SELEÇÃO DE RESINA PARA INCLUSÃO DE FIOS DE CABELOS VISANDO A OBTENÇÃO DE IMAGENS DE CORTES TRANSVERSAIS COM MELHORES RESOLUÇÕES

Cristina Moreira De Sousa[1]; Angela Cristina Vargas Calle[*1]; Viviane Albarici[1]; Adriano Pinheiro[1].

[1] Grupo Kosmoscience, Ciência e Tecnologia Cosmética Ltda, Valinhos, SP, Brasil.
*Autor correspondente: angela@kosmoscience.com Rua Itália 274, 13270-180, Valinhos/SP, Brasil

RESUMO
Dentre os diversos métodos de análises de cabelos, os microscópicos eletrônicos de varredura, ganham destaque pela facilidade de visualização das estruturas, as quais, ao serem avaliadas com softwares permitem a quantificação dos danos em cabelos expostos a agentes estressores distintos, contribuindo significativamente, em inúmeros estudos. A inclusão de fios de cabelos para cortes histológicos apresenta desafios pois é imprescindível a obtenção de bons cortes, que não danifiquem a estrutura interna do fio A escolha das resinas e navalhas de alto perfil, junto com o processo de inclusão são determinantes neste contexto. Neste trabalho foi avaliada a influência do tipo de resina de inclusão na qualidade de cortes transversais de cabelo (naturais e descoloridos), os quais foram incluídos em diferentes resinas: Epóxi; Poliéster historesina e composto O.C.T. Os cortes foram realizados com navalha de alto perfil e em espessuras de 10, 8 e 6µm. Os resultados obtidos demonstraram que, a resina poliéster não apresentou características aptas para cortes histológicos, pois ao realizar os cortes, os mesmo se enroscaram impedindo a sua utilização; já a resina epóxi ao ser cortada não apresentou boa adesividade com o vidro e nos cortes, ao serem levados ao microscópio óptico, foram observados espaços vazios indicando que alguns cabelos foram removidos durante a microtomia (pouca aderência entre a resina e o cabelo); além disto, os cabelos que foram observados apresentaram “fraturas” na seção transversal impedindo a visualização das estruturas internas do fio. Por outro lado, as inclusões em historesina apresentaram maior facilidade no corte, com boa adesividade à lâmina de vidro e ao cabelo, porém, resultando novamente em imagens com “fraturas” em ambos tipos de cabelos. Finalmente a inclusão no composto O.C.T gerou cortes de superfície regular e uniforme, com ausência total de “fraturas” nos cabelos naturais e poucas regiões com fragmentações nos cabelos descoloridos.

Palavras-chave: histologia; estrutura capilar; secção transversal; MEV.

INTRODUÇÃO

A concepção de novos métodos de avaliação da estrutura capilar frente as inovações e acentuado crescimento da indústria de cosméticos, requer uma compreensão aprofundada da biologia desta estrutura e, nesse sentido, inúmeras são as ferramentas que podem auxiliar nas investigações, tais como, sensoriais, macroscópicas, microscópicas e moleculares (Baptista & Bastos, 2019; Fernandes et al., 2023; Saccardo & Silvia, 2022).

Dentre os diversos métodos de análises, os microscópicos ganham destaque pela precisão das estruturas evidenciadas, bem como análise dos danos em cabelos expostos a agentes estressores distintos, o que contribui, significativamente, para determinadas modalidades de estudos (Ponz; Ladaga & Bonetto, 2006; Tomes et al., 2007).

Compreender a estrutura biológica dos fios de cabelos se faz necessário, e nesse sentido entende-se que os cabelos fazem parte do que se classifica na literatura como apêndices da pele. É uma fibra biológica que se constitui pela organização de macromoléculas proteicas e lipídicas dispostas numa estrutura complexa por meio de ligações covalentes e não-covalentes (Yu & Zhang, 2017; Fustinoni, 2022; Nelson, Cox & Hoskins, 2022).

A fibra capilar é dividida em quatro camadas definidas como: cutícula, medula (camada mais interna do folículo, podendo ser ausente em determinados tipos de cabelo); complexo da membrana celular (CMC - componente que une as células da cutícula ao córtex; uma espécie de cimento intercelular composto por proteínas não-queratinosas com baixo conteúdo de enxofre e aminoácidos polares que interagem com a água); córtex, região de maior massa do fio, onde se encontram os grânulos de melanina (responsáveis pela cor e proteção dos cabelos), o qual é constituído por um conjunto de células cilíndricas denominada de matriz, também subdividida em ortocortical, paracortical e mesocortical (Harland et al., 2014; Ding et al., 2021; Junqueira & Carneiro, 2023; Fernandes et al., 2023; Saccardo & Silvia, 2022).

Visto isso, uma infinidade de análises de fios de cabelos é empregada em diagnósticos de tanto em distúrbios de saúde, estado nutricional, exposição a elementos tóxicos, drogas, medicamentos, como em análise forense, tornando os fios de cabelo, uma importante ferramenta de biomonitoramento. Deste modo, inúmeros são os protocolos desenvolvidos para analisar a estrutura biológica capilar, e os cortes histológicos são uma das ferramentas de análise, comumente, empregada em diversas categorias de estudos, representando uma poderosa aliada no desenvolvimento de novas tecnologias na avaliação mais aprofundada dos cabelos (Hill et al., 2014; Yu & Zhang, 2017; Grassin-Delyle et al., 2019).

Nesse sentindo, é interessante ter em mente que as preparações histológicas descritas na literatura apontam que, para o processamento das amostras convém respeitar as características das mesmas, preservando a microarquitetura do tecido, adequando à avaliação histológica (Williamson, 2015; Suvarna; Layton & Bancroft, 2019). Após a fixação o passo seguinte é a inclusão, o qual também precisa estar de acordo com as particularidades da amostra, pois nem todos os meios de inclusão são adequados a todos os tipos de amostras, há que se considerar as interações reagente-tecido (Prentø, 2009; Moreira & Lins, 2010).

As formulações de resina podem ser projetadas para microscopia óptica ou eletrônica, ou ambas. A rápida incorporação e polimerização das resinas são extremamente úteis para um rápido retorno do material de diagnóstico e para reduzir possíveis efeitos deletérios da resina. As resinas epóxi são preferenciais para microscopia eletrônica de rotina, pois se interligam com a amostra, fornecem excelente preservação ultraestrutural e são estáveis aos feixes de elétrons. As resinas acrílicas são mais adequadas para microscopia óptica, embora também possam ser utilizadas na microscopia eletrônica (Brown et al., 2010; Moreira & Lins, 2010).

As resinas epóxi e acrílicas são descritas por Newman e Hobot (2001) como uma alternativa ao metacrilato, uma vez que o metacrilato não reticulado é ligado apenas bidimensionalmente sendo rapidamente destruído no feixe de elétrons, e também é propenso a encolhimento, às vezes apresenta desigual polimerização, causando cisalhamento e "danos de polimerização" (Prentø, 2009; Suvarna; Layton,& Bancroft, 2019).

A microtomia, meio pelo qual o tecido é seccionado e fixado à superfície de uma lâmina de vidro para posterior exame microscópico, também compõem uma importante etapa no processo histológico, pois existem amostras que suportam determinados tipos de corte, logo o equipamento influencia no resultado final na obtenção das imagens de acordo com as especificidades da amostra. Pode-se obter cortes em micrótomo, vibrátomo, criostato e utramicrótomo (Suvarna; Layton & Bancroft, 2019; Sousa et al., 2021).

Quando se trata de criotécnicas os tecidos podem ser fixados ou não fixados para imobilizar os componentes dos tecidos e melhorar preservação celular (Brown et al., 2010; Newman & Hobot, 2001; Williamson, 2015).

Da mesma forma que a escolha da resina para inclusão da amostra deve ser feita de acordo com as especificidades da mesma, assim também a escolha da navalha para realização dos cortes deve seguir o mesmo intuito para obtenção de boas imagens. Nesse sentido, existe uma extensa gama de facas/navalhas, que variam desde a composição, revestimento, tamanho e perfil disponível para histologia de resina e suas especificidades, bem como aplicações. Para confecção de cortes incluídos são comercializadas navalhas descartáveis de alto e baixo perfis; as navalhas de alto perfil servem para microtomia de tecidos mais sólidos, enquanto as de baixo perfil servem para cortar tecidos mais delicados (Molinaro et al., 2010; Williamson, 2015; Suvarna; Layton & Bancroft, 2019).

Algumas facas/navalhas de metal podem ser revestidas com um material como diamante amorfo, teflon, polímero, cerâmica ou nitreto de titânio para reduzir fricção e aumentar a longevidade da borda do corte. De maneira resumida, as navalhas de tungstênio, um metal duro, são adequadas para aplicações de resina acrílica, incluindo osso, materiais duros, stents e para corte congelado (Suvarna; Layton & Bancroft, 2019).

Vale ressaltar que, é de fundamental importância planejar os protocolos cuidadosamente, considerando o tipo de tecido que estará envolvido no estudo e as formas de manuseá-lo para se obter imagens satisfatórias que possam responder as perguntas e atender o objetivo do estudo (Prentø, 2009).

McMullen et al. (2021) fizeram várias observações pertinentes relacionadas à técnicas de microtomia empregadas a cortes de fios de cabelo, e de acordo com o observado os autores concluíram que o ideal e preferível é o uso de uma lâmina de micrótomo diamantada, pois proporciona cortes extremamente suaves, mas infelizmente, este tipo de lâmina não pode ser usado em todos os criostatos/micrótomos, além do que, muitos pesquisadores, por vezes, ficam restritos ao tipo de lâmina que podem empregar com base nos recursos disponíveis. As lâminas de aço inoxidável utilizadas para cortar as seções transversais do cabelo, normalmente ficam “cegas” após os primeiros cortes. Os

autores ainda relatam que as seções transversais de cabelo africano, bem encaracolado, raramente apresenta um corte com aspecto tão áspero; isto poderia sugerir algumas diferenças estruturais fundamentais nestes tipos de fios de cabelos

Visto isso, investigar as melhores opções de inclusão de fios de cabelos, bem como equipamentos para corte propicia o desenvolvimento e o estabelecimentos de técnicas que forneçam boas imagens, e consequentemente, repostas para as questões levantadas nas pesquisas da voltadas a cosmetologia.

OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é encontrar a melhor combinação de meio de inclusão/navalha e equipamento de corte para a obtenção de cortes transversais de cabelos que permitam a conservação da estrutura interna do fio, isto é, superfície uniforme e lisa, permitindo a observação de diferentes componentes do fio.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados cabelos naturais (sem nenhum tipo de tratamento químico) e cabelos tratados (descoloridos); as amostras de cabelo foram separadas por mechas de 0,5cm de comprimento, aproximadamente, sem nenhuma preparação prévia, em seguida foram posicionadas perpendicularmente em molde apropriado de inclusão histológica, para obtenção dos cortes transversais dos fios.

As resinas utilizadas para inclusão dos fios de cabelo foram: Historesin Embedding Kit, Resina Histológica Technovit 7100, Resina Poliéster Arazyn 25100 Resina Epoxi 2001 e composto O.C.T-Tissue-Tek. Todas foram preparadas de acordo com as instruções descritas pelos respectivos fabricantes.

Os cortes foram realizados com navalhas de tungstênio e de aço, ambas de alto perfil, sem uso anterior.

As amostras incluídas nas resinas/historesinas foram cortadas em micrótomo, ao passo que, as amostras incluídas no composto O.C.T foram cortadas em criostato Leica CM1860 em temperatura de -30°C. Os cortes foram realizados em espessuras de 10µm, 8µm e 6µm.

Observações iniciais foram realizadas utilizando-se do microscópio ótico Olympus BX53 acoplado a câmera digital DP74, nas objetivas de 10x e 20x. O programa utilizado para aquisição das imagens foi o CellSens Standard.

Os melhores cortes avaliados na microscopia de luz foram selecionados para serem avaliados posteriormente em Microscopia Eletrônica de Varredura no equipamento MEV-FEG, marca Tescan, modelo Mira. As amostras foram recobertas com ouro antes de ser colocadas no equipamento e a análise foi realizada em alto vácuo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As inclusões dos fios de cabelos nas diferentes resinas, historesinas e no composto O. C. T. juntamente ao uso de dois tipos de navalhas e equipamentos apresentaram diferentes comportamentos quando comparadas entre si.

Na utilização das resinas Poliéster Arazyn 25100 e Epoxi 2001 foram encontradas dificuldades, tanto na inclusão dos fios de cabelos, quanto na microtomia. Foram necessários alguns ajustes quanto a quantidade de endurecedor utilizado, bem como, quanto ao tempo de polimerização de ambas.

A partir das orientações do fabricante para Resina Poliéster foi necessário utilizar metade da quantidade orientada de endurecedor, pois a proporção recomendada endureceu demasiadamente o bloco, enquanto que para a Resina Epóxi houve a necessidade de aumentar para o dobro da quantidade prescrita, pois a polimerização nas quantidades recomendadas não polimerizaram em 5 dias, após o aumento do volume do endurecedor em 24 horas houve a polimerização.

Os cortes foram realizados com navalha de tungstênio, visto que as resinas utilizadas apresentam alto endurecimento e após inclusão dos cabelos em ambas as resinas, nos cortes foram observados vários espaços vazios; a presença destes espaços pode estar indicando uma baixa adesão entre o cabelo e as resinas poliméricas (baixa compatibilidade); Outra dificuldade encontrada foi que só foi possível obter cortes em espessuras de 10µmos quais formaram películas que não aderiram a lâmina histológica, dificultando a observação dos cortes no microscópio ótico, pois não foi possível ter um foco homogêneo.(Figuras 1; 2). Outra observação é que as imagens dos fios de cabelo incluídos em ambas resinas, apresentaram “fraturas” na face das secções transversais, nos dois tipos de cabelos testados, as quais não são intrínsecas da estrutura do fio e possivelmente foram formadas na hora de

realizar o corte ou durante a inclusão do cabelo na resina, dificultando a observação da morfologia interna do fio de cabelo.

Figura 1- Secção histológica de fios de cabelo incluído em Resina Epóxi 2001 com 10µm de espessura. A) aumento de 10X; B) aumento de 20X

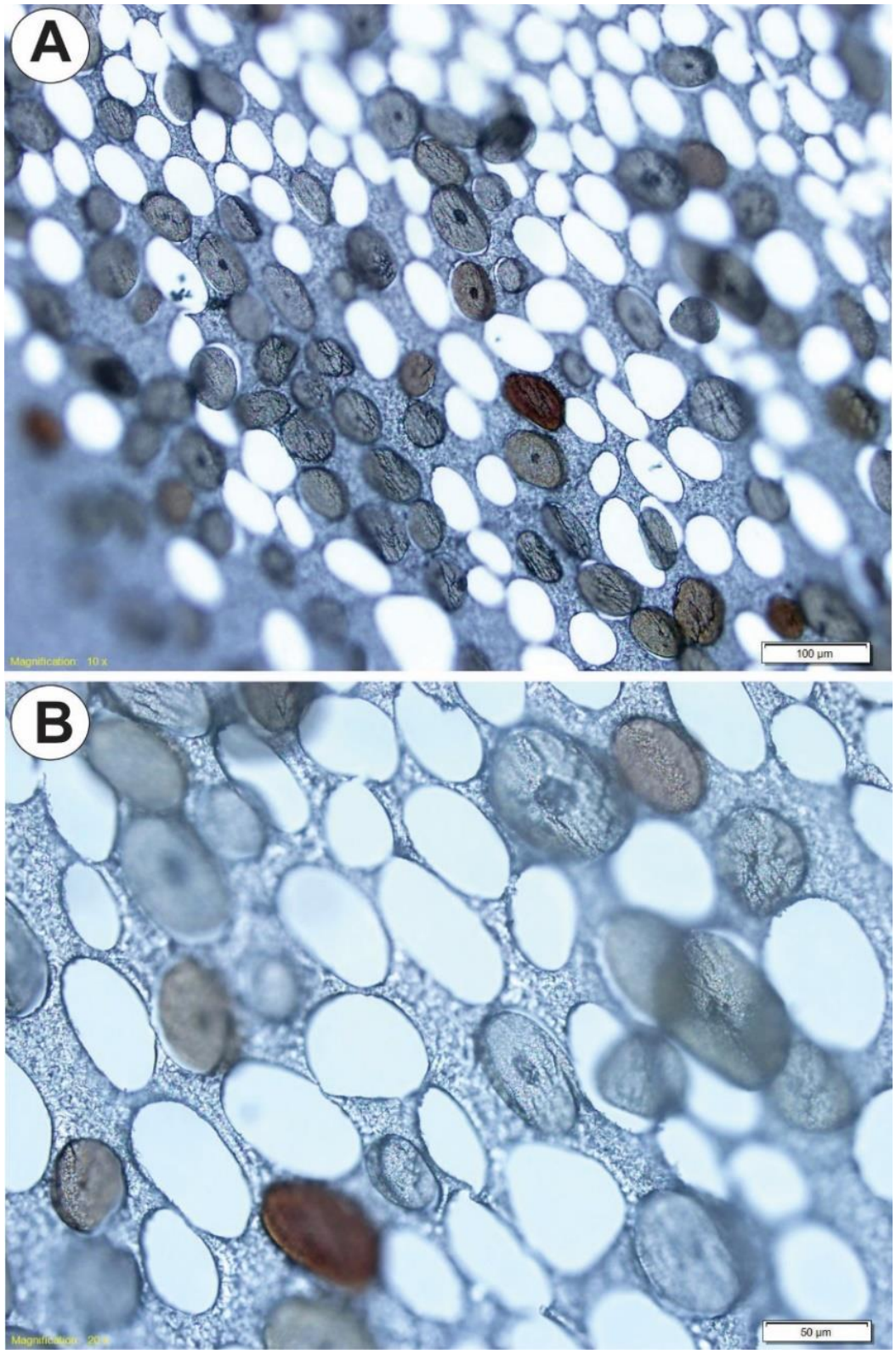
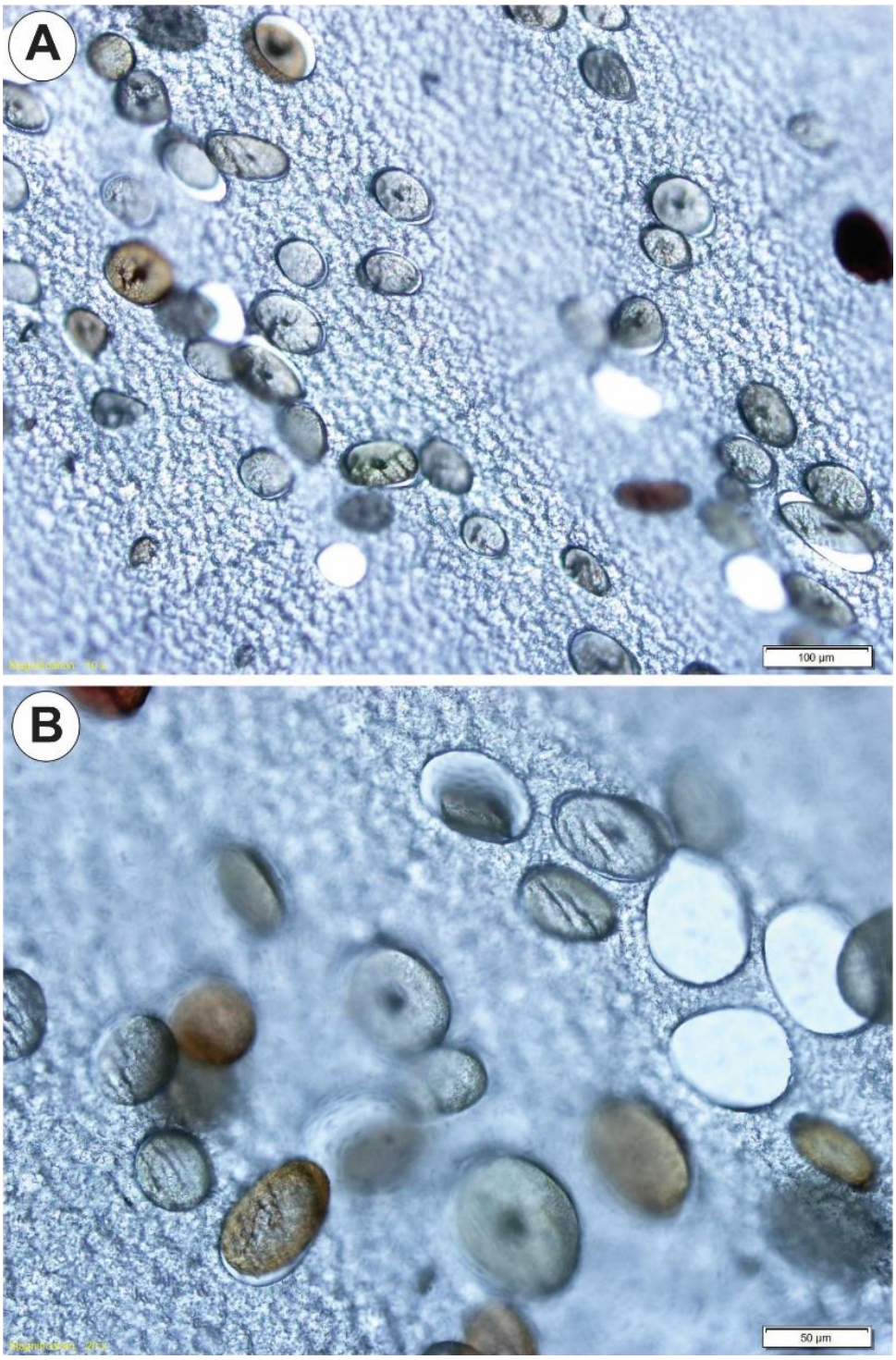


Figura 2- Secção histológica de fios de cabelos incluídos em Resina Poliéster Arazin 25100 com 10µm espessura. A) aumento de 10X; B) aumento de 20X



Por outro lado, a inclusão dos fios de cabelos nas historesinas (resinas acrílicas) de marcas comercias, as quais são comumente utilizadas e bem estabelecidas como suporte para seccionamento de diversas amostras (Titford, 2006 & Costa, et al., 2009; Molinaro et al., 2010). não apresentou nenhuma dificuldade. Os fios de cabelo aderiram satisfatoriamente à resina e durante a inclusão e consequentemente ao realizar os cortes não houveram muitas remoções dos fios; além disto foi possível realizar os cortes nas diferentes espessuras estipuladas, os quais aderiram à lâmina histológica permitindo uma melhor visualização no microscópio ótico, pela facilidade de localizar o foco. A pesar das facilidades de inclusão e corte, ao observar a superfície da secção transversal dos fios, os mesmos apresentaram as mesmas “fraturas” observadas nas superfícies dos cabelos que foram

incluídos nas resinas poliéster e epóxi (Figuras 3; 4). A presença das fraturas nestes novos grupos leva a acreditar que ou as resinas estão reagindo com o cabelo deixando o mesmo mais susceptível a fraturas ou as mesmas estão se gerando durante o corte e neste caso a navalha de tungstênio a pesar de ser a adequada para cortar os materiais duros, por ter uma espessura mais grosa, não seria adequada para o corte de fios de cabelo, quando as estruturas internas desejam ser conservadas.

Figura 3- Secções histológicas de fios de cabelos incluídos em historeina Leica. A) aumento de 10X e 10µm de espessura; B) Aumento de 20X e 10µm de espessura; C) aumento de 10X e 8 µm de espessura; D) aumento de 20X e 8 µm de espessura; E) Aumento de 10X e 6 µm de espessura; F) Aumento de 20X e 6 µm de espessura.

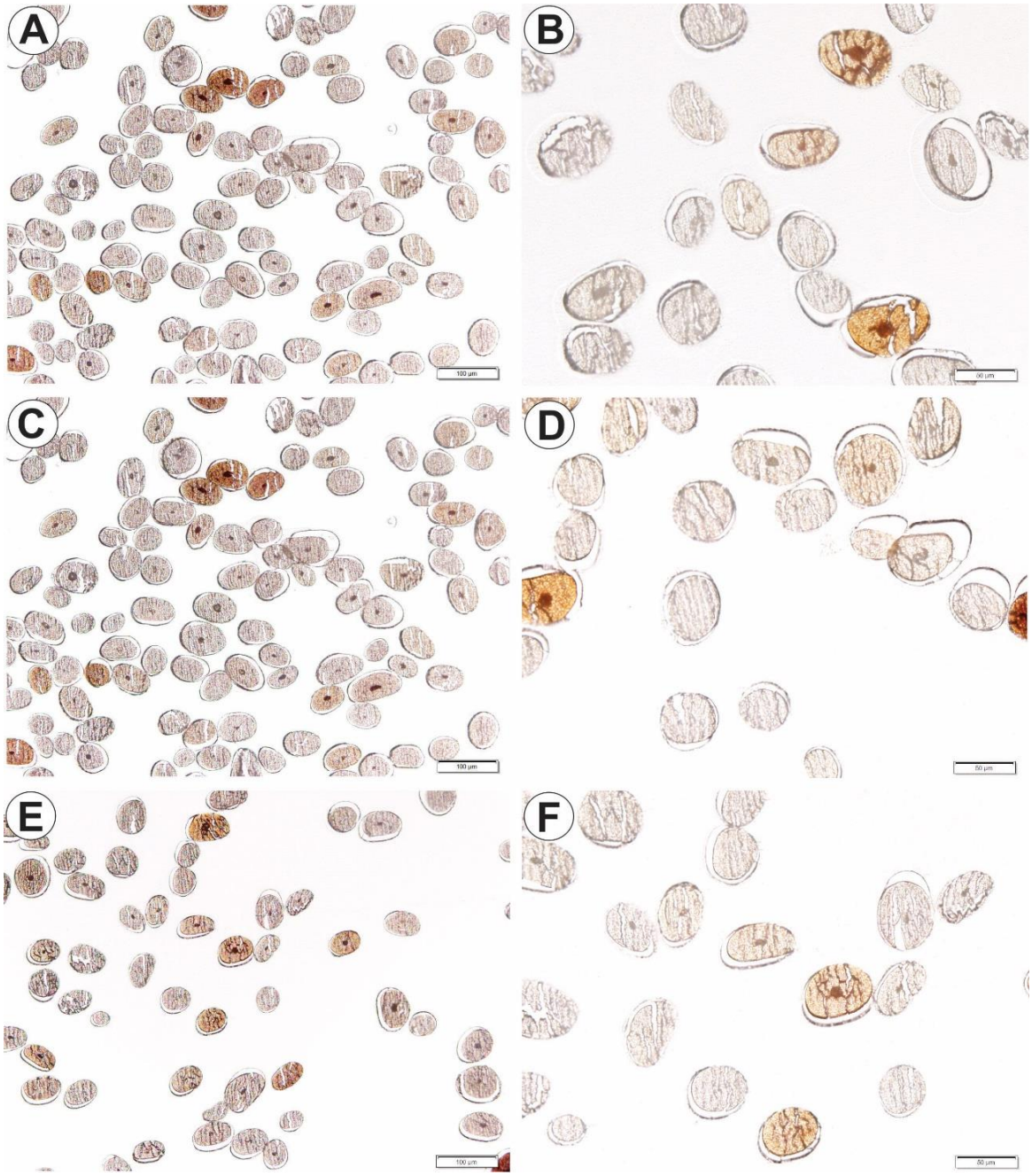
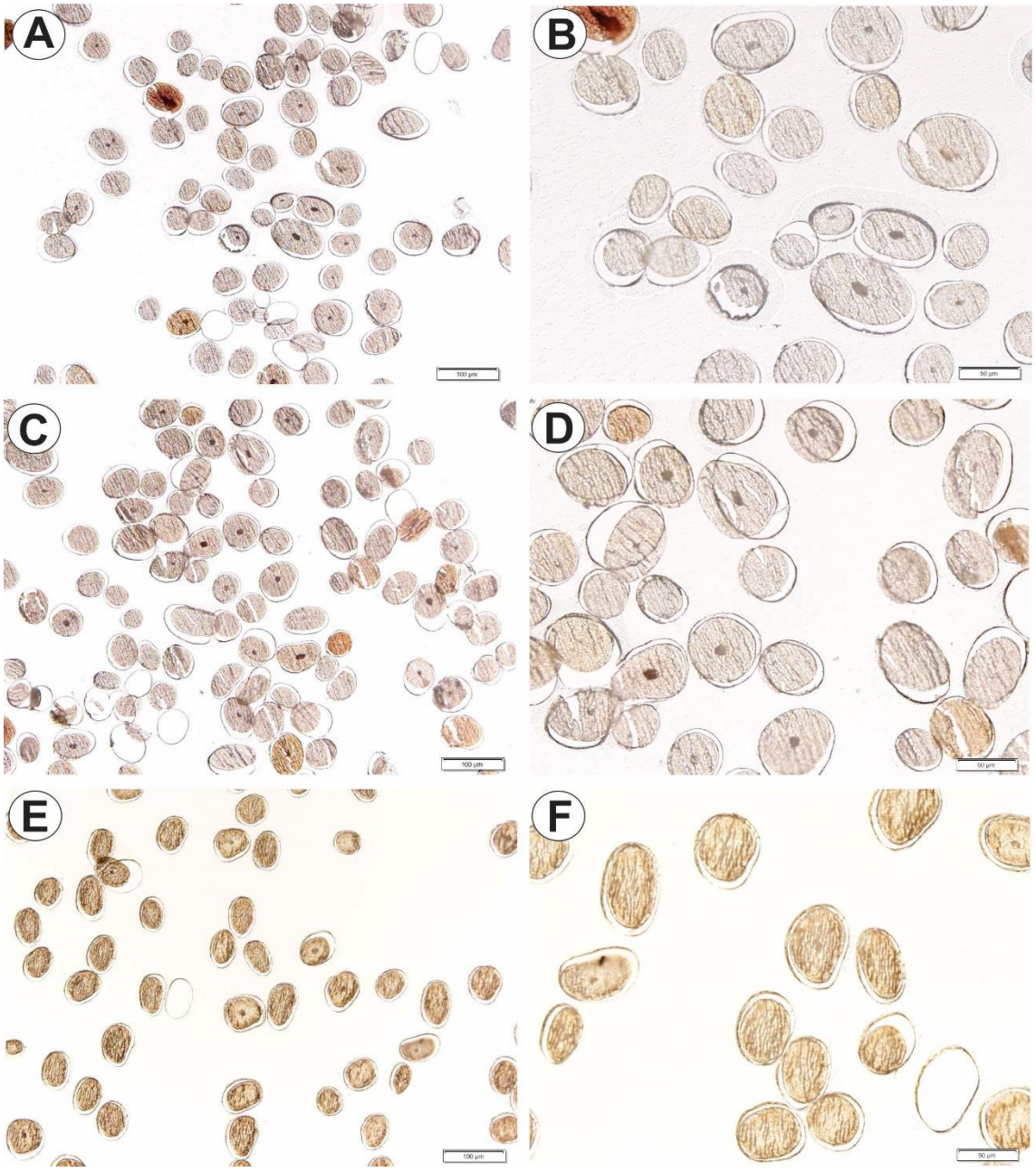


Figura 4 - Secções histológicas de fios de cabelos incluídos em historeina Technovit. A) Aumento de 10X e 10µm de espessura; B) Aumento de 20X e 10µm de espessura; C) Aumento de 10X e 8 µm de espessura; D) Aumento de 20X e 8 µm de espessura; E) Aumento de 10X e 6 µm de espessura. F) Aumento de 20X e 6 µm de espessura.



Devido as dificuldades encontradas anteriormente na inclusão e posterior corte dos fios dos cabelos nas resinas mais duras (epóxi, acrílicas e poliéster), foram realizados novos experimentos incluindo os cabelos em material mais macio; neste caso foi escolhido o composto O. T. C (*Optimal cutting temperature compound*) o qual é feito de uma mistura de polivinil álcool e polietileno glicol de baixa massa molar e dispensa tratamento prévio da amostra. De acordo com as descrições fornecidos pelo fabricante a alta viscosidade do composto O.C.T resulta em um congelamento rápido para uma qualidade ideal de corte. O meio O.C.T. é usado para incorporar rapidamente espécimes de tecido fresco para seções congeladas usando-se do criostato. Sua formulação de glicóis e resinas transparentes e solúveis em água, fornece uma matriz sólida para encapsular amostras de tecido para

um corte consistente em uma temperatura de trabalho criostato abaixo de -10°C e a coloração de fundo indesejável é eliminada, pois nenhum resíduo é deixado nas lâminas. Como este composto endurece nessa baixa temperatura e a mesma temperatura deve ser mantida durante os cortes, foi necessário realizar o corte em criostato com temperatura de -30°C. Para a realização dos cortes, foram usados 2 tipos de navalha; navalha de aço (mais fina) e navalha de tungstênio (igual às utilizada nos experimentos anteriores).

A inclusão dos fios de cabelo no composto O.T.C não apresentou nenhuma dificuldade e nenhum fio removido durante a criotomia; Além disto, foi possível observar no microscópio óptico que os cortes realizados nos cabelos naturais, não apresentaram alterações morfológicas na superfície; já nos cabelos descoloridos foram observadas algumas “fraturas” na face da estrutura interna do cabelo, porém, bem menos, quando comparado aos cortes realizados nos cabelos incluídos nas resinas testadas anteriormente. Ao comparar os cortes realizados com navalha de aço e tungstênio, nos cortes realizados com navalha de tungstênio foi possível observar uma textura diferente na superfície, no entanto as diferenças não foram significativas a simples vista (Figuras 5; 6).

Figura 5- Secções histológicas de fios de cabelos em meio de inclusão O.T.C cortados com navalha de aço com aumento de 20X. A) Cabelos naturais na espessura de 10µm; B) Cabelos naturais na espessura de 8µm; C) cabelos naturais na espessura de 6µm; D) cabelos descoloridos na espessura de 10µm; E) cabelos descoloridos na espessura de 8µm; F) cabelos descoloridos na espessura de 6µm.

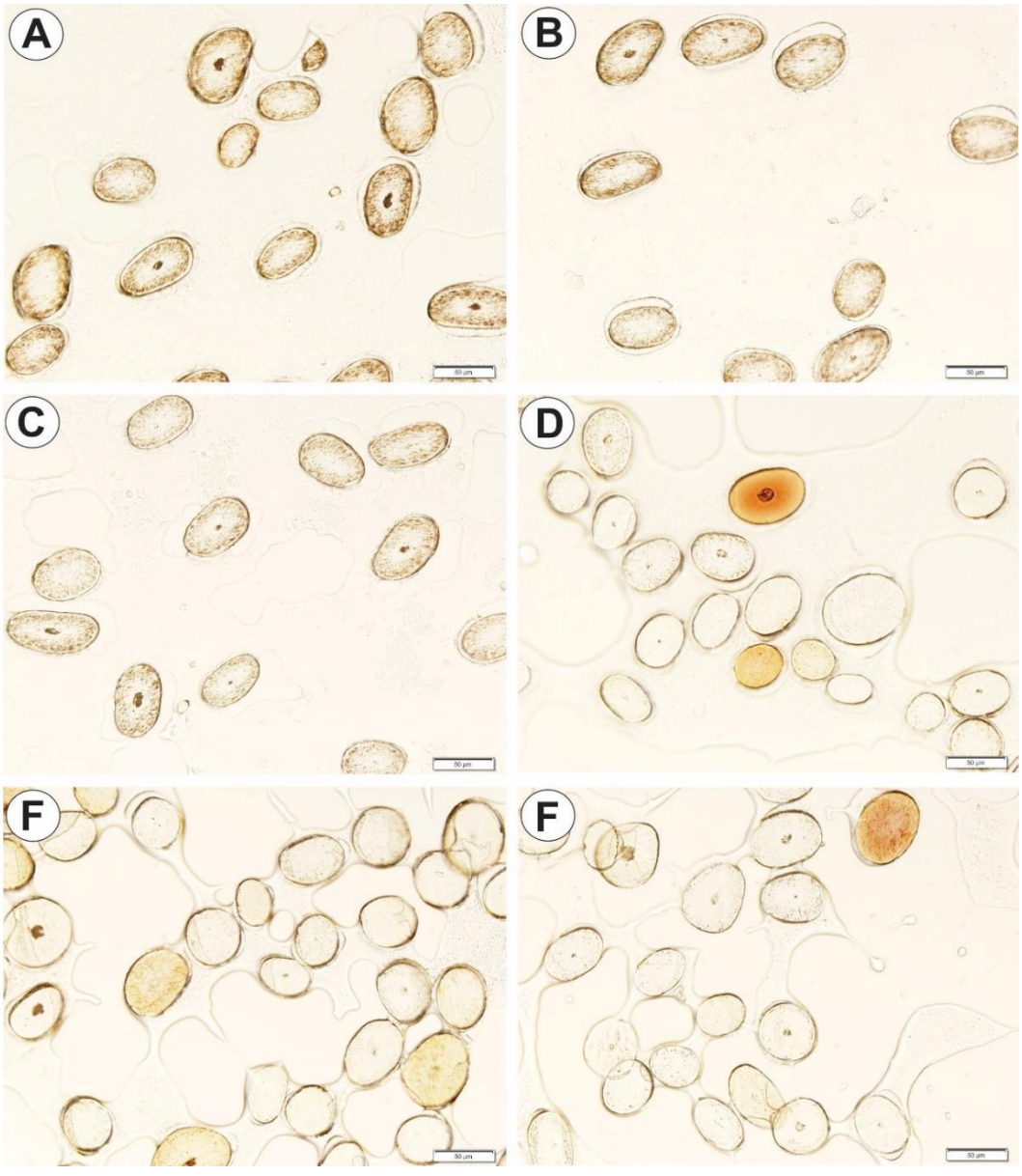
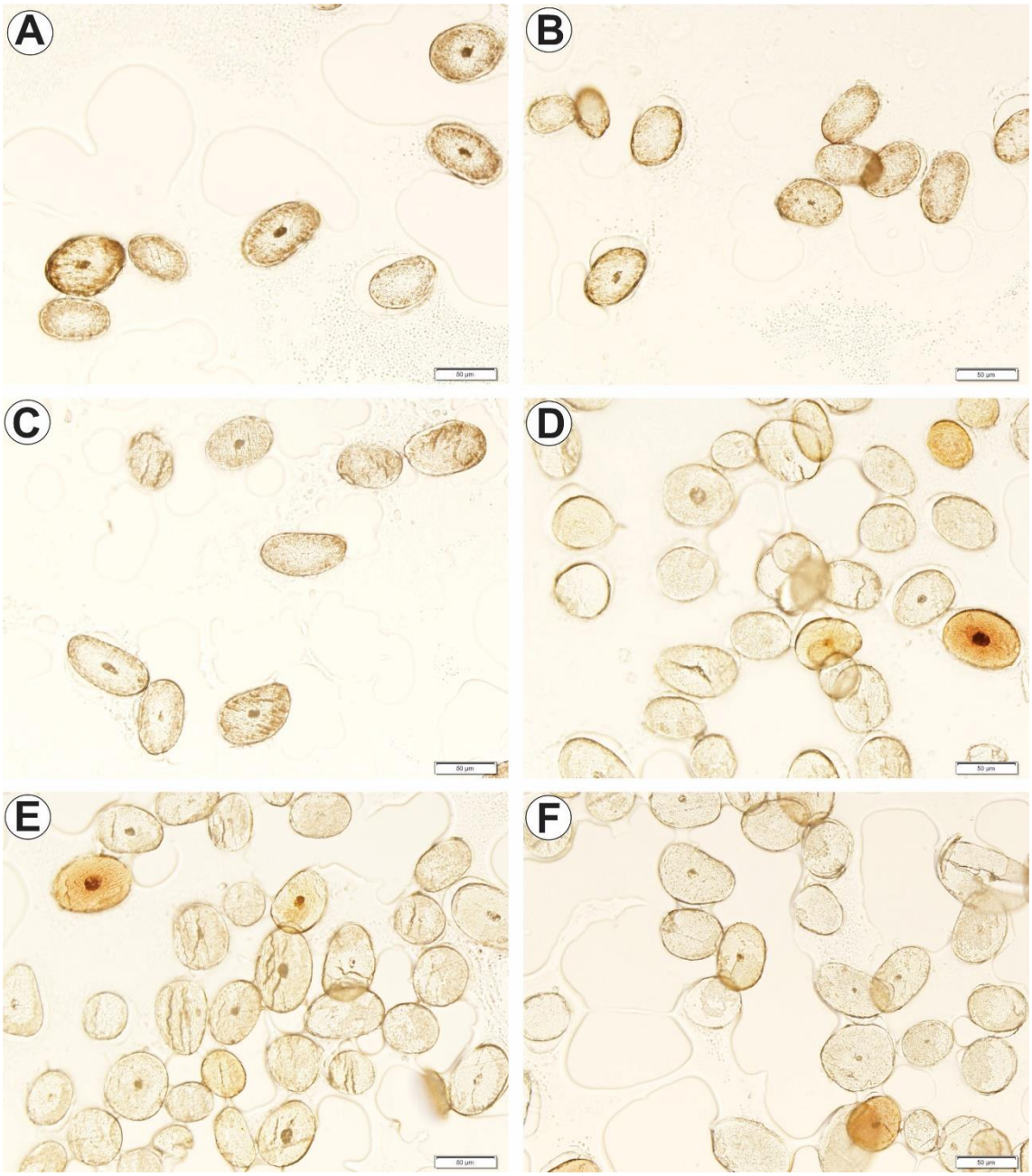
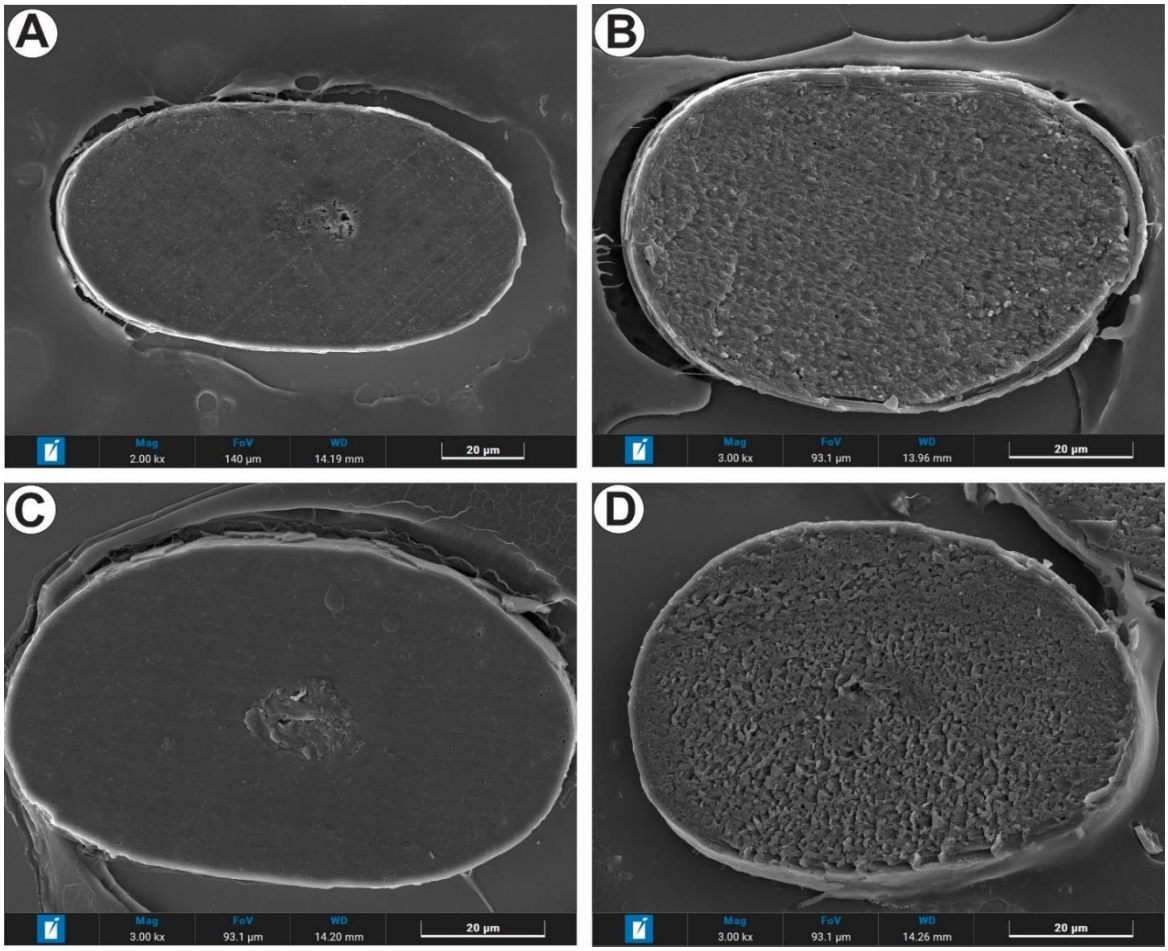


Figura 6 - Secções histológicas de fios de cabelos em meio de inclusão O.T.C cortados com navalha de tungstênio e aumento de 20X. A) cabelos naturais na espessura de 10µm; B) cabelos naturais na espessura de 8µm; C) cabelos naturais na espessura de 6µm; D) cabelos descoloridos na espessura de 10µm; E) cabelos descoloridos na espessura de 8µm; F) cabelos descoloridos na espessura de 6µm.



Com o objetivo de visualizar melhor as diferenças entre os cortes realizados com navalha de tungstênio e navalha de aço nos cabelos incluídos no composto O. T, C, os cortes foram levados a análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Nas imagens obtidas, foi possível observar que os cortes tanto dos cabelos naturais, quanto os descoloridos apresentaram superfície mais uniforme, quando realizados com a navalha de aço, em comparação com os cortes obtidos a partir da navalha de tungstênio (Figura 7). Estes resultados confirmam a hipótese de que a pesar da navalha de tungstênio ser indicada para corte de materiais mais duros (Molinaro et al., 2010; Williamson, 2015; Suvarna; Layton & Bancroft, 2019), pelo fato da mesma ser mais grossa em espessura, as estruturas internas dos cabelos estariam sendo danificadas durante o corte.

Figura 7- Micrografias eletrônicas de secções histológicas de fios de cabelos em meio de inclusão O.T.C. Aumento de 3000X. A) cabelo natural na espessura de 8µm, navalha de aço; B) cabelo natural na espessura de 8µm, navalha de tungstênio; C) cabelo descolorido na espessura 8 µm, navalha de aço; D) cabelo descolorido na espessura 8 µm, navalha de tungstênio.



CONCLUSÃO

A avaliação da morfologia interna de fios de cabelo a traves de imagens, requer que sejam obtidas imagens ultrafinas das seções transversais dos fios com alta qualidade e conservação da estrutura interna; no entanto a obtenção deste tipo de cortes possui uma alta complexidade já que a qualidade do corte depende não só do material e espessura da navalha utilizada para realizar os cortes como também do meio de inclusão no qual são embebidos os cabelos. Neste estudo foram estudados 5 tipos de meios de inclusão e dois tipos de navalha, com o intuito de encontrar a melhor combinação meio/navalha. Os resultados mostraram que ao incluir os cabelos em resinas duras tanto comerciais como não comercias, e posterior corte com navalha de tungstênio em temperatura ambiente, a estrutura interna dos fios foi quebrada, resultando em imagens com fraturas; estas fraturas podem ser devido à interação da resina com o cabelo, pela passagem da navalha na hora do corte ou por uma combinação de ambos fatores. Partindo para a inclusão dos cabelos em materiais com menor dureza, foram realizados cortes em baixa temperatura (-30°C) utilizando composto O.T.C como meio de inclusão e navalha de aço e tungstênio; os cortes realizados com navalha de aço resultaram numa melhor conservação da estrutura interna do fio o qual foi constatado pela microscopia eletrônica de varredura (MEV).

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), processo 2023/00155-6, pelo suporte financeiro para realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

Baptista, M. S. & Bastos, E. L. Fluorescence in Pharmaceutics and Cosmetics. Flourescence in industry. Chapter: Part of the Springer Series on Fluorescence book series, v. 18, 2019.

Brown, T. A.; Fetter, R. D.; Tkachuk, A. N. & Clayton, D. A. Approaches toward super-resolution fluorescence imaging of mitochondrial proteins using PALM. Methods, v. 51, n. 4, p. 458 - 63, 2010.

Costa, A. M.; Silva, M. C. & Oliveira, J. 2009. Guia de Histologia. Projecto NeoMav – IPIMAR. Lisboa. 16 p.

Dario, M. F.; Pahll, R.; Castro, J. R.; Lima, S. F.; Kaneko, T. M.; Pinto, C. A. S. O.; Baby, A. R. & Velasco, M. V. R. Efficacy of Punica granatum L. hydroalcoholic extract on properties of dyed hair exposed to UVA radiation. Journal of Photochemistry and Photobiology, v. 120, p. 142 – 147, 2013.

Ding, H.; Zhao, H.; Zhao, X.; QI, Y.; Wang, X. & Huang, D. Analysis of histology and long noncoding RNAs involved in the rabbit hair follicle density using RNA sequencing. BMC Genomics, v. 22, n. 89, p. 1 – 10, 2021.

Fernandes, C.; Medronho, B.; Alves, L. & Rasteiro, M. G. On Hair Care Physicochemistry: From Structure and Degradation to Novel Biobased Conditioning Agents. Polymers, v. 15, n. 3, p. 608, 2023.

Grassin-Delyle, S.; Martin, M.; Hamzaoui, O.; Lamy, E.; Jayle, C.; Sage, E.; Etting, I.; Devillier, P. & Alvarez, J. C. A high-resolution ICP-MS method for the determination of 38 inorganic elements in human whole blood, urine, hair and tissues after microwave digestion. Talanta, v. 99, n. 1, p. 228 – 237, 2019.

Harland, D. P.; Walls, R. J.; Vernom, J. A.; Dyer, J. M.; Woods, J. L. & Bell, F. Three-dimensional architecture of macrofibrils in the human scalp hair Córtex. Journal of Structural Biology, v. 185, n. 3, p. 397 – 404, 2014.

Hill, V.; Loni, E.; Cairns, T.; Sommer, J. & Schaffer, M. Identification and analysis of damaged or porous hair. Drug Testing and Analysis, v. 6, p. 42 – 54, 2014.

Junqueira, L. C. & Carneiro, C. Histologia Básica, 14. ed: Guanabara Koogan, 2023, 600p.

McMullen, R. L.; Gillece, T. & Schiess, T. Physicochemical Properties of Textured Hair. Journal of Cosmetic Science, v. 72, p. 711 - 731, 2021.

Molinaro, E. M.; Caputo, L. F. G. & Amendoeira, M. R. R. Conceitos e Métodos para a Formação de Técnicos em Laboratórios de Saúde. Fundação Oswaldo Cruz, v. 2, 2010, 290p.

Moreira, D. S. & Lins, U. G. C. Microscopy techniques for quantification and identification of micro-organism. Saúde & Ambiente em Revista, v. 5, n. 2, p. 01-11, 2010.

Nelson, D. L.; Cox, M. M. & Hoskins, A. A. Princípios de bioquímica de Lehninger. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2022, 1248p.

Newman, G. R. & Hobot, J. A. Resin microscopy and on-section immunohistochemistry (2nd ed.). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2001, p. 221, ISBN 3-540-56429-2. E28.00.

Ponz, E.; Ladaga, J. L. & Bonetto, R. D. Measuring Surface Topography with Scanning Electron Microscopy. I. EZEImage: A Program to Obtain 3D Surface Data. Microscopy and Microanalysis, v.12, n. 2, p. 170 – 177, 2006.

Prentø, P. Staining of macromolecules: possible mechanisms and examples. Biotechnic & Histochemistry, v. 84, n. 4, p. 139 – 158, 2009.

Saccardo, L. A. C. & Silvia, R. H. Possible damages and toxicities in incompatibility of capillary chemicals. Research, Society and Development, v. 11, n. 4, p. 1 - 11, 2022.

Sousa, A. L.; Lóios, J. R.; Faísca, P. & Tranfield, E. M. Chapter 2 - The Histo - CLEM Workflow for tissues of model organisms. Methodos in Cell Biology, v. 162, p. 13 – 37, 2021.

Suvarna, S. K.; Layton, C. & Bancroft, J. D. Bancroft's theory and practice of histological techniques. Eighth edition, Elsevier, Limited, ISBN: 978-0-7020-6864-5, 2019, 557p.

Rubin, A. C. V. Avaliação de metaloestrógenos em cabelo de mulheres com câncer de mama por la-icp-ms. Dissertação apresentada ao Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), 2021, 91p.

Titford, M. A Short History of Histopathology Technique. The Journal of Histotechnology I, v. 29, n. 2, p. 99 - 110, 2006.

Tomes, C.; Jones, J. T.; Carr, C. M. & Jones, D. Three-dimensional imaging and analysis of the surface of hair fibres using scanning electron microscopy. International Journal Cosmetic Science v. 29, n. 4, p. 293-9, 2007.

Wagner, R. C. C. A estrutura da medula e sua influência nas propriedades mecânicas e de cor do cabelo. Tese de doutorado apresentada a Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, 2006, 84p.

Yu, M. & Zhang, J. Serum and Hair Nickel Levels and Breast Cancer: Systematic Review and Meta-Analysis. Biological Trace Element Research, v. 179, p. 32–37, 2017.

Wei, G.; Bhushan, B. & Torgerson, P. M. Nanomechanical characterization of human hair using nanoindentation and SEM. Ultramicroscopy, v. 105, p. 248 – 266, 2005.

Williamson, R. A. Histological preparation of teeth and tooth growth. Archives of oral and dental research, n. 2, v. 2, p. 2015.