab at a glassy carbon electrode. **Electroanalysis**, v. 25, p. 1029-1034, 2013.
- (180) FERNANDES, I. P.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Calcium-induced calmodulin conformational change: electrochemical evaluation. **Bioelectrochemistry**, v. 113, p. 69-78, 2017.
- (181) SANTARINO, I. B.; OLIVEIRA, S. C. B.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Protein reducing agents dithiothreitol and tris(2-carboxyethyl)phosphine anodic oxidation. **Electrochemistry Communications**, v. 23, p. 114-117, 2012.
- (182) K'OWINO, I. O.; SADIK, O. A. Impedance spectroscopy: a powerful tool for rapid biomolecular screening and cell culture monitoring. **Electroanalysis**, v. 17, p. 2101-2113, 2005.
- (183) BROSEL-OLIU, S.; ABRAMOVA, N.; URIA, N.; BRATOV, A. Impedimetric transducers based on interdigitated electrode arrays for bacterial detection - a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 1088, p. 1-19, 2019.
- (184) MACHINI, W. B. S.; MARQUES, N. V.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. In situ evaluation of anticancer monoclonal antibody nivolumab-DNA interaction using a DNA-electrochemical biosensor. **ChemElectroChem**, v. 6, p. 4608-4616, 2019.
- (185) RANDVIIR, E. P.; BANKS, C. E. Electrochemical impedance spectroscopy: an overview of bioanalytical applications. **Analytical Methods**, v. 5, p. 1098-1115, 2013.
- (186) ORAZEM, M. E.; TRIBOLLET, B. **Electrochemical impedance spectroscopy**. New Jersey: John Wiley and Sons, 2008.
- (187) KIM, D. K.; ZHANG, Y.; VOIT, W.; RAO, K. V.; MUHAMMED, M. Synthesis and characterization of surfactant-coated superparamagnetic monodispersed iron oxide nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 222, n. 1-2, p. 30-36, 2001.

(188) FENG, L.; CAO, M.; ZHU, Y.; HU, C. Superparamagnetic high-surface-area Fe_3O_4 nanoparticles as adsorbents for arsenic removal. **Journal of Hazardous Materials**, v. 217-218, n. 30, p. 439-446, 2012.

(189) KARAOGLU, E.; BAYKAL, A.; SENEL, M.; SOZERI, H.; TOPRAK, M. S. Synthesis and characterization of piperidine-4-carboxylic acid functionalized Fe_3O_4 nanoparticles as a magnetic catalyst for Knoevenagel reaction. **Materials Research Bulletin**, v. 47, n. 9, p. 2480-2486, 2012.

Apêndice

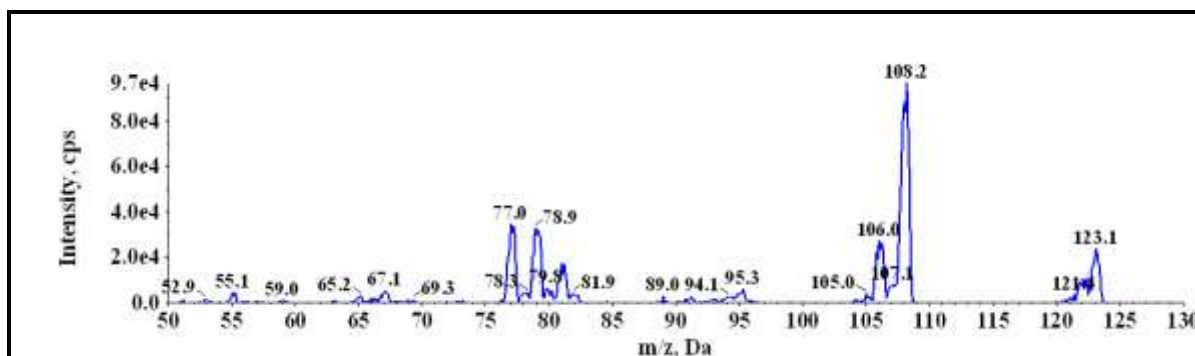


Figura 1AP. Espectro de íons fragmentos de m/z 123,1.

Fonte: Autor.

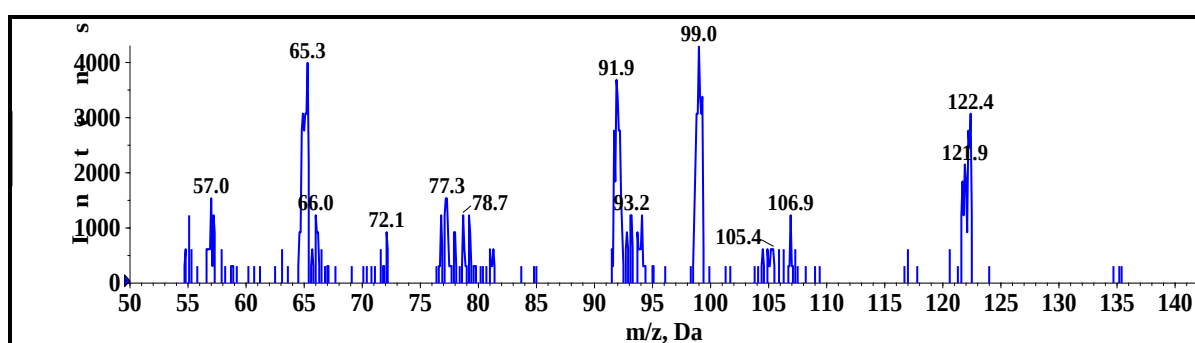


Figura 2AP. Espectro de íons fragmentos de m/z 122,4.

Fonte: Autor.

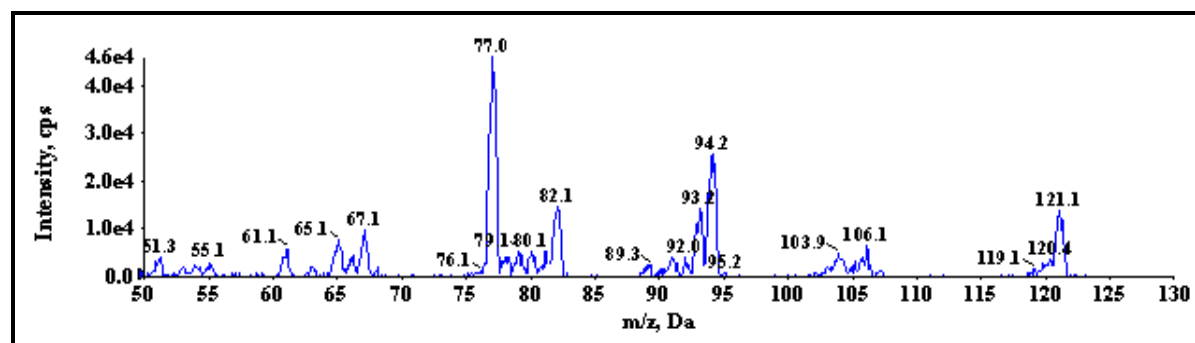


Figura 3AP. Espectro de íons fragmentos de m/z 121,1.

Fonte: Autor.

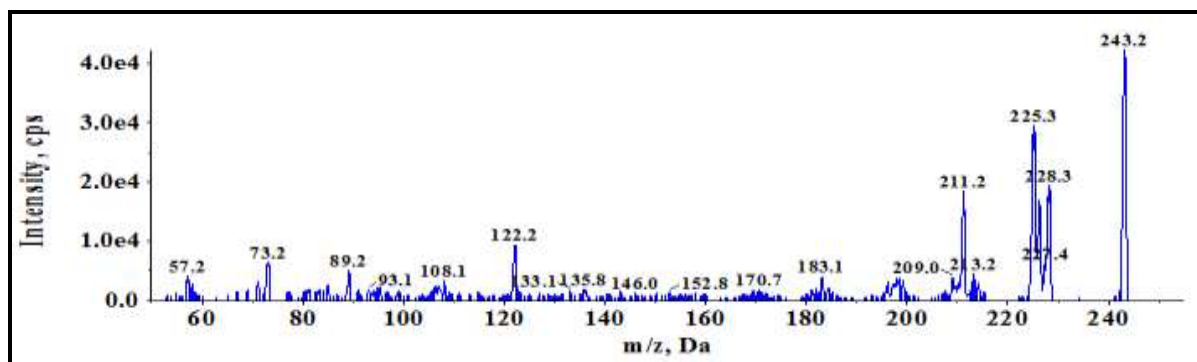


Figura 4P. Espectro de íons fragmentos de m/z 243,2.

Fonte: Autor.

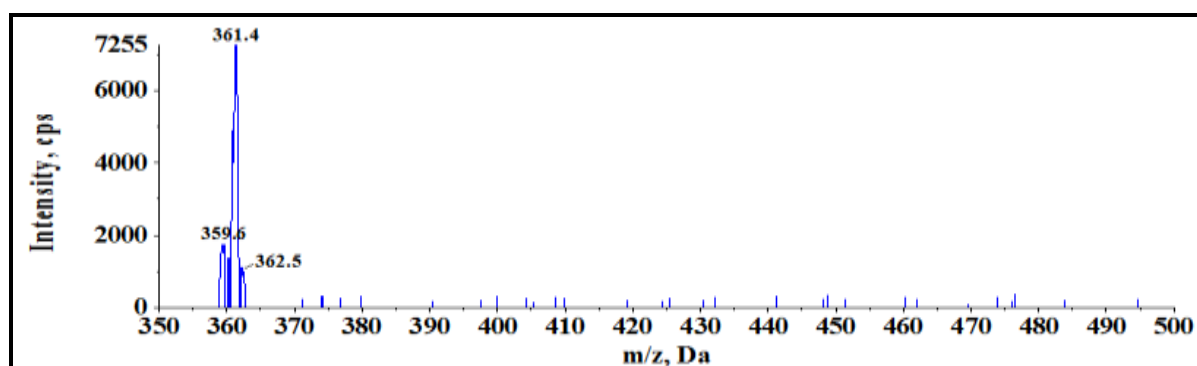


Figura 5AP. Espectro de íons precursores de m/z 344,3.

Fonte: Autor.

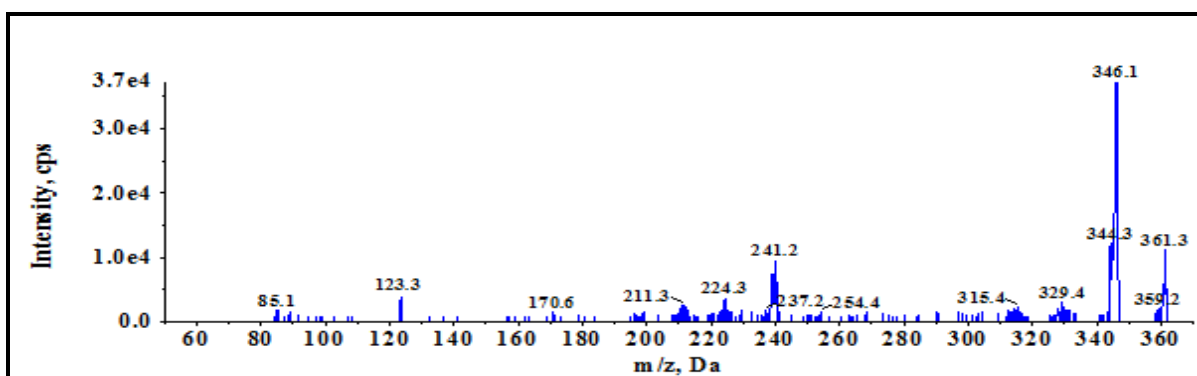


Figura 6AP. Espectro de íons fragmentos de m/z 361,3.

Fonte: Autor.

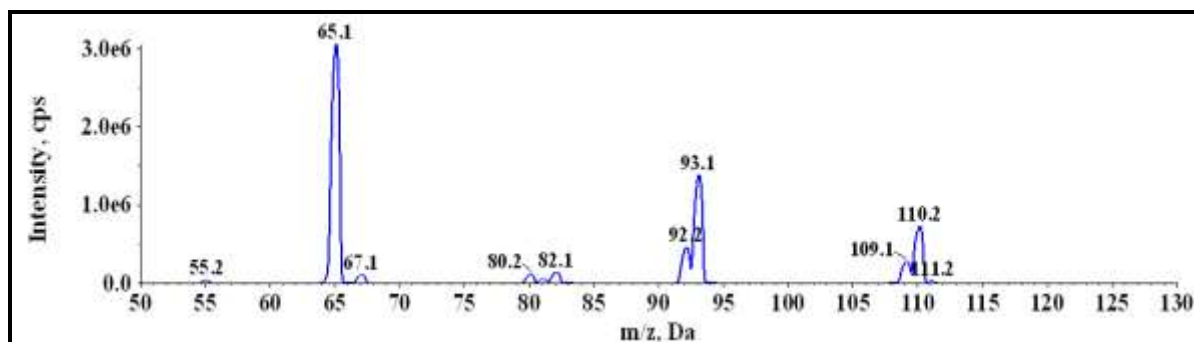


Figura 7AP. Espectro de íons fragmentos de m/z 110,2.

Fonte: Autor.

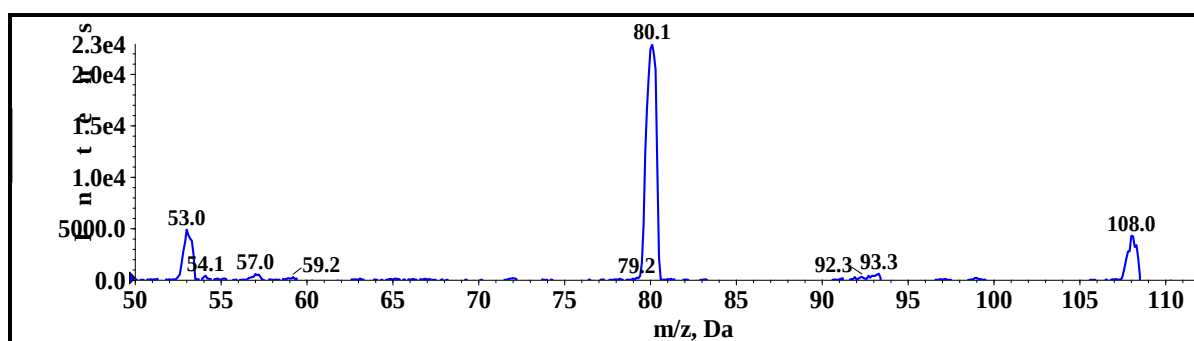


Figura 8AP. Espectro de íons fragmentos de m/z 108,0.

Fonte: Autor.

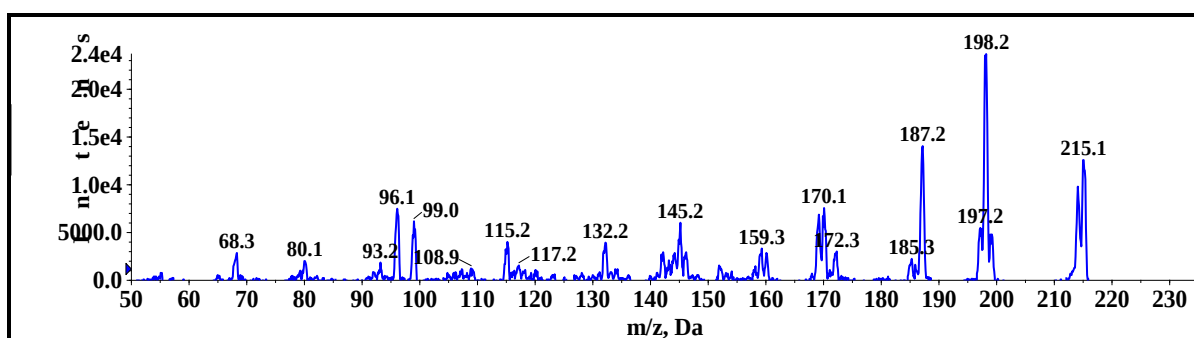


Figura 9AP. Espectro de íons fragmentos de m/z 215,1.

Fonte: Autor.

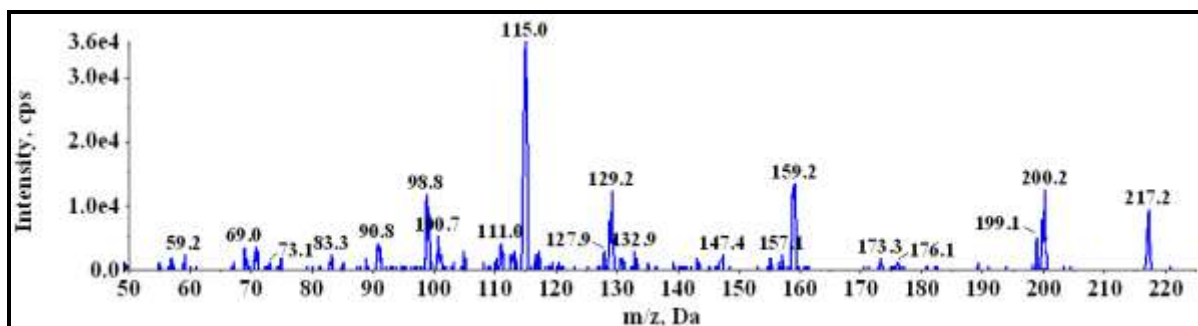


Figura 10AP. Espectro de íons fragmentos de m/z 217,2.

Fonte: Autor.

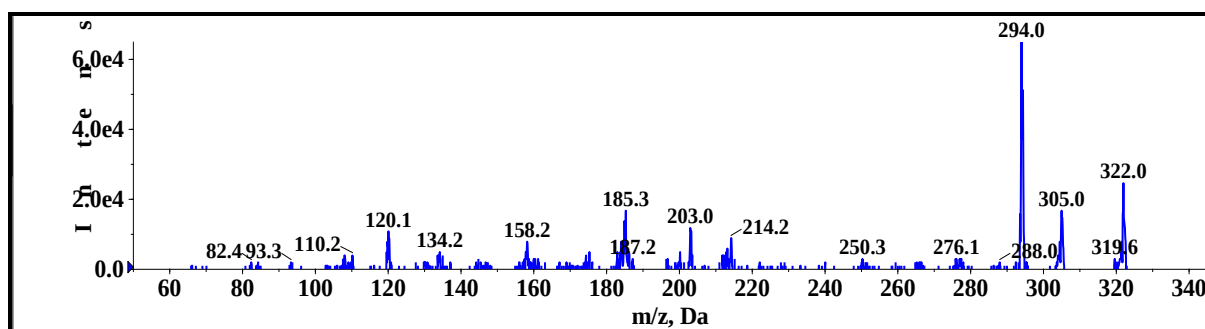


Figura 11AP. Espectro de íons fragmentos de m/z 322,0.

Fonte: Autor.

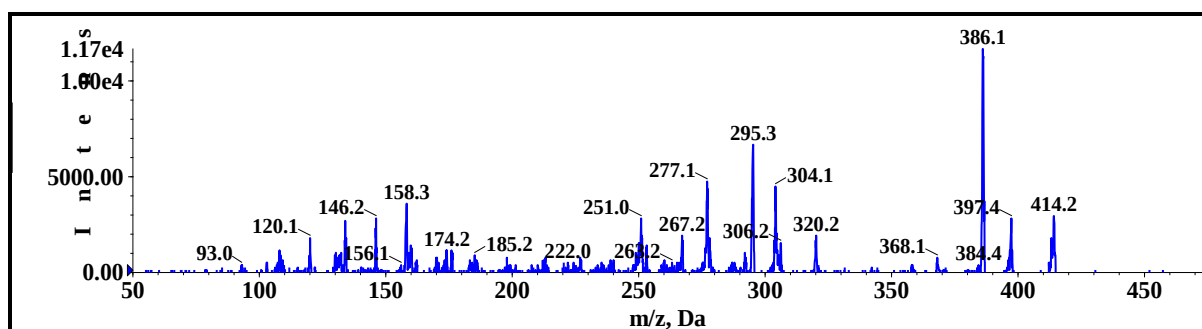


Figura 12AP. Espectro de íons fragmentos de m/z 414,2.

Fonte: Autor.

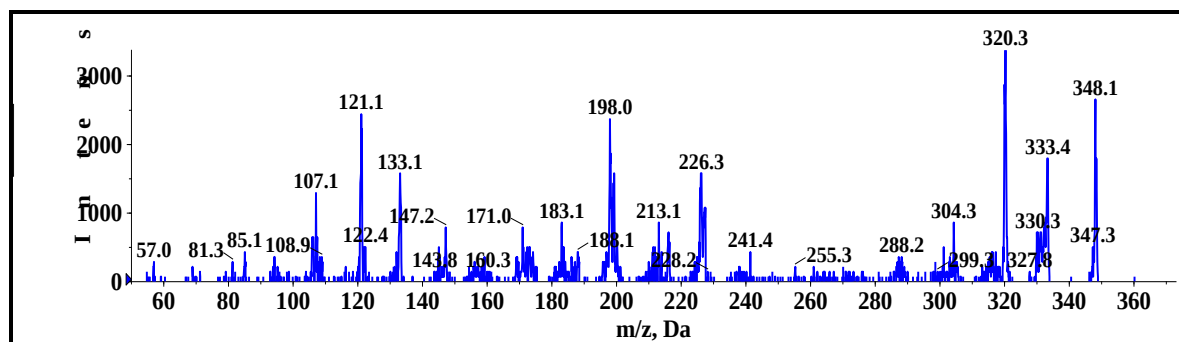


Figura 13AP. Espectro de íons fragmentos de m/z 348,1.

Fonte: Autor.

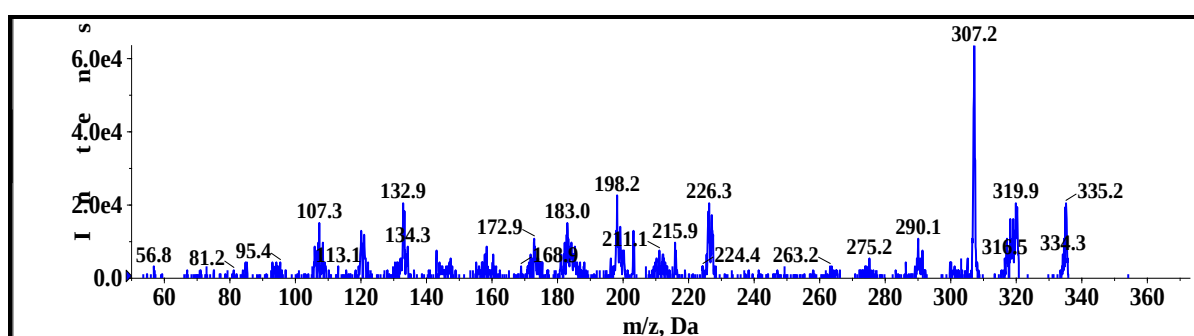


Figura 14AP. Espectro de íons fragmentos de m/z 335,2.

Fonte: Autor.

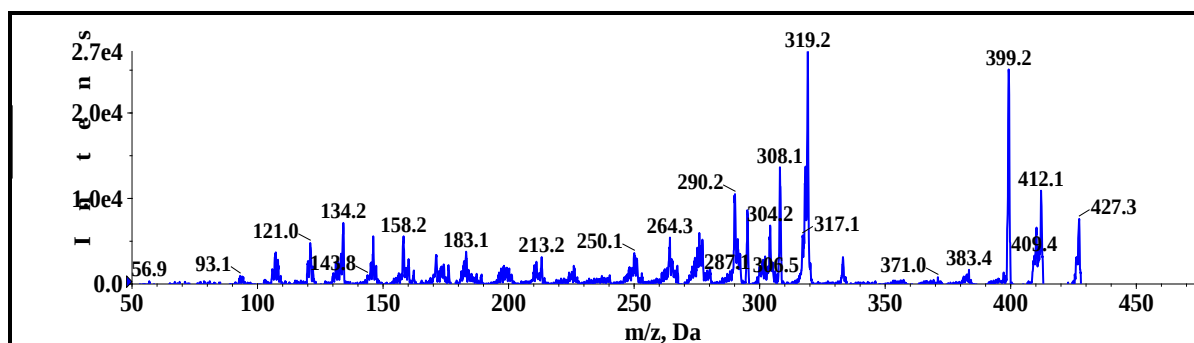


Figura 15AP. Espectro de íons fragmentos de m/z 427,3.

Fonte: Autor.

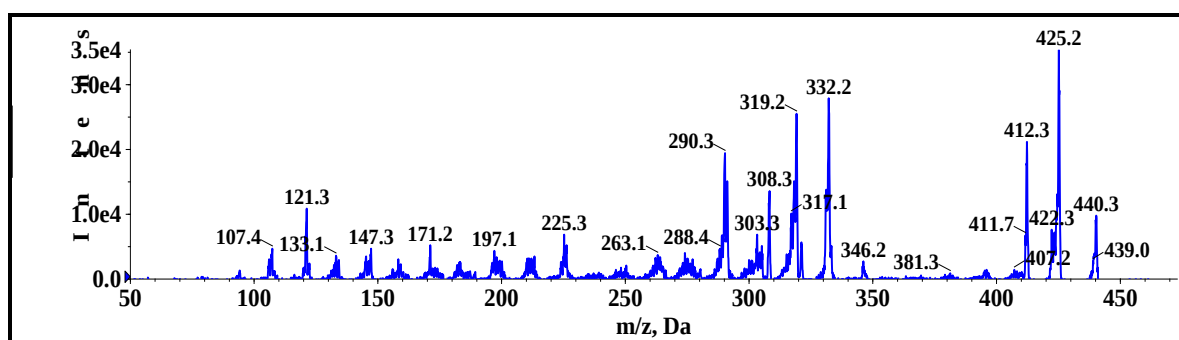


Figura 16AP. Espectro de íons fragmentos de m/z 440,3.

Fonte: Autor.

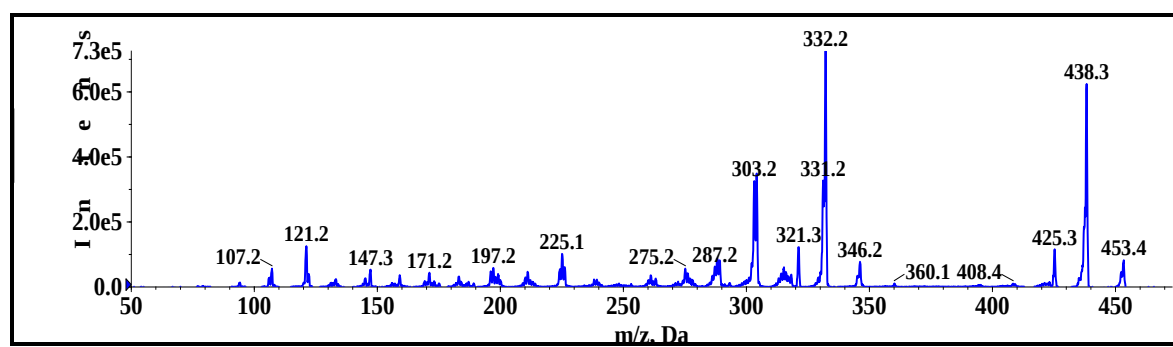


Figura 17AP. Espectro de íons fragmentos de m/z 453,4.

Fonte: Autor.