Caracterização in-vitro dos efeitos da aplicação dos ácidos hialurônico e cítrico em fibras capilares e estrato córneo

Ana Lucia Tabarini Alves Pinheiro[1], Carla Monserrat Grecco Lopes[1], Nathana Cindy Barros Silva Ramos[1], Alzira Xavier Pinto Dini[1], Gustavo Henrique da Silva[1], Gabriela da Silva Leite[1], Adriano Pinheiro[1].

[1]Grupo Kosmoscience, Valinhos/SP – Brasil.

Introdução

Frequentes são os lançamentos de produtos cosméticos com nomenclatura ácido, utilizados tanto no tratamento dérmico quanto das fibras capilares. Visando promover a reparação hídrica e diminuição da porosidade dos fios pelo fechamento das camadas cuticulares, esses produtos têm invadido as prateleiras dos consumidores.

O ácido hialurônico (AH), um polissacarídeo de estrutura tridimensional, é altamente hidrofílico formando ligações de hidrogênio com a água, criando uma rede tridimensional de hidrogel até 1000 vezes expandida. Isso devido aos grupos funcionais -COOH e -OH, que dispõem alta quantidade de elétrons disponíveis para a formação de ligações [1].

O ácido cítrico (AC) possui grupos altamente doadores de elétrons (H^+) que propiciam a troca de íons e interação de ligações com outras moléculas seja dentro de formulações ou a níveis teciduais [2].

O presente estudo analisou o comportamento das fibras capilares e o estrato córneo submetidos a aplicações de soluções de AH e AC, utilizando diferentes técnicas que avaliam propriedades da matriz interna da fibra capilar, além da avaliação de irritabilidade dérmica.

Materiais e Métodos

Preparo e tratamento das mechas

Dez mechas de cabelos naturais (5,0g e 25cm) foram submetidas aos tratamentos: Lauril éter sulfato de sódio 10% (LESS 10%), AH a 1,5% e 3,0% e AC a 5,0% e 10%. Aplicação: Aplicar 1,0mL da solução por mecha úmida e massagear por 1 minuto. Deixar em repouso por 15 minutos. Enxaguar por 30 segundos.

Resistência Mecânica

Equipamento de ensaio universal EMIC DL500 com célula de carga de 20N para avaliar a resistência mecânica de cinquenta fios por grupo.

Parâmetro avaliado: força a 20% de deformação específica.

Espectroscopia Infravermelho – FTIR ATR

Espectrofotômetro de infravermelho (Frontier - PerkinElmer), com célula de ATR (PIKE Technologies) e cristal de ZnSe. Foi avaliada a área média da banda em 1040 cm^{-1} referente ao estiramento assimétrico da ligação S=O, dos grupos $–SO_3^-$ e $–S–O_2^-$, componentes da oxidação da cistina.

DSC (Differential Scanning Calorimetry)

Equipamento DSC –Hitachi High-Tech Sciences TA7000 Series (30°C a 300°C).

Parâmetro avaliado: entalpia de desnaturação da α-queratina (ΔH_D).

Protocolo adaptado de irritação cutânea (OECD 439)[3]

Os fragmentos ex-vivo tratados com 16 µL das soluções avaliadas (42 min). Como controle negativo (fragmentos sem tratamento), controle positivo (lauril sulfato de sódio – LSS 5%). As amostras foram lavadas com 25mL de DPBS 1X e mantidas a 37°C (42h). O sobrenadante das culturas foi coletado e armazenado a -80°C para quantificação posterior de IL-1α.

A viabilidade do tecido foi determinada por um método colorimétrico usando corante MTT. O meio de cultura foi removido e 300 µL da solução de MTT (1,00 mg/mL) foi adicionado aos fragmentos. A cada fragmento (incubação de 3h) foi adicionando 750 µL de isopropanol acidificado com HCl 0,04N, para extração do MTT. De acordo com UN GHS são consideradas irritantes – categoria 2 –substâncias que promovem níveis de viabilidade celular ≤ 50% e não irritantes as que promovem > 50% de viabilidade[3].

Quantificação de IL-1α[4]

Quantificou os níveis de IL-1α das culturas utilizando um ensaio de ELISA sanduiche. A absorbância foi realizada em monocromador Multiskan GO (Thermo Scientific). Os valores de IL-1α foram normalizados pelo controle basal.

Parâmetro: irritante se IL-1α ≥ 50 pg/mL e não irritante se < 50 pg/ml[4].

Análise estatística: Comparação com o grupo Controle (LESS 10%): análise de variância de fator único, pós-teste de Dunnett, I.C95% (Tabela 1).

Resultados

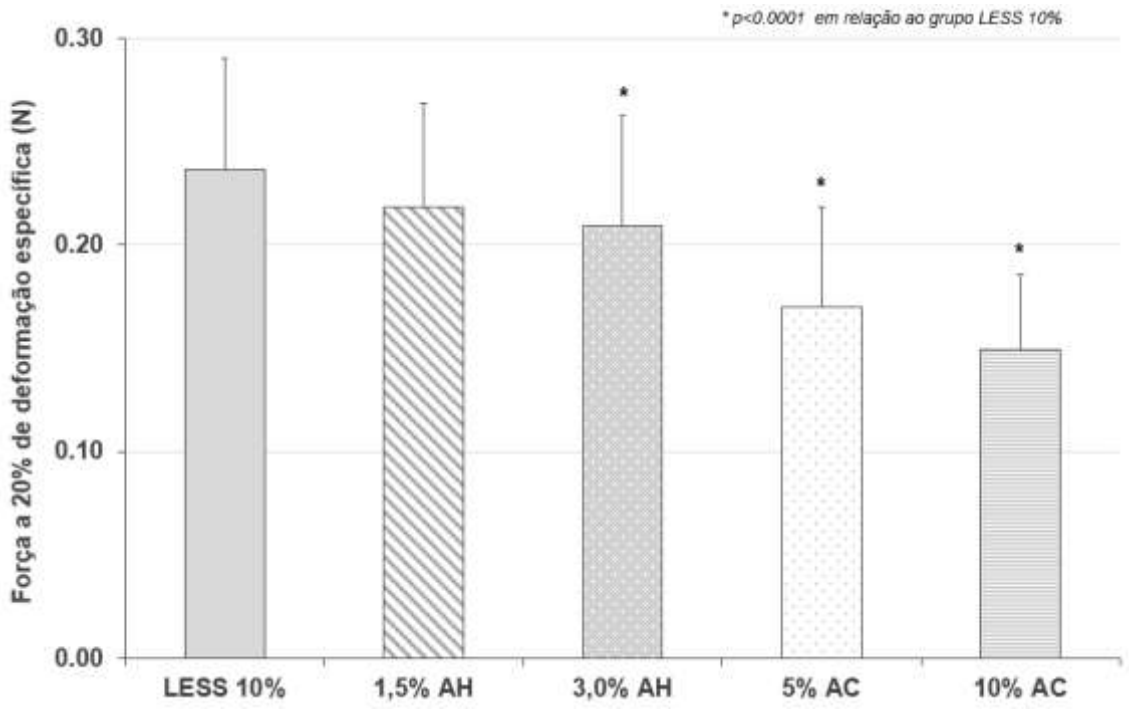
A **Tabela 1** resume os resultados das comparações estatísticas.

Tabela 1: Resultados da análise estatística análise de variância de fator único com pós-teste de Dunnett, I.C. 95%.

Técnica	Comparação	Apresentou diferença significativa	Valor de p
DSC	LESS 10% vs. 1.5% AH	sim	0.0008
	LESS 10% vs. 3% AH	sim	0.0007
	LESS 10% vs. 5% AC	sim	0.0094
	LESS 10% vs. 10% AC	sim	<0.0001
FTIR	LESS 10% vs. 1.5% AH	não	0.2752
	LESS 10% vs. 3% AH	sim	0.0292
	LESS 10% vs. 5% AC	sim	0.0436
	LESS 10% vs. 10% AC	sim	0.0078
Resistência Mecânica	LESS 10% vs. 1.5% AH	não	0.1835
	LESS 10% vs. 3% AH	sim	0.0180
	LESS 10% vs. 5% AC	sim	<0,0001
	LESS 10% vs. 10% AC	sim	<0,0001
OECD 439 adaptada	LSS 5% vs. 1.5% AH	sim	<0,0001
	LSS 5% vs. 3% AH	sim	<0,0001
	LSS 5% vs. 5% AC	sim	<0,0001
	LSS 5% vs. 10% AC	sim	<0,0001
IL-1 alpha	LSS 5% vs. 1.5% AH	sim	<0,0001
	LSS 5% vs. 3% AH	sim	<0,0001
	LSS 5% vs. 5% AC	sim	0,0005
	LSS 5% vs. 10% AC	sim	0,0070

A comparação entre as mechas submetidas ao tratamento com 1,5% AH e o grupo LESS 10% mostrou desempenho similar de força a 20% de deformação. As soluções de 3,0% AH, 5,0% AC e 10,0% AC, entretanto, proporcionaram uma diminuição significativa de 12%, 28% e 37% na força das fibras capilares em relação ao controle LESS 10% (Figura 1).

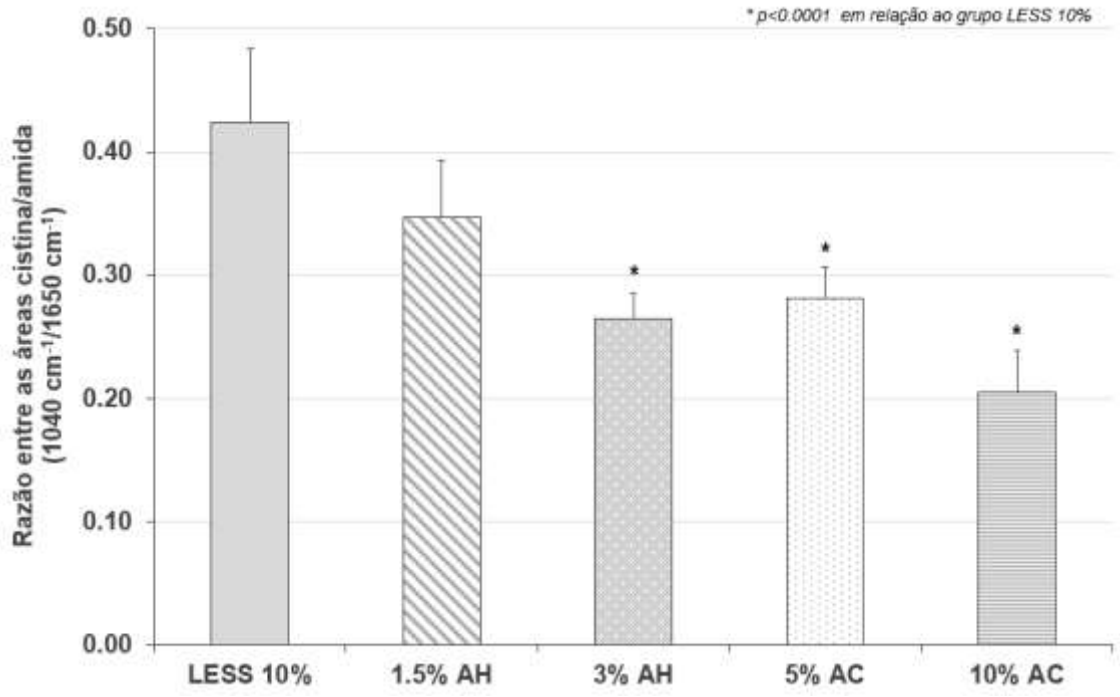
Figura 1: Força a 20% de deformação específica após a aplicação dos tratamentos (N).



Os dados representam a média ± desvio padrão da ruptura de 50 fios (Anova, Dunnett, I.C. 95%).

A aplicação da solução a 1,5% AH nas mechas não promoveu alterações significativas na razão entre cistina/amida em relação às mechas tratadas com LESS 10%. As soluções 3,0% AH, 5% e 10% AC, todavia, proporcionaram uma redução significativa nos valores médios da razão entre cistina/amida (Figura 2).

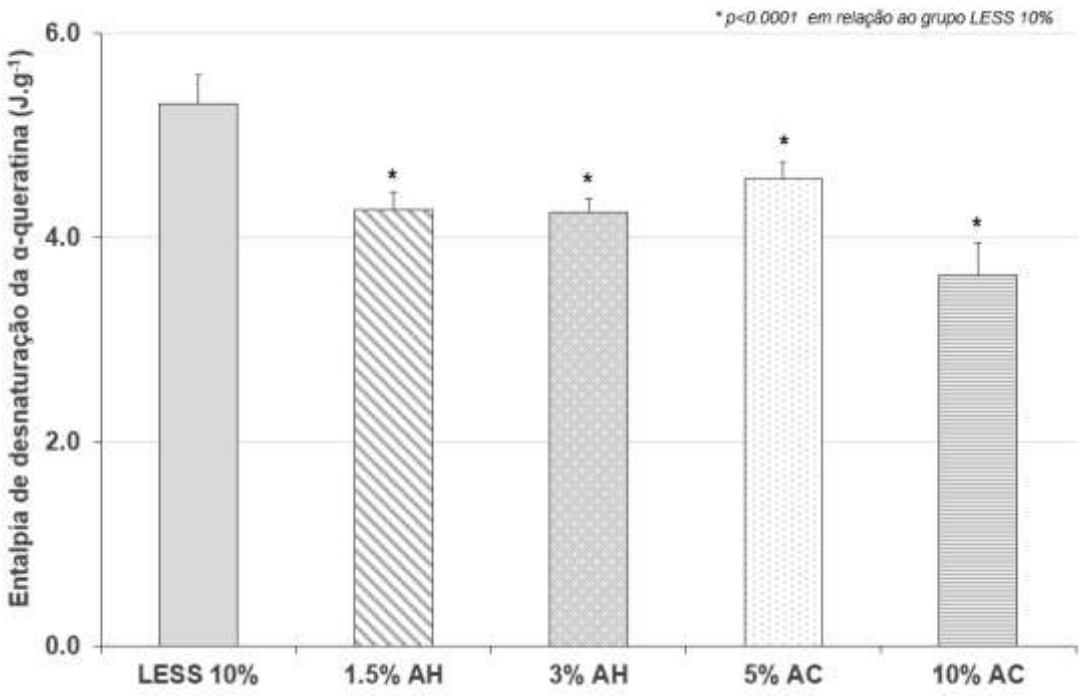
Figura 2: Razão entre as áreas cistina/amida (1040cm^{-1}/1650cm^{-1}).



Os dados representam a média ± desvio padrão da duplicata das mechas de cada grupo (Anova, Dunnett, I.C. 95%).

A aplicação das soluções de 1,5% AH, 3,0% AH, 5,0% AC e 10,0% AC promoveram diminuição significativa de 20%, 20%, 14% e 32% na entalpia de degradação da queratina (Figura 3).

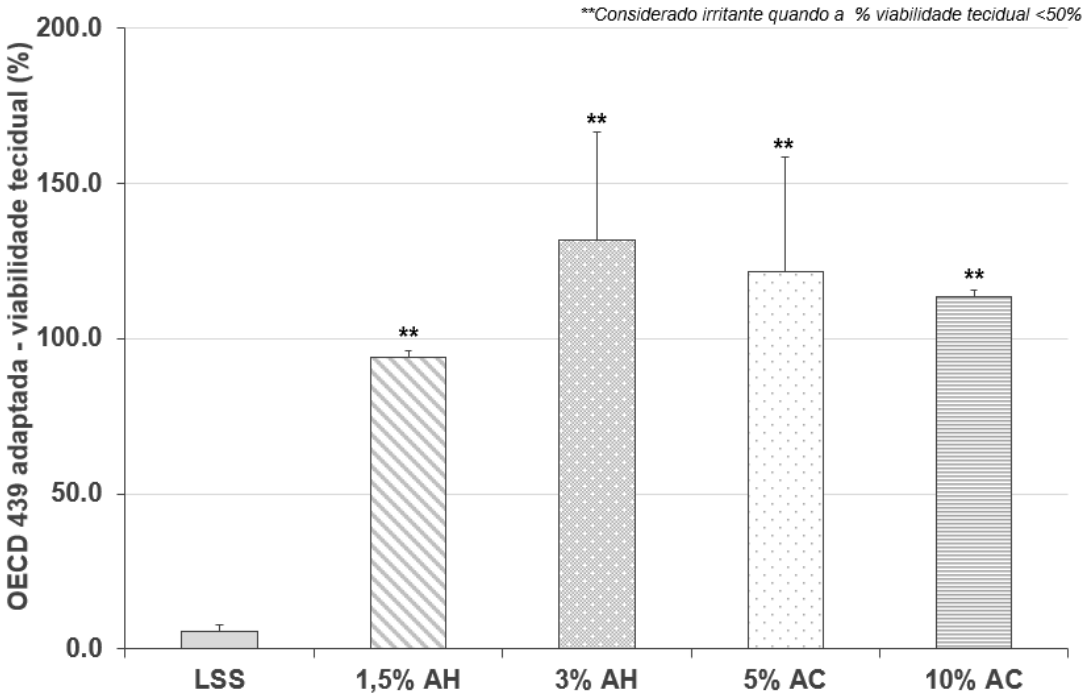
Figura 3: Entalpia de degradação da α-queratina ($J.g^{-1}$).



Os dados representam a média ± desvio padrão da triplicata das análises (Anova, Dunnett, I.C. 95%).

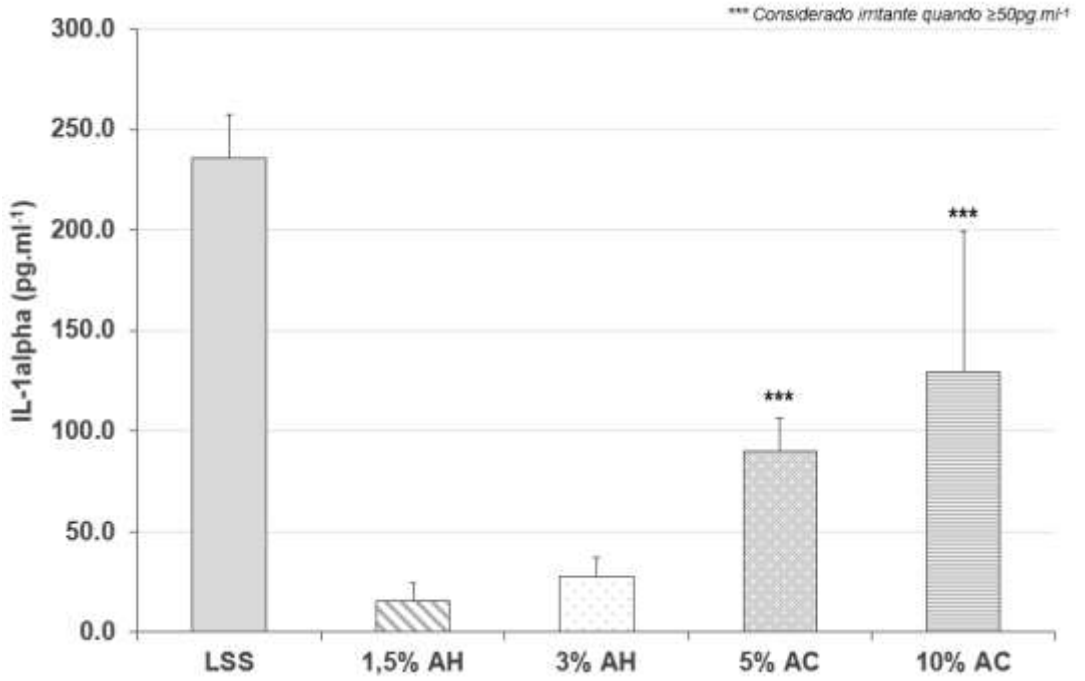
O controle positivo LSS resultou em uma viabilidade média de 5,82%, inferior a 50% (Figura 4). As soluções de 1,5% e 3,0% de AH, e de 5,0% e 10,0% de AC resultaram em viabilidades teciduais de 94,15%, 131,85%, 121,56% e 113,43%, respectivamente, classificando-as como não irritantes (Figura 4). As soluções de 1,5% e 3,0% de AH exibiram quantificação de IL-1α <50 pg/ml (15,31 e 27,81 pg/ml, respectivamente) categorizadas como não irritante. As soluções de 5,0% e 10,0% de AC apresentaram IL-1α >50 pg/ml (89,76 e 129,51 pg/ml) categorizadas como irritantes, pois apresentaram IL-1α >50 pg/ml (Figura 5).

Figura 4: Resultados OECD 439 adaptada - viabilidade tecidual (%).



Os dados representam a média ± desvio padrão de 4 replicatas (Anova, Dunnett, I.C. 95%).

Figura 5: Resultados IL-1 alpha ($pg.ml^{-1}$).



Os dados representam a média ± desvio padrão da triplicata das análises (Anova, Dunnett, I.C. 95%).

Discussão e Conclusões

Tratamentos ácidos podem promover danos severos na superfície cuticular e modificações na conformação estrutural dos filamentos intermediários da fibra capilar[5].

A cutícula do cabelo é composta principalmente por células de queratina sobrepostas, que têm estruturas ricas em enxofre, incluindo ligações de cistina (um aminoácido derivado da cisteína). Essas ligações são cruciais para a resistência e a integridade do cabelo.

Produtos com pH ácido podem promover a acidificação da superfície capilar, levando fechamento das cutículas. Essa condição geralmente promove melhora em algumas propriedades superficiais, como brilho, mas a exposição excessiva pode romper ou enfraquecer essas ligações, comprometendo a estrutura do cabelo e tornando-o mais propenso a quebras.

Quando as ligações de cistina são danificadas, a força estrutural do cabelo é reduzida. Isso pode resultar em cabelos quebradiços, que se partem mais facilmente durante a escovação, o penteado ou até mesmo ao toque.

Esse processo de desorganização da matriz cortical permite uma quebra do arranjo reticulado interno, promovendo uma maior maleabilidade das estruturas e diminuindo a força do fio e uma maior interação entre os componentes da cistina ($–SO_3^-$ e $–S–O_2^-$) e os elétrons ácidos (H^+). Dado observado para a diminuição da força das fibras capilares e da banda referente aos componentes de oxidação da cistina, nos grupos tratados com ácido hialurônico a 3% e ácido cítrico a 5% e 10% em relação ao grupo controle.

Esse desarranjo cortical causado pelo tratamento a 5% AC e 10% AC promoveu ainda a queda na entalpia de degradação da queratina em relação ao grupo tratado com LESS 10%.

Ainda, pode-se citar a interação do AH com a queratina da fibra que promoveu uma conversão da estrutura cristalina de hélice-α para folhas β, dado observado na queda na entalpia de degradação da queratina desses tratamentos (1,5% e 3,0% AH)[1.]

Por fim, podemos ressaltar que os tratamentos ácidos apesar de não promoverem diminuição na viabilidade tecidual, podem gerar uma inflamação local, de acordo com os resultados obtidos no doseamento de IL-1 α, de acordo com a OECD 439 e a técnica de quantificação de IL-1α, de acordo com EPISKIN™ SOP, versão 1.2, (estudo de validação de irritação cutânea ECVAM[4]).

Referências:

1. *Boira, C. et al. Hyaluronic acid: elucidating its penetration into, and effect on hair fibers using confocal Raman spectroscopy and biometric techniques. 2024011325 [Preprint]. 2024 Available from: https://doi.org/10.20944/preprints202401.1325.v1*

2. *OECD. In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method, No. 439, Paris. Available from: http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects_20745788. 2010*

3. *EpiSkin™ SOP, Version 1.8 (February 2009), ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ test method 15min-42h. Available from: http://ecvam.jrc.ec.europa.eu*

4. *Wortmann, F. Changes in Tensile Properties of Human Hair with Acidic pH: Investigating effects of two carboxylic acids on the Intermediate Filaments and the matrix. In: 23rd Int Hair Sci Symp 2023*

5. *Eberlin, S. et al. Ex Vivo Human Skin: An Alternative Test System for Skin Irritation and Corrosion Assays. Altern Lab Anim. 2021 Jul;49(4):137-146*