



MATHEUS PAVANI

**PERSISTÊNCIA DE FRAGRÂNCIA EM CABELO: INFLUÊNCIA DAS
PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E DA ENCAPSULAÇÃO
DE ÓLEO ESSENCIAL**

CAMPINAS

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

MATHEUS PAVANI

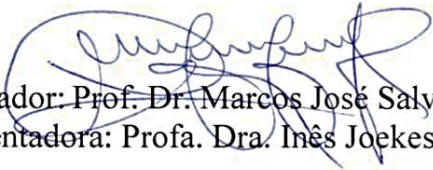
“Persistência de fragrância em cabelo: influência das propriedades físico-químicas e da encapsulação de óleo essencial”

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação defendida pelo candidato

Matheus Pavani

e aprovada pela Comissão Examinadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da UNICAMP para obtenção do Título de Mestre em Ciências, na área de Fármacos, Medicamentos e Insumos para Saúde.



Orientador: Prof. Dr. Marcos José Salvador
Coorientadora: Profa. Dra. Inês Joekes

CAMPINAS,
2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

P288p	<p>Pavani, Matheus, 1989- Persistência de fragrância em cabelo : influência das propriedades físico-químicas e da encapsulação de óleo essencial / Matheus Pavani. – Campinas, SP: [s.n.], 2014.</p> <p>Orientador: Marcos José Salvador. Coorientador: Inés Joekes. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Polimerização <i>in situ</i>. 2. Microextração em fase sólida. 3. Cromatografia gasosa-espectrometria de massas. 4. Cosméticos. I. Salvador, Marcos José, 1971-. II. Joekes, Inés, 1946-2013. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.</p>
-------	--

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Persistence of fragrance in human hair : role of physicochemical properties and encapsulation of perfume oil

Palavras-chave em Inglês:

In situ polymerization
Solid phase microextraction
Gas chromatography-mass spectrometry
Cosmetics

Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos para Saúde

Titulação: Mestre em Ciências

Banca examinadora:

Marcos José Salvador [Orientador]
Terezinha de Jesus Andreoli Pinto
Laura de Oliveira Nascimento

Data da defesa: 14-02-2014

Programa de Pós Graduação: Biotecnologia e Tecnologia de Produtos Bioativos

Campinas, 14 de fevereiro de 2014.

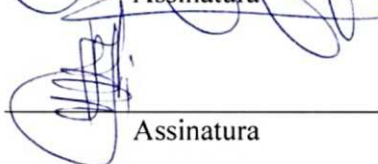
COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcos José Salvador



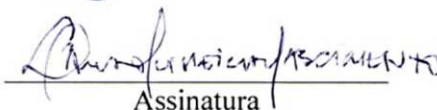
Assinatura

Profa. Dra. Terezinha De Jesus Andreoli Pinto



Assinatura

Profa. Dra. Laura De Oliveira Nascimento



Assinatura

Prof. Dr. Paulo Cesar Pires Rosa

Assinatura

Dra. Cintia Maria Saia Cereda

Assinatura

Este trabalho de pesquisa foi financiado pela
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).
Processo: 2012/02662-8.

PERSISTÊNCIA DE FRAGRÂNCIA EM CABELO: INFLUÊNCIA DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E DA ENCAPSULAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL

Dissertação de Mestrado de Matheus Pavani

Orientador: Prof. Dr. Marcos José Salvador / Co-orientadora: Profa. Dra. Inés Joekes (*In Memoriam*)

Instituto de Biologia – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

CEP 13083-862, Campinas – SP – Brasil

RESUMO

A fragrância de um produto cosmético é um aspecto importante para determinar seu desempenho. É crescente o emprego de produtos naturais, bem como de fragrâncias encapsuladas na indústria cosmética. Entretanto, há escassos estudos descrevendo o perfil de liberação de fragrâncias a partir de matrizes complexas, muito menos a partir de cabelos. Este trabalho investigou a interação de uma fragrância livre ou encapsulada em cabelos virgens caucasianos. Óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* DC. Stapf), livre ou encapsulado, foi empregado como fragrância em formulações de xampu e condicionador sem enxágue. O processo de encapsulação deu-se por meio de polimerização *in situ* da resina de melamina-formaldeído, variando-se parâmetros reacionais como velocidade de agitação, acidificação do meio e teor de óleo essencial. Os perfis de liberação da fragrância proveniente de mechas de cabelo, tratadas com as formulações obtidas, foram tomados ao longo do tempo (0 a 12 h), com amostragem por microextração em fase sólida (SPME) e análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS). A liberação das substâncias da fragrância na forma livre variou em função do tipo de formulação cosmética (xampu ou condicionador sem enxágue). Neste caso, a persistência delas na fibra capilar se correlacionou com seus valores de coeficiente de partição óleo-água ($\log P$). Micropartículas esféricas ($d_H = 9 \pm 1 \mu\text{m}$) e rendimento de processo de 86 % foram obtidos com decaimento lento de pH aliado a agitação vigorosa durante a reação de formação. Estas partículas promoveram liberação sustentada para os constituintes linalol e citral (12 e 2 vezes mais duradoura em relação à forma livre, respectivamente), mostrando um aumento da persistência da fragrância encapsulada quando inserida em formulação sem enxágue, e modificando as forças de interação cabelo–fragrância.

Palavras-chave: polimerização *in situ*, microextração em fase sólida, cromatografia gasosa–espectrometria de massas, cosméticos.

**PERSISTENCE OF FRAGRANCE IN HUMAN HAIR:
ROLE OF PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES AND ENCAPSULATION OF
PERFUME OIL**

Master Thesis of Matheus Pavani

Advisor: Prof. Dr. Marcos José Salvador / Co-advisor: Profa. Dra. Inés Joekes (*In Memoriam*)

Institute of Biology – University of Campinas (UNICAMP)

13083-862, Campinas – SP – Brazil

ABSTRACT

Fragrance plays an important role in the performance of a cosmetic formulation. The use of natural products in the cosmetic industry as well as encapsulated fragrances is growing. However, there are few studies describing the release profile of fragrances from complex matrices, much less from Human hair. This work investigates the interaction of a fragrance composition (free or encapsulated) with un-treated Caucasian hair. Lemongrass essential oil (*Cymbopogon citratus* DC. Stapf) was employed as fragrance in rinse-off shampoo or leave-on formulations. Encapsulation was performed by *in situ* polymerization of melamine and formaldehyde monomers, changing reaction parameters such as stirring rate, pH decay, and essential oil content. Fragrance release profiles from the hair tresses treated with the abovementioned formulations were acquired over the time (0 to 12 h) with a solid phase microextraction (SPME) device, and analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The release of free form fragrance constituents depended on the type of cosmetic formulation (shampoo or leave-on), but its persistence on hair fiber was correlated with its oil-water partition coefficient ($\log P$) value in both cases. Spherical microparticles ($d_H = 9 \pm 1 \mu\text{m}$) and 86 % yield were obtained with slow pH decay combined with vigorous stirring during the encapsulation process. Sustained release of the fragrant components linalool and citral (12 times and twice longer-lasting compared to the free form, respectively) was found, showing an increased persistence of the encapsulated fragrance when inserted in the leave-on formulation and changing perfume–hair interaction.

Palavras-chave: *in situ* polymerization, solid phase microextraction, gas chromatography–mass spectrometry, cosmetics.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	xix
LISTA DE FIGURAS	xxi
LISTA DE TABELAS	xxiii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xxv
I. INTRODUÇÃO.....	1
1. Cabelo	1
1.1 Persistência de fragrância em cabelos	3
2. Fragrâncias	4
2.1 Óleos essenciais em perfumaria	7
3. Análises de fragrâncias	8
3.1 Microextração em fase sólida (SPME).....	9
4. Sistemas carreadores e encapsulação de ativos	11
4.1 Sistemas carreadores de fragrâncias.....	11
4.2 Polimerização <i>in situ</i>	12
II. JUSTIFICATIVA	17
III. OBJETIVO.....	19
IV. EXPERIMENTAL.....	21
1. Materiais e reagentes.....	21
1.1 Cabelo.....	21
1.2 Fragrância	21
1.3 Padrões analíticos.....	21
1.4 Encapsulação.....	22
1.5 Outros reagentes.....	22
1.6 Outros materiais	22
2. Equipamentos	22
2.1 Coleta de voláteis	22
2.2 Análises cromatográficas.....	23
2.3 Ensaios com micropartículas	23

3.	Métodos.....	24
3.1	Análises por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) 24	
3.2	Caracterização dos constituintes voláteis do óleo essencial.....	24
3.3	Obtenção do óleo essencial encapsulado.....	25
3.4	Caracterização das partículas obtidas e percentual de encapsulação.....	27
3.5	Formulações.....	30
3.6	Cabelos.....	31
3.7	Perfis de liberação.....	32
V.	RESULTADOS.....	37
1.	Obtenção do óleo essencial encapsulado.....	37
1.1	Morfologia.....	38
1.2	Tamanho de partícula.....	42
1.3	Percentual de encapsulação e rendimento.....	46
2.	Caracterização dos constituintes do óleo essencial de capim-limão, de sua fração volátil e da fração encapsulada.....	48
2.1	Constituintes do óleo essencial de capim-limão.....	48
2.2	Constituintes do óleo essencial de capim-limão que foram encapsulados.....	51
2.3	Fração volátil do óleo essencial de capim-limão.....	52
3.	Perfis de liberação.....	55
3.1	Mechas tratadas com formulações contendo fragrância pura.....	55
3.2	Mechas tratadas com condicionador sem enxágue contendo fragrância encapsulada.....	59
3.3	Mechas tratadas com xampu contendo fragrância encapsulada.....	63
VI.	DISCUSSÃO.....	65
1.	Perfis de liberação.....	65
VII.	CONCLUSÕES.....	73
VIII.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	75
IX.	REFERÊNCIAS.....	77
	ANEXOS.....	85

*Aquilo que hoje está provado
não foi outrora mais do que imaginado.*
(William Blake)

*O saber a gente aprende com os mestres e os livros,
A sabedoria se aprende é com a vida e com os humildes.*
(Cora Coralina)

*A ela,
força e irreverência
em vulto humano e consciente.*

*A ela,
cujo conhecimento foi o maior legado
e cujos exemplos permanecerão vivos
na essência de seus legatários.*

À eterna Inés

AGRADECIMENTOS

À Inés Joeques, por ter deixado impresso em mim seus exemplos, ensinamentos e experiências, que me mostram que sou capaz e me encorajam a nunca desistir.

Ao professor Marcos Salvador, pela liberdade concedida e pela confiança.

À minha família, pela preocupação, cuidado e exemplo. À minha mãe, Elza, pelos questionamentos que só me fizeram confirmar as minhas escolhas; ao meu pai, José Augusto, que me ensinou que sabedoria se adquire com humildade; e ao meu irmão, Klaus, meu exemplo de disciplina e foco.

Ao Humberto Bersani, exemplo de dedicação, pelo convívio e apoio incondicional. Sem você, este sonho não teria se concretizado.

Aos meus irmãos por opção. À Anita Macedo, pela dose diária de alegria e entusiasmo; ao Vinicius Arruda, pelos aprendizados e companheirismo; e à Suzy Krimon e ao Alysson Moraes que, mesmo estando longe, estiveram sempre presentes. A vocês, obrigado por me incentivarem e me encorajarem a seguir em frente.

Aos companheiros do laboratório da Profa. Inés. À Scheila Alves, pela troca de experiências e pelo apoio; ao Rafael Pires pelo aprendizado e pelas discussões científicas; à Marina Richena, por toda força e preocupação; ao André Médice, pelas conversas sobre o olfato. Pelo convívio alegre e pelos cafés, agradeço à Aline Dalmolin, à Natália Tetzner, à Marina Novelli, à Vivi Moraes e ao Pedro Cominal. Obrigado pela companhia nos momentos alegres e pela ajuda nos períodos difíceis.

À Flávia Nakamura e à Renata Brugliato, por terem dado início à pesquisa de persistência de fragrância em cabelos.

À Carol Nogueira, ao Roberto (Zuca) Zucchetti, ao Atílio Cardoso e à Nadia Segre pelos conselhos, apoio e suporte.

Aos colegas do departamento de Biologia Vegetal, em especial à Begoña Gimenez, com quem dividi ansiedades e alegrias, à Carol Caramano, à Aislan Fagundes, à Camila Sacco, à Sarinha Ribeiro e ao Carlos pelas conversas, aprendizado, risadas e bandejões.

Aos amigos de graduação que permaneceram presentes, em especial ao Gabriel Feltran, à Cecília Amstalden, à Ju Karasawa e à Larissa Dantas e também à vizinha Raquel Santos. Valeu pelo incentivo!

Ao apoio dos queridos Marcondes, Maria Helena, Jaqueline e Jéssica Bersani e da Odete e Carlos Macedo. Obrigado por torcerem por mim.

Aos amigos que estiveram presente e que tornaram este período mais alegre, agradeço ao Davi Firmo, ao Léo Barros, à Ju, Cris e Camilinha Fonseca, ao Gu e Amanda Novaes.

Aos professores do curso de Farmácia, em especial ao Rodrigo Catharino, à Priscila Mazzola, à Patrícia Moriel, ao Marcelo Lancelotti, e também aos professores Marili e Rodney Rodrigues e à Mary Ann Foglio. Obrigado pelas experiências, oportunidades e pela confiança.

Pelo suporte dos professores Edvaldo Sabadini e Marcelo Ganzarolli. Pelo auxílio e apoio científico, agradeço aos professores Ladaslav Sodek, Celso Bertran, Claudia Haddad, Alexandra Sawaya, Eneida de Paula, Teresinha de Jesus, Laura Nascimento e também à Cintia Cereda, ao Carlos Perles, ao Carlos Fidelis e à Giovana Bataglion.

Às técnicas Denise e Néia, pela simpatia; ao pessoal da secretaria de pós-graduação do Instituto de Biologia, em especial ao Rafael; e a todos os funcionários do Instituto de Química e do Instituto de Biologia.

À FAPESP, pelo suporte financeiro concedido a este trabalho.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Representação esquemática da estrutura morfológica de um fio de cabelo e de seus constituintes principais.1
- Figura 2. Estruturas químicas de geraniol e nerol, isômeros *cis-trans* produzidos durante a síntese de geraniol para indústria de fragrâncias.5
- Figura 3. Estruturas químicas dos isômeros *cis* e *trans* do citral. Neral e geraniol são os constituintes majoritários do óleo essencial de capim-limão.8
- Figura 4. Sequência de análise por microextração em fase sólida (SPME) e modos de extração utilizados: amostragem direta (DI-SPME) e amostragem de *headspace* (HS-SPME). 10
- Figura 5. Sequência de análise por microextração em fase sólida (SPME) e modos de extração utilizados: amostragem direta (DI-SPME) e amostragem de *headspace* (HS-SPME)..... 13
- Figura 6. Reações químicas e representações esquemáticas das etapas do procedimento de encapsulação em resina de melamina formaldeído (M-F) por polimerização *in situ*..... 14
- Figura 7. Curva analítica da razão de áreas cromatográficas entre os picos de citral e o pico de octadecano em função de concentrações conhecidas de padrão de citral, utilizada para quantificação de óleo essencial encapsulado..... 29
- Figura 8. Perfil de extração das cápsulas contendo óleo essencial de capim-limão relacionando razão de áreas cromatográficas entre os picos de citral e o pico de octadecano em função do tempo de sonicação das partículas em hexano. 29
- Figura 9. Área cromatográfica dos picos de citral em função do tempo de exposição da fibra de extração ao *headspace* das mechas de cabelo tratadas com xampu ou condicionador sem enágue contendo citral a como fragrância..... 33
- Figura 10. Área cromatográfica dos picos de citral em função da concentração de citral nas formulações de xampu e condicionador sem enxágue após aplicação em mechas de cabelo, amostragem por SPME seguida de dessorção em cromatógrafo gasoso, e análise por GC-MS 34
- Figura 11. Aparência das suspensões contendo partículas de resina de melamina-formaldeído contendo óleo essencial de capim-limão encapsulado, obtidas por polimerização *in situ*, variando-se parâmetros reacionais..... 39
- Figura 12. Fotomicrografias ópticas das partículas de melamina-formaldeído (M-F) contendo óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus*), obtidas por polimerização *in situ*, variando-se parâmetros reacionais. 40
- Figura 13. Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) das cápsulas contendo óleo essencial de capim-limão, sintetizadas pelo método de polimerização *in situ* do aduto melamina-formaldeído (M-F), variando-se a velocidade de

acidificação do meio durante o processo em decaimento suave de pH do meio ou decaimento abrupto.....	42
Figura 14. Distribuições de diâmetro hidrodinâmico obtidas por difração de <i>laser</i> para partículas de óleo essencial de capim-limão, obtidas por polimerização <i>in situ</i>	44
Figura 15. Distribuição de diâmetro hidrodinâmico realizada por difração de <i>laser</i> para emulsão de óleo essencial de capim-limão.....	46
Figura 16. Perfis cromatográficos do óleo essencial de capim-limão puro e do conteúdo das partículas sintetizadas extraído com hexano e sonicação por 90 min, ambos obtidos por GC-MS.....	50
Figura 17. Perfis cromatográficos da fração volátil (<i>headspace</i>) em sistema fechado imediatamente após a inserção do óleo volátil em <i>vial</i> e após 24 h, obtidos por GC-MS..	53
Figura 18. Perfis de liberação dos constituintes do óleo essencial de capim-limão incorporado em formulações após aplicação de xampu e condicionador sem enxágue em mechas de cabelo.....	58
Figura 19. Perfis de liberação de fragrância provenientes das mechas de cabelo tratadas com formulações de condicionador sem enxágue contendo óleo essencial puro ou encapsulado submetidas à penteamento entre as análises ou não.....	60
Figura 20. Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de fios de cabelo sem tratamento ou tratados com condicionador sem enxágue contendo óleo essencial de capim-limão encapsulado como fragrância, não penteados ou penteados.....	62
Figura 21. Perfis de liberação de fragrância provenientes das mechas de cabelo tratadas com formulações de xampu contendo óleo essencial puro ou encapsulado.....	64
Figura 22. Estruturas moleculares das substâncias majoritárias identificadas no óleo essencial de capim-limão.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação de Kraft de famílias olfativas e as principais notas que as constitui.	6
Tabela 2. Variáveis avaliadas durante a reação de polimerização <i>in situ</i> para obtenção de óleo essencial de capim-limão encapsulado em polímero de melamina-formaldeído.	27
Tabela 3. Ingredientes empregados como fragrâncias nas formulações base de xampu e condicionador sem enxágue, e faixas de concentração utilizadas.	30
Tabela 4. Variáveis avaliadas na verificação do tempo de equilíbrio para técnica de microextração em fase sólida (SPME).	33
Tabela 5. Variáveis avaliadas na verificação do perfil de extração para técnica de microextração em fase sólida (SPME).	34
Tabela 6. Variáveis do processo de encapsulação do óleo essencial de capim-limão (<i>C. citratus</i>), empregadas na análise de morfologia e tamanho de partícula.	38
Tabela 7. Diâmetro hidrodinâmico médio (quintuplicata de medida) baseado em % volume obtido por difração de <i>laser</i> para partículas de óleo essencial de capim-limão (<i>C. citratus</i>), sintetizadas por polimerização <i>in situ</i> (vide Tabela 5).	43
Tabela 8. Dados utilizados para o cálculo de percentual de encapsulação de óleo essencial.	47
Tabela 9. Dados utilizados para o cálculo de rendimento de óleo essencial no processo de encapsulação.	47
Tabela 10. Substâncias presentes no óleo essencial capim-limão (<i>Cymbopogon citratus</i>). 49	
Tabela 11. Comparação entre as proporções dos constituintes do óleo essencial de capim-limão (<i>Cymbopogon citratus</i>) e da fração encapsulada em envoltório de melamina-formaldeído, analisada por GC-MS.	51
Tabela 12. Comparação das proporções das substâncias presentes no óleo essencial de capim-limão (<i>Cymbopogon citratus</i>) e de seu <i>headspace</i> imediatamente após a colocação do óleo volátil em <i>vial</i> fechado e após 24 h.	54
Tabela 13. Substâncias provenientes do óleo essencial de capim-limão, retidas em mechas de cabelo após tratamento com xampu ou condicionador sem enxágue contendo o óleo volátil como fragrância.	56
Tabela 14. Propriedades físico-químicas das substâncias identificadas no óleo essencial de capim-limão (<i>Cymbopogon citratus</i> , DC. Stapf).	66
Tabela 15. Percentual de decaimento de áreas para os componentes <i>cis</i> e <i>trans</i> -citrál, liberados a partir de mechas de cabelo tratadas com condicionador sem enxágue contendo óleo essencial de capim-limão como fragrância.	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CMC: complexo de membrana celular

CTAB: brometo de hexadecil trimetil amônio

d_H : diâmetro hidrodinâmico

F: formaldeído

FCC: *Food Chemicals Codex*

GC-MS: cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

H : altura

INCI: *International Nomenclature for Cosmetic Ingredients*

IR : índice de retenção

L : comprimento

LESS: lauril éter sulfato de sódio

$\log P$: coeficiente de partição octanol-água

M: melamina

M-F: resina de melanina-formaldeído

NaBr: brometo de sódio

NaOH: hidróxido de sódio

NIST: *National Institute of Standards and Technology*

osc: oscilações

PDMS: poli dimetil siloxano

ppm: partes por milhão

ppb: partes por bilhão

qsp: quantidade suficiente para

$R\%$: rendimento

rpm: rotações por minuto

SDS: dodecil sulfato de sódio

SPME: microextração em fase sólida

T: temperatura

TR: tempo de retenção

USP: *United States Pharmacopeia*

V: volume

∅: diâmetro

I. INTRODUÇÃO

1. Cabelo

O cabelo é constituído principalmente de queratina, proteína resistente e insolúvel [1]. A característica que a distingue de outras proteínas é seu alto teor de enxofre devido à presença do aminoácido cisteína em sua composição [2]. A cisteína forma uma rede de ligações dissulfídicas, responsáveis pela resistência mecânica e química do fio de cabelo [3].

O fio de cabelo pode ser dividido em quatro componentes principais: cutícula (ca. 10 % em massa da fibra), córtex (ca. 88 %), complexo de membrana celular (CMC) (ca. 2 %) e medula. A localização destes componentes na fibra capilar e a sua composição encontram-se destacados na Figura 1.

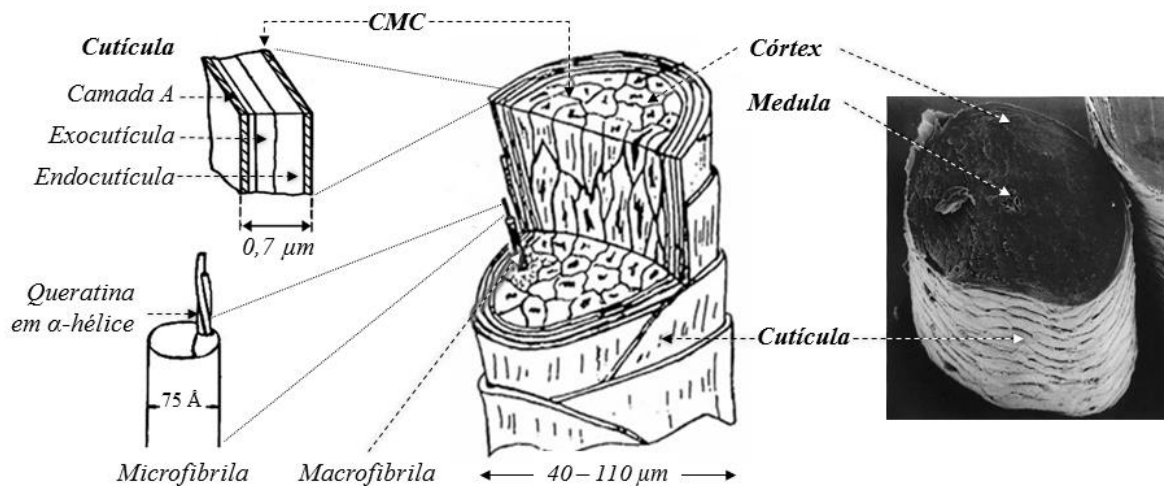


Figura 1. Representação esquemática da estrutura morfológica de um fio de cabelo (centro) e de seus constituintes principais: cutícula, córtex, complexo de membrana celular (CMC) e medula (em negrito). Um corte transversal deste material, obtido por microscopia eletrônica de varredura (MEV), é mostrado à direita. À esquerda, encontram-se destacados uma célula cuticular (acima) e uma microfibrila (abaixo). Adaptado de Robbins [4].

Cutícula

A cutícula constitui a região mais externa do fio de cabelo e é formada pela sobreposição de camadas de material proteico e amorfo, denominadas células cuticulares. Responsáveis pela proteção das células corticais, as células cuticulares oferecem resistência

física, estabelecendo uma barreira à difusão de moléculas de alta massa molecular para o interior da fibra [5]. Cada cutícula é dividida em três subestruturas (Figura 1), a saber:

- a. *Camada A*: região mais externa, quimicamente resistente e hidrofóbica, uma vez que é composta por material altamente reticulado (alto teor de ligações dissulfeto) e recoberto por ácido graxo (ácido 18-metil eicosanóico ou 18-MEA) [6].
- b. *Exocutícula*: se localiza abaixo da camada A; é também reticulada, o que lhe confere caráter hidrofóbico.
- c. *Endocutícula*: possui composição não queratinosa, com teor elevado de aminoácidos ácidos e básicos e com baixa concentração de cistina, possuindo um caráter hidrofílico [4].

Córtex

O córtex é o maior constituinte em massa da fibra capilar. É formado pelas células corticais, orientadas na direção do fio, constituídas por macro e micro fibrilas de α -queratina, o que confere ao cabelo propriedades elásticas e de resistência mecânica (Figura 1) [7]. Distribuindo-se aleatoriamente no córtex, estão os grânulos de melanina, cujo tipo, tamanho e quantidade determinam a cor do cabelo.

Complexo de membrana celular (CMC)

O CMC é um material cimentante, localizado na região onde as cutículas se sobrepõem e entre as macrofibrilas no córtex. É formado a partir de remanescentes celulares não queratinizados [6]. Assim como outros componentes não queratinosos, forma o maior caminho contínuo para a difusão de substâncias na fibra [4].

Medula

A medula encontra-se no interior do córtex, podendo estar presente ou ausente ao longo do fio. É formada por uma estrutura porosa, cuja concentração de lipídio é maior que em qualquer outra estrutura do cabelo, podendo indicar sua relação com a plasticidade da fibra [8].

1.1 Persistência de fragrância em cabelos

O objetivo dos xampus e condicionadores não é somente o de limpeza e retirada de sujidades dos cabelos, mas também o de embelezá-los e perfumá-los. Este conceito se enquadra na definição de saúde como “um estado de bem-estar físico, mental e social e não apenas a ausência de doença” [9]. Neste sentido, a fragrância é um parâmetro importante para determinar o desempenho de produtos para uso capilar.

Formulações de xampus e condicionadores baseiam-se em uma mistura de tensoativos, água e outros ingredientes minoritários, como espessantes, conservantes e fragrância [10]. Os tensoativos aniônicos, anfotéricos e não-iônicos são utilizados em xampus, enquanto que os catiônicos, em condicionadores [4]. Embora os tensoativos sejam eficazes na solubilização de fragrâncias, tem sido demonstrado que eles diminuem a intensidade de seu odor proporcionalmente ao aumento de sua concentração na formulação [11].

A natureza, qualidade e concentração dos tensoativos e outros materiais, como agentes condicionantes, podem afetar as características de odor de um xampu, quer seja por mascaramento, quer seja pela reação química indesejada de seus componentes com os ingredientes da formulação. A adição de fragrância na formulação de xampus, por sua vez, pode alterar sua viscosidade [12].

A persistência de uma fragrância em um substrato, como a pele, ou o cabelo, está relacionada com o período de tempo no qual determinado constituinte pode ser detectado pelo olfato humano, dependendo de sua volatilidade. De maneira geral, quanto menor a volatilidade, maior será a persistência deste constituinte. Entretanto, o comportamento de fragrâncias em matrizes biológicas ainda é pouco explorado na literatura científica.

Vuilleumier e colaboradores [13] investigaram o perfil de liberação de onze substâncias componentes de fragrâncias após aplicação em pele de voluntários: a taxa de evaporação está relacionada com a morfologia da matriz e também com o tipo de base cosmética aplicada à pele.

Poucos estudos com cabelos podem ser encontrados: Blackeway e Seu-salerno [14] estudaram a persistência de fragrância em cabelos, a partir da aplicação de uma solução de lauril éter sulfato de sódio (LESS) contendo sete diferentes matérias-primas. Os autores discutem que o cabelo é capaz de sorver as substâncias da fragrância, que migram da formulação aquosa e interagem com as queratinas da fibra capilar. Dados de nosso Grupo de Pesquisa mostram, ainda, que a quantidade de fragrância liberada decai em função do tempo e que a persistência dos constituintes varia de acordo com a origem étnica do fio de cabelo [15, 16].

2. Fragrâncias

É possível definir uma fragrância como uma substância química – ou, na maioria das vezes, uma mistura delas – que possui características de odor. A palavra “perfume”, do latim *per fumum* (em português, “por meio da fumaça”), remete à queima de incenso realizada pelos sacerdotes da época com intuito de contemplação aos deuses; este termo é empregado neste trabalho com o sentido de “sensação olfativa agradável”.

A descoberta, exploração e utilização de fragrâncias teve início no Egito antigo, entre 4000 e 2000 *a.C.*, tendo conotação exclusivamente religiosa. Aos poucos, as composições perfumadas atingiram um público mais amplo, embora ainda restrito, de faraós, imperadores, conquistadores, monarcas e alquimistas [12].

Desde a Antiguidade, temperos e resinas de fontes animais e vegetais são utilizados para fins de produção de fragrâncias. O uso de óleos essenciais de origem natural na perfumaria teve seu início com o desenvolvimento da técnica de destilação, no século IX. Apenas no século XIX, devido à Revolução Industrial, a produção de fragrâncias pôde ser realizada em larga escala para que, no século XX, alcançasse todas as faixas da população, aumentando a demanda desses ingredientes na indústria e promovendo seu uso [12].

No Brasil, as composições perfumadas foram incorporadas aos costumes nacionais a partir da chegada da corte portuguesa, em 1808. Entretanto, a indústria de higiene e perfumaria, principal utilizadora de fragrâncias, chegou ao Brasil no final do século XIX e a indústria de fragrâncias deu início às suas atividades no século XX [17].

Componentes de fragrâncias

As fragrâncias são utilizadas em formulações de produtos de higiene pessoal, de limpeza, perfumes e cosméticos, para conferir-lhes odor agradável – ou mascarar-lhes os desagradáveis [18]. São misturas voláteis compostas por até 300 substâncias de diferentes estruturas moleculares: alifáticas, aromáticas, alicíclicas ou heterocíclicas possuindo uma variedade de grupos polares como os aldeídos, cetonas, ésteres, alcoóis, fenóis e éteres. Tamanha complexidade reflete em diferentes propriedades físico-químicas, tais como volatilidade, solubilidade, lipofilicidade e reatividade química [19, 20].

As matérias-primas utilizadas pela indústria de fragrâncias podem ser de origem natural ou sintética. As naturais são assim designadas por se tratarem de materiais obtidos de fontes vegetais, animais ou minerais. Plantas inteiras, flores, frutas, sementes, folhas, bem como madeiras, raízes, e resinas exsudadas são utilizadas como matérias-primas de fragrâncias. Os aromas produzidos sinteticamente são, via de regra, primeiro descobertos na natureza e depois sintetizados [21].

A divisão entre as matérias-primas naturais e sintéticas não é delimitada, uma vez que ambas as fontes podem possuir diferenças em suas características de odor e em sua composição química [21]. Por exemplo, o geraniol natural contém traços de outros materiais provenientes da fonte de origem. Já o produto da síntese de geraniol resulta em uma mistura de isômeros, contendo uma grande proporção de nerol (Figura 2), além de outras substâncias não encontradas na natureza, resultando em diferentes perfis odoríferos [20].

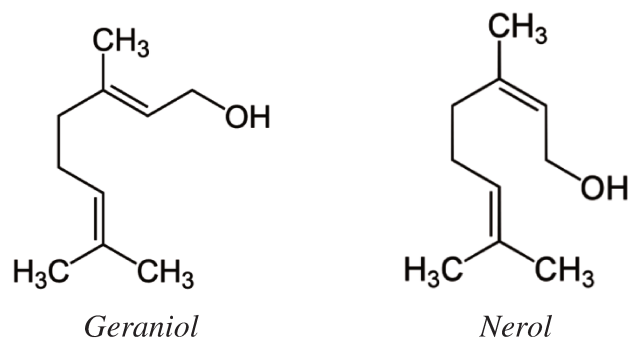


Figura 2. Estruturas químicas de geraniol (esquerda) e nerol (direita), isômeros *cis-trans* produzidos durante a síntese de geraniol para indústria de fragrâncias.

Classificação das fragrâncias

Perfume ou odor são conceitos amplos e complexos, sendo parâmetros subjetivos, pois se relacionam com a percepção olfativa individual. Ao longo do tempo, criaram-se algumas ferramentas para descrever a classificação sensorial (ou perfume) de matérias-primas utilizadas em fragrâncias, com o objetivo de uniformizar a linguagem e facilitar a comunicação e o entendimento.

Uma substância fragrante pode ser classificada de acordo com um odor característico, constituindo uma “nota olfativa”. O geraniol (Figura 2), por exemplo, é atribuído ao odor de rosas; entretanto existem outras substâncias cujo odor também é atribuído ao das rosas, como a benzofenona e o isodecanal. Quando em uma fragrância, estas substâncias são classificadas como “acordes”, pois possuem um odor específico em comum.

Notas olfativas similares podem ser agrupadas em “famílias olfativas”, que caracterizam propriedades olfatórias amplas. Geraniol, jasmone – que possui odor de jasmim – e butil fenil metil-propional – que possui odor de lírio-do-vale – enquadram-se em uma família olfativa denominada “floral”. Uma fragrância pode ser, portanto, classificada dentro de uma ou mais famílias, de acordo com suas propriedades olfatórias dominantes. A Tabela 1 descreve o espectro olfativo, de acordo com a classificação de Kraft e colaboradores [22].

Tabela 1. Classificação de Kraft [22] de famílias olfativas e as principais notas que as constitui.

Família olfativa	Odor dominante	Principais notas olfativas
Almíscarado (musk)	Animálico	Almíscar, castóreo e civeta
Ambarado	Doce, resinoso	Âmbar, âmbar-gris
Amadeirado	Madeiras	Cedro, cipreste, patchuli, sândalo, vetiver
Condimentado	Temperos, especiarias	Anis, baunilha, cardamomo, canela, coentro, cravo, gengibre, pimenta
Floral	Flores brancas e outras flores	Camélia, flor de laranjeira, flor de lótus, gardênia, gerânio, jacinto, jasmim, lavanda, lírio
Frutada	Frutado	Cítricos, frutas vermelhas, maçã, maracujá
Marinho	Aquático, ozônico	Água do mar, calone (melão, pepino), geosmina (chuva)
Verde	Folhas frescas	Basílico, capim-limão, grama, palmarosa, zimbro

As notas também podem ser classificadas de acordo com as taxas de evaporação dos componentes de uma fragrância, caracterizando o modo como o perfume por ela deflagrado será percebido ao longo do tempo após aplicação em um substrato (tecido, pele, cabelo, *etc.*) [23]. Usualmente, uma fragrância é dividida em notas de topo, corpo e fundo:

- a. *Notas de topo:* constituídas pelas substâncias de maior volatilidade, são as primeiras percebidas em uma fragrância e as de menor durabilidade. Alguns exemplos de notas de cabeça são as cítricas, lavanda e eucalipto.
- b. *Notas de corpo:* são notas de volatilidade intermediária, também percebidas de imediato, mas perduram por mais tempo. São as que normalmente dão a característica principal ao perfume. As mais comuns são as notas das famílias floral, frutada, verde e condimentada.
- c. *Notas de fundo:* são as notas de baixa volatilidade, que perduram por muito tempo no substrato [21]. Podem ser resinas de madeiras ou de origem animal.

Ao aplicar uma frarância em um substrato, é possível identificar todas as notas descritas. Entretanto, algumas se sobressaem em relação a outras em determinado tempo de exposição do produto devido a taxas de evaporação distintas existentes entre as substâncias que compõem a fragrância.

2.1 Óleos essenciais em perfumaria

Óleos essenciais são produtos de origem natural e, assim como as fragrâncias, são constituídos de misturas complexas de substâncias voláteis. Estas substâncias, provenientes de metabolismo secundário de vegetais ou animais, possuem caráter lipofílico, apresentam baixa massa molar e possuem odor característico [24]. Os óleos essenciais são empregados principalmente como aromas de produtos alimentícios, componentes de fragrâncias na indústria cosmética, como fármacos em composições farmacêuticas, e solventes e intermediários de reações na indústria química [25].

Óleos essenciais de origem vegetal são produtos obtidos de partes de plantas por meio de destilação por arraste a vapor, por expressão dos pericarpos – no caso dos frutos cítricos –, ou por extração com gorduras pela técnica de *enfleurage*. Além dos óleos voláteis de fontes naturais (fitogênicos), existem produtos sintéticos, que podem ser imitações dos naturais ou composições de fantasia. Para uso com fins de aplicações farmacêuticas, somente os óleos essenciais fitogênicos são permitidos pelas Farmacopéias, exceção feita aos óleos que contêm somente uma única substância, como o caso do óleo essencial de baunilha, constituído por vanilina [24].

Com o desenvolvimento da química fina e de tecnologias analíticas de separação e isolamento de substâncias, os óleos essenciais puderam ser substituídos por alguns constituintes sintéticos [20]. Apesar disto, atualmente, mais de 250 tipos de óleos voláteis correspondem a um faturamento médio no mercado mundial de cerca de US\$ 1,2 bilhão/ano. O Brasil tem lugar de destaque na produção de óleos essenciais, ao lado da Índia, China e Indonésia, considerados os quatro grandes produtores mundiais [26].

Capim-limão (Cymbopogon citratus DC. Stapf)

Dentre as espécies que se destacam na produção mundial de óleos essenciais, encontram-se as do gênero *Cymbopogon*, distribuído em regiões tropicais e subtropicais da Terra. Muitas de suas espécies são empregadas como aromas e fragrâncias na forma de óleo volátil. A espécie *Cymbopogon winterianus*, popularmente conhecida como citronela, está entre os cinco principais óleos essenciais no mercado mundial em termos de volume de produção – cerca de três toneladas ao ano [26].

A espécie *Cymbopogon citratus* DC. Stapf, popularmente conhecida como capim-limão ou capim-santo, foi bastante estudada quanto à caracterização química de seu óleo essencial, dada sua importância na indústria cosmética e farmacêutica. Seu óleo volátil comercial é produzido principalmente no Nordeste do Brasil, sendo empregado como fragrância no preparo de colônias, sabonetes e desodorantes. Entretanto, a maioria dos estudos com este óleo está relacionada à sua caracterização química e suas atividades biológicas, como anti-inflamatória, antibacteriana e antifúngica [27].

O citral – mistura racêmica de *trans*-citral (geranial) e *cis*-citral (neral) – é o constituinte majoritário do óleo essencial de capim-limão, e também o maior responsável pelo seu odor, classificado como “verde, fresco e adocicado de limão”. *Cis*-citral possui odor suave e adocicado de limão, enquanto que seu isômero *trans*, odor cítrico e intenso de limão [28, 29]. O citral é instável frente ao calor, luz e oxigênio, assim como ao pH ácido, que favorece a ciclização da molécula, resultando em compostos de odor desagradável [30, 31]. A Figura 3 mostra a estrutura química dos isômeros de citral.

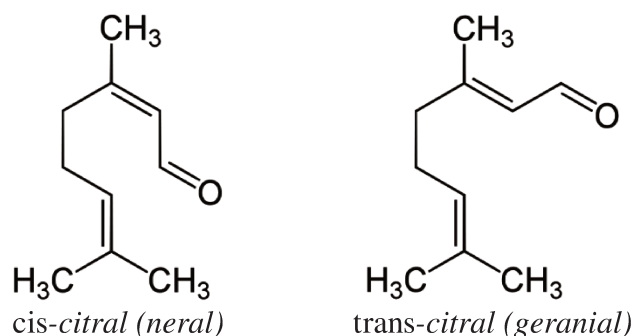


Figura 3. Estruturas químicas dos isômeros *cis* e *trans* do citral. Neral (esquerda) e geranial (direita) são os constituintes majoritários do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus*).

3. Análises de fragrâncias

Para iniciar uma percepção sensorial, uma molécula odorante deve se volatilizar a partir de sua matriz de aplicação e interagir com os receptores nasais humanos [32]. A resposta de odor também depende do limiar de percepção da molécula (chamado de *threshold*), que é geralmente muito baixo. Como consequência, os analitos de uma fragrância encontram-se, geralmente, em concentrações muito pequenas – muitas vezes abaixo dos níveis de *ppm* ou mesmo *ppb*. Além disso, estes analitos possuem uma vasta gama de polaridades, solubilidades, volatilidades e estabilidades térmica e ao pH, o que torna, muitas vezes, a análise de compostos voláteis um desafio [33]. Dessa forma, são necessários métodos sensíveis e seletivos para extração e concentração de substâncias voláteis e que auxiliem na análise de fragrâncias.

A separação de produtos voláteis foi facilitada com o advento da cromatografia gasosa (GC). Quando acoplada aos detectores de espectrometria de massas (GC-MS) ou olfatométrica (GC-O), a cromatografia gasosa passou a ser uma técnica robusta para a avaliação de odor dos ingredientes ativos em misturas complexas de diferentes matrizes [34]. Por outro lado, os resultados de GC estão intimamente relacionados com o desempenho do método de preparo da amostra e com os procedimentos de análise adotados.

Outra abordagem dentro da análise de fragrâncias é o desenvolvimento de narizes eletrônicos, constituídos de sensores que, ao entrarem em contato com uma substância volátil sofrem modificações de suas propriedades elétricas, reconhecendo padrões de odor específicos. Estes sensores podem ser constituídos por materiais condutores poliméricos ou metálicos ou, ainda, por receptores olfatórios clonados. Neste último caso, o sistema é denominado de “nariz bio-eletrônico” [35, 36]. Os dados obtidos por estes sensores podem ser comparados com a detecção olfatométrica ou com a análise sensorial.

Existem muitas técnicas para isolamento e pré-concentração de fragrâncias descritas na literatura científica, tais como extração líquido-líquido, destilação, *headspace*, *purge-and-trap*, dentre outras [33]. Todas estas abordagens são aplicáveis, mas possuem suas limitações, podendo alterar o perfil de odor da fragrância. Por exemplo, a extração com solventes orgânicos pode causar perdas de substâncias mais voláteis, que são removidos da amostra durante o arraste; as técnicas de destilação podem gerar degradação térmica de alguns componentes; e a quantificação dos analitos é a dificuldade das técnicas de *headspace* [37].

Técnicas baseadas em mecanismos de sorção têm sido empregadas, como extração sortiva em barra de agitação (SBSE), extração sortiva de *headspace* (HSA) e microextração em fase sólida (SPME), empregada neste trabalho. Nestas técnicas, ocorre a concentração de analitos voláteis, facilitando a análise das substâncias presentes em baixas concentrações em uma amostra. Além disso, elas permitem a captura *in loco* de voláteis, como, por exemplo, a captura da fragrância emanada de inflorescências diretamente na planta de origem, ou a identificação de hormônios liberados por insetos na natureza [18].

A microextração em fase sólida foi descrita pela primeira vez como um dispositivo de preparo de amostras para análise ambiental [38]. Desde então, a técnica de SPME tem sido empregada na avaliação de substâncias orgânicas voláteis e semivoláteis presentes em diferentes amostras de fontes vegetais, perfumes, cosméticos e materiais biológicos. Trata-se de uma técnica que não utiliza solventes e que se baseia na partição entre compostos orgânicos numa fase aquosa ou gasosa e fibras revestidas com polímeros [18], sendo a técnica escolhida para a análise de fragrância neste estudo.

3.1 Microextração em fase sólida (SPME)

A técnica de microextração em fase sólida foi desenvolvida em 1988 e comercializada em 1993 pela Supelco [38]. Embora tenha sido amplamente utilizada para a extração de aromas – utilizados como flavorizantes em alimentos –, existem poucos dados disponíveis sobre a aplicabilidade da técnica em fragrâncias. Até recentemente, técnicas de preparo de amostras laboriosas e de alto custo foram utilizadas para isolar, separar e identificar componentes de fragrâncias. Uma vez que as estruturas químicas de aromas e fragrâncias são próximas entre si, a técnica de SPME é uma alternativa no preparo de amostras para análise de fragrâncias.

A Figura 4-A descreve o procedimento utilizado em SPME, que consiste em inserir uma amostra em um frasco com um volume específico, selado com uma tampa do tipo septo. Produtos voláteis do ambiente, que são sorvidos pela fibra ao longo do tempo de armazenamento, devem ser removidos antes da análise por dessorção térmica; a fase de revestimento é capaz de adsorver estes produtos, o que pode gerar alguns artefatos. Os analitos provenientes de uma amostra líquida ou presentes em sua fração volátil, ou *headspace*, são concentrados até atingirem uma distribuição de equilíbrio entre a fibra (fase estacionária) e a fase aquosa ou gasosa (amostra). As substâncias concentradas são, então, dessorvidas termicamente no injetor de um cromatógrafo [39].

Na análise de fragrâncias por SPME, existem dois modos básicos para extração de voláteis das amostras, a depender do substrato a ser analisado, como mostrado na Figura 4-B. No modo de extração direta (DI-SPME), a fibra revestida é inserida na amostra por imersão direta em uma amostra líquida e os analitos são transportados diretamente da matriz da amostra para a fibra. Na extração de *headspace* (HS-SPME), a fibra é exposta na fase de vapor acima de uma amostra líquida ou sólida. Esta última técnica é seletiva para substâncias voláteis, o que evita interferências de substâncias com massa molar elevada que podem estar presentes em matrizes complexas [38].

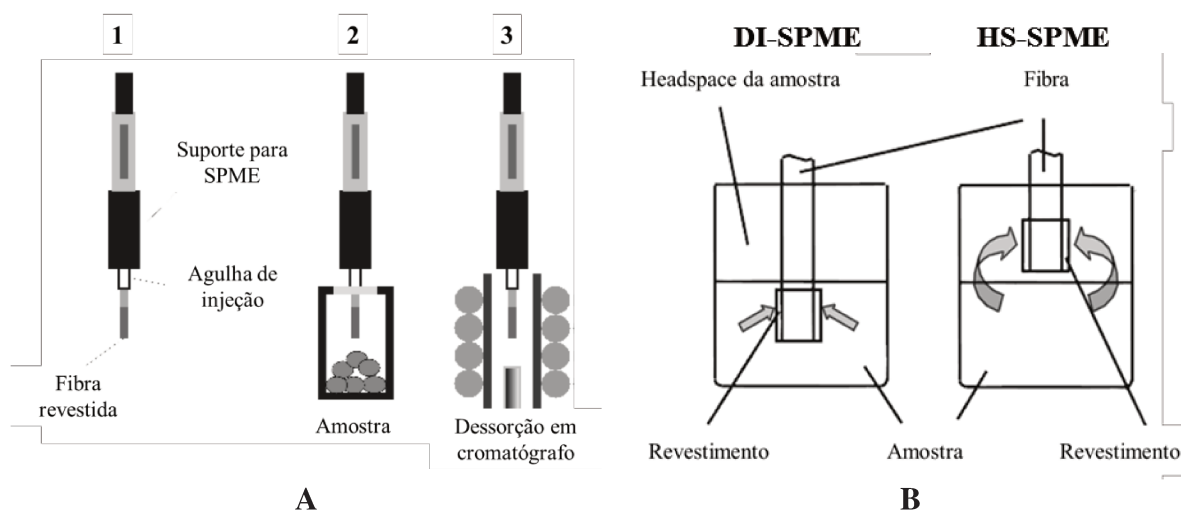


Figura 4. (A) Sequência de análise por microextração em fase sólida (SPME): 1. Configuração do aparato de SPME, 2. Amostragem de *headspace* e 3. Dessorção térmica dos componentes da amostra em injetor de cromatógrafo. (B) Modos de extração utilizados em SPME: amostragem direta (DI-SPME) (esquerda) e amostragem de *headspace* (HS-SPME) (direita). Adaptado de Pawliszyn [38] e Werkhoff *et al.* [39].

4. Sistemas carreadores e encapsulação de ativos

De acordo com Jeroen [40], os sistemas carreadores de ativos podem ser classificados de acordo com as suas dimensões, em macro ($> 0,1$ mm), micro ($0,1 - 100$ μm) ou nanossistemas ($< 0,1$ μm) e de acordo com o tipo de sistema carreador formado. Entretanto, outras classificações podem ser encontradas na literatura.

Os principais sistemas carreadores compreendem as emulsões, formadas por tensoativos; os complexos de inclusão, formados pelas ciclodextrinas; os lipossomas, vesículas de fosfolipídeos; partículas magnéticas, constituídas de óxidos de metais; partículas lipídicas sólidas; e partículas poliméricas, formadas por polímeros sintéticos ou naturais. Os métodos para produção destes sistemas dependem da solubilidade do ativo, das dimensões desejadas, bem como da taxa e forma de liberação do ativo [40].

Sistemas micro e nanocarreadores de ativos têm sido utilizados na indústria farmacêutica para obter liberação modificada de fármacos, redução de toxicidade, bem como solubilização de ativos lipossolúveis [41]. A indústria cosmética é pioneira na comercialização destes sistemas, sendo que as principais aplicações se dão no desenvolvimento de formulações para permeação cutânea, como nanoemulsões, lipossomas, nanopartículas poliméricas e lipídicas, carreadoras de vitaminas, lipídeos e filtros solares [42].

Sistemas carreadores de fragrâncias

A persistência de um constituinte de uma fragrância depende de sua volatilidade. A concentração e as forças de atração entre o material e a base na qual ele foi incorporado, bem como ao substrato onde foi aplicado, são parâmetros importantes que também influenciam na persistência de uma fragrância [12]. Dessa forma, a incorporação de uma fragrância em um micro ou nano carreador poderá refletir em uma maior persistência, uma vez que sua liberação ao longo do tempo será retardada, e as forças de adesão serão modificadas.

O desenvolvimento de carreadores de fragrâncias tem crescido nas últimas décadas e pode ser encontrado em patentes publicadas pela indústria. As principais aplicações ocorrem em produtos cosméticos, como perfumes e antitranspirantes, e também em produtos de limpeza, principalmente em lava-roupas. Os principais sistemas carreadores de fragrâncias empregados são: os complexos de inclusão com ciclodextrinas, incorporados em formulações sólidas e semi-sólidas [43]; as nanopartículas lipídicas sólidas, aplicadas em formulações líquidas, como perfumes [44]; e as partículas poliméricas, incorporadas em formulações aquosas [45].

4.1 *Partículas poliméricas*

As partículas poliméricas são sistemas carreadores de ativos formados a partir da polimerização de monômeros dispersos ou da precipitação de polímeros pré-formados. São sistemas bastante estudados, dadas as suas aplicações na preservação de nutrientes, produção de fármacos alvo-específicos e liberação sustentada de fragrâncias [46].

Partículas poliméricas podem ser classificadas de acordo sua composição e organização estrutural em cápsulas (sistema reservatório) ou esferas (sistema matricial). As cápsulas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, sendo que o ativo pode estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. Por sua vez, as esferas, que não contêm uma fase oleosa, são formadas por uma matriz polimérica na qual o ativo encontra-se disperso, podendo ficar retido ou adsorvido nesta matriz. A formação de cápsulas ou esferas depende do método utilizado para aprisionamento do ativo, bem como das características físico-químicas do polímero e do ativo a ser encapsulado [47].

Assim, o processo de encapsulação pode ser definido como uma medida para aprisionar uma substância dentro de outra. Usualmente, o ativo encapsulado é denominado de núcleo e o material utilizado para o recobrimento, de membrana, formando uma cápsula [48]. O objetivo principal quando se encapsula um ativo é conferir proteção e estabilidade frente condições adversas e/ou liberação modificada deste ingrediente [49]. Uma área de crescente aplicação é na fabricação de aromas e fragrâncias, uma vez que é uma rota acessível para obtenção de perfumes mais duradouros [40].

A Figura 5 ilustra o perfil de liberação de uma fragrância livre quando aplicada em um substrato (Curva A). A mesma composição, quando inserida em uma partícula polimérica, tem sua liberação sustentada ao longo do tempo, podendo apresentar perfis do tipo matriz (Curva B) ou do tipo reservatório (Curva C) [49]. As perdas dos componentes de uma fragrância encapsulada para o ambiente são menores se comparadas com o material não encapsulado, fazendo com que o odor característico de cada molécula persista por mais tempo [40].

Polimerização in situ

O método de polimerização *in situ* é utilizado para produção de cápsulas poliméricas, no intuito de juntar dois líquidos imiscíveis, como água e um óleo essencial ou fragrância. Este método baseia-se na polimerização de monômeros em uma fase contínua aquosa, contendo o ativo a ser encapsulado. Devido à estabilidade química e resistência mecânica dos polímeros formados, os monômeros mais utilizados na polimerização *in situ* são os adutos de uréia-formaldeído e melamina-formaldeído [50]. As resinas formadas são insolúveis em água e, por isso, são adequadas à veiculação em formulações aquosas ou que contenham detergentes.

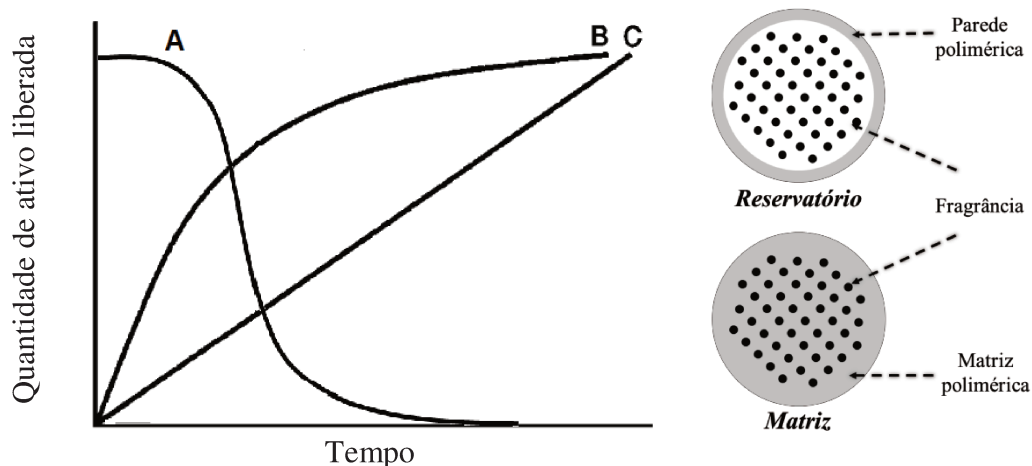


Figura 5. Perfis de liberação ao longo do tempo para uma fragrância pura (A) ou encapsulada (B e C) a partir de um substrato. As curvas B e C correspondem a um sistema do tipo matriz (direita, abaixo) e reservatório (esquerda, acima), respectivamente. Adaptado de Benita [49] e Bône [51].

O primeiro estudo com a resina polimérica de melamina-formaldeído (M-F) consta da década de 1940 [52]. A síntese de microcápsulas utilizando este material iniciou-se na década de 1960 para dispersão de compostos hidrofóbicos em água [53], e desde a década de 1990, as cápsulas de M-F vêm sendo utilizadas para liberação controlada de fragrâncias [54]. Neste campo, sua principal aplicação é dada em substratos têxteis, sendo aplicadas diretamente ou presentes em formulações de produtos de limpeza, como lava-roupas e amaciantes. Recentemente, microcápsulas de M-F contendo perfume foram aplicadas em formulações cosméticas capilares, mostrando também a maior durabilidade da fragrância encapsulada no substrato em relação ao perfume puro [55].

O procedimento de encapsulação de fragrâncias em resina de M-F, pelo método de polimerização *in situ*, envolve três etapas:

Na primeira delas, uma emulsão da fragrância é formada por meio de sua mistura com um tensoativo; o grau de agitação e o tipo de tensoativo empregados nesta etapa influenciam no tamanho das micelas e conseqüentemente no tamanho e morfologia das partículas obtidas. Paralela à primeira etapa ocorre a formação do aduto de M-F por adição dos monômeros de melamina e formaldeído, como mostrado na Figura 6-A, por vezes chamado de pré-polímero ou pré-condensado de M-F. Nesta etapa, a proporção entre os monômeros determina o grau de substituição das moléculas de melamina e a rigidez do polímero formado [54].

A segunda etapa ocorre após a mistura da emulsão com o aduto de M-F, obtidos na etapa anterior, e se baseia na condensação de monômeros em oligômeros favorecida pela

acidificação do meio e aumento da temperatura (Figura 6-B). Estes oligômeros possuem solubilidade em água limitada e precipitam, recobrendo a interface entre óleo e água. A velocidade de agitação empregada nesta etapa também influencia o tamanho de partícula final [54].

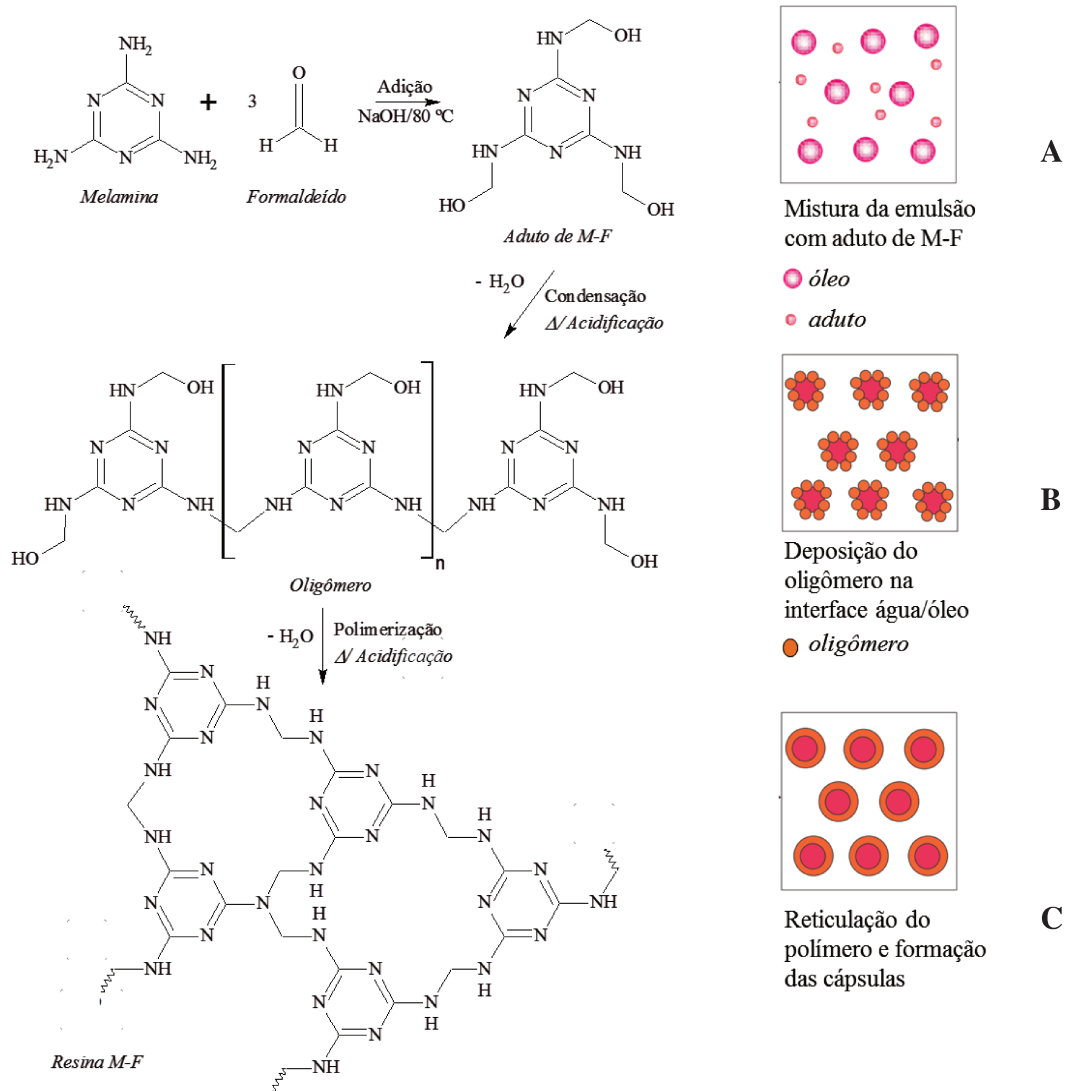


Figura 6. Reações químicas (esquerda) e representações esquemáticas (direita) das etapas do procedimento de encapsulação em resina de melamina formaldeído (M-F) por polimerização *in situ*. (A) formação do aduto de M-F e mistura com emulsão contendo óleo essencial; (B) formação dos oligômeros e deposição na interface óleo/água; e (C) formação da resina M-F e formação das cápsulas. Δ representa aquecimento durante a reação. Adaptado de Bône e colaboradores [51].

Por fim, a terceira etapa ocorre com o aumento da temperatura do sistema e acidificação adicional do meio, o que favorece o crescimento do polímero e formação do material encapsulado (Figura 6-C).

O método de polimerização *in situ* é considerado adequado aos fins deste estudo, uma vez que a reação de polimerização é bem estabelecida na literatura científica e ocorre com facilidade. A obtenção do polímero M-F ocorre com poucos recursos e em escala laboratorial. Além disso, o método possibilita a formação de cápsulas contendo substâncias apolares e voláteis, principalmente óleos essenciais e fragrâncias. Por se tornarem rígidas, estas cápsulas possuem aplicabilidade em formulações aquosas contendo tensoativos.

Uma das desvantagens desta metodologia é o percentual residual de formaldeído, proveniente da reação de polimerização. Existem estudos cujo objetivo é reduzir esta quantidade até níveis aceitáveis [56]. A incorporação deste tipo de cápsulas em formulações cosméticas comerciais ainda é um desafio e carece de investigação minuciosa para aprimoramento da metodologia. Por outro lado, vale lembrar que a fragrância é um constituinte minoritário dentro de uma formulação cosmética destinada ao uso em cabelos, sendo possível que os níveis de formaldeído sejam aceitáveis nestas composições.

Este trabalho se baseia na metodologia clássica de polimerização *in situ* para obtenção de microcápsulas contendo óleo essencial, e se restringe à sua utilização exclusiva para fins do estudo inicial da interação de fragrâncias com a fibra capilar, para posteriormente ser aplicado em formulações cosméticas capilares.

II. JUSTIFICATIVA

O Brasil é o terceiro maior consumidor de cosméticos do mundo, sendo o segundo maior mercado de produtos de uso capilar, e o primeiro no consumo de fragrâncias [57]. Por isso, é crescente o emprego de produtos naturais e o de fragrâncias encapsuladas na indústria cosmética. Neste contexto, inserem-se as novas tendências do consumidor: a busca de multifuncionalidade ao adquirir um produto de tratamento dos cabelos, sendo a fragrância um aspecto importante para determinar seu desempenho.

Criação de fragrâncias

A criação de fragrâncias para cosméticos de uso capilar não é restrito apenas ao seu custo e viabilidade, mas também à compatibilidade de seus ingredientes com a composição na qual está inserida, bem como à sua capacidade de deposição e fixação sobre o cabelo e sua resistência aos procedimentos de enxágue e secagem. A indústria de fragrâncias tem realizado contínuos esforços no sentido de maximizar a percepção do perfume no cabelo pelo consumidor por meio do aumento da deposição da fragrância no cabelo [12].

A compreensão dos possíveis mecanismos de interação de uma fragrância em cabelos se torna uma ferramenta para criação de fragrâncias, uma vez que agrega conhecimento científico na obtenção de fragrâncias específicas para uso em cabelos, gerando produtos cosméticos com melhor desempenho.

Encapsulação de fragrâncias

A encapsulação de ativos tem sido utilizada na indústria farmacêutica por muitos anos para obter liberação controlada de fármacos e proteção do ativo contra oxidação, degradação química ou microbiológica [41]. Outra área de crescente aplicação é a encapsulação de aromas e fragrâncias, uma vez que se trata de uma rota acessível para obter perfumes mais duradouros, além de proteger seus constituintes contra degradação [40].

A técnica de polimerização *in situ* tem se mostrado uma via favorável na encapsulação de óleos voláteis e fragrâncias e a obtenção do polímero M-F ocorre com poucos recursos e em escala laboratorial [51]. Uma das desvantagens desta metodologia M-F é o percentual residual de formaldeído, proveniente da reação de polimerização. Alguns estudos tem procurado reduzir a quantidade residual de formaldeído em níveis aceitáveis para que haja a incorporação deste tipo de cápsulas em formulações cosméticas direcionadas ao consumidor [56]. Portanto, trata-se ainda de um desafio e investigações mais detalhadas precisam ser realizadas. Estes fatos incentivaram o presente estudo que se baseou na metodologia clássica de polimerização *in situ* e se voltou à sua utilização

exclusiva para fins do estudo inicial da interação de fragrâncias com a fibra capilar para posteriormente ser aplicado em formulações cosméticas capilares.

Óleos essenciais

Óleos voláteis são empregados na indústria, principalmente, como aromas de produtos alimentícios, fixadores e componentes de fragrâncias na indústria cosmética, e em composições farmacêuticas. Dentre os principais óleos voláteis empregados, encontra-se o óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus*). Entretanto tem sido demonstrado que seus constituintes sofrem degradação frente à luz e temperatura, podendo perder suas propriedades odoríferas [30, 31].

A encapsulação deste insumo pode, portanto, preservar seus constituintes, agregando valor frente às suas aplicações tecnológicas.

Análises de fragrâncias

A liberação de um perfume a partir de uma matriz biológica é pouco explorada na literatura. Há alguns estudos de persistência de fragrâncias em pele, mas apenas um trabalho com cabelos foi encontrado disponível, além dos trabalhos gerados em nosso Grupo de Pesquisa [13, 14, 15, 16].

O preparo de amostra por microextração em fase sólida (SPME) seguido de análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) são técnicas sensíveis na análise de compostos voláteis liberados a partir de matrizes complexas [38]. Entretanto, existe um número pequeno de dados na literatura relacionados ao uso destas técnicas em relação à avaliação da persistência de fragrâncias.

III. OBJETIVO

Investigar a permanência e interação de uma fragrância, em sua forma livre ou encapsulada, adicionada a formulações cosméticas capilares, por meio da análise de seu perfil de liberação a partir de mechas de cabelo.

Inserido neste escopo, a seguinte estratégia foi utilizada para alcançar os objetivos:

- Propor um procedimento para encapsulação do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus*), utilizado como material fragrante.
- Relacionar a liberação de perfume, em função do tempo, com propriedades físico-químicas de seus componentes, em suas diferentes formas (livre ou encapsulada), e da matriz de aplicação utilizada (cabelo).

IV. EXPERIMENTAL

1. Materiais e reagentes

1.1 Cabelo

Cabelo-padrão Caucásico virgem de coloração castanho claro, com 24 cm de comprimento foi adquirido da empresa De Meo Brothers, Inc. (Nova York, EUA).

“Cabelo-padrão” é o termo científico que designa a mescla uniforme de fios de cabelo proveniente de seis a oito indivíduos de mesma população. É considerado “virgem” o cabelo que não tenha sido submetido a nenhum tipo de tratamento prévio, como tinturas, descoloração ou alisamento químico. Tais procedimentos são conhecidos por alterar a estrutura do fio, o que configuraria uma variante adicional ao estudo.

A utilização deste tipo de amostra possibilita a obtenção de resultados estatisticamente reprodutíveis, bem como a comparação com dados documentados da literatura.

1.2 Fragrância

Óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus*, DC. Stapf), obtido por hidrodestilação das folhas da planta, foi adquirido da empresa Raizando (Brasil). O estudo foi realizado a partir do mesmo lote de material.

1.3 Padrões analíticos

Citral, padrão FCC (Food Chemical Codex) com grau de pureza > 95 %, foi adquirido da BASF Aroma Chemicals (Alemanha). O padrão é constituído de uma mistura dos isômeros geométricos *cis*-citral (neral) e *trans*-citral (geranial), na proporção de 35 e 65 %, respectivamente.

Solução padrão de n-alcanos, adquirida da Fluka-Sigma-Aldrich (Alemanha), compreende uma solução em hexano de uma série homóloga de hidrocarbonetos alifáticos saturados (C₈–C₂₀) em concentração aproximada de 40 mg L⁻¹, cada.

Octadecano (C₁₈), grau de pureza ≥ 98,5 %, também foi adquirido da Fluka-Sigma-Aldrich (Alemanha).

1.4 Encapsulação

Foram utilizados: monômero de melamina, teor de 99 %, da Sigma-Aldrich (Alemanha); e solução de formaldeído, teor de 37–38 % estabilizada com 10 % de metanol, da Merck Chemicals (Alemanha).

1.5 Outros reagentes

Foram empregados como tensoativos das formulações: Tween-20 (INCI: Polysorbate-20) (Croda, Brasil); dodecil sulfato de sódio (SDS), grau de pureza $\geq 99,0$ %, adquirido da Merck KGaA (Alemanha); e brometo de hexadecil trimetil amônio (CTAB), grau USP (teor aproximado de 99 %), da Sigma-Aldrich (Alemanha). Todos estes reagentes foram utilizados sem purificação adicional.

Para ajuste de pH foram utilizados ácido cítrico anidro P.A. ($\geq 99,5$ %) (Synth, Brasil); e hidróxido de sódio (≥ 98 %) (Sigma-Aldrich, Suécia)

1.6 Outros materiais

As amostras para análises cromatográficas foram preparadas em *vials* ($V = 1,5$ mL), suportes e *inserts* não reutilizáveis. As coletas de voláteis foram conduzidas em *vials* com dimensões de 10 cm *H* (altura) x 2,5 cm \varnothing (diâmetro).

Vials, béqueres, kitassatos, erlenmeyers, cadinhos tipo Gooch e balões volumétricos foram previamente lavados com solução de SDS (2 % *m/m*) e enxaguados exaustivamente com água corrente morna ($T \approx 38$ °C), seguido de enxágue com água destilada e álcool etílico anidro comercial (99,5 % INPM), nesta ordem. As vidrarias empregadas na etapa de encapsulação e aquelas utilizadas nas formulações passaram pela etapa adicional de lavagem com solução sulfonítrica. Todos os materiais, com exceção daqueles considerados volumétricos, foram secos em estufa ($T \approx 110$ °C) utilizada exclusivamente para esta finalidade.

2. Equipamentos

2.1 Coleta de voláteis

Foi empregada uma fibra apolar para microextração em fase sólida (Supelco, Sigma Aldrich, Alemanha) de sílica fundida revestida com resina de polidimetil siloxano (PDMS) ($\varnothing = 100$ μm , $L = 1$ cm), compatível com analitos de massa molecular entre 60 e 275 Da. A fibra foi acoplada a um suporte para amostragem manual (Supelco, Sigma Aldrich, Alemanha).

As amostras foram mantidas em banho termostático com circulação interna de água e ajuste de temperatura.

2.2 Análises cromatográficas

Foi utilizado um cromatógrafo gasoso (SHIMADZU, modelo QP2010 Plus, Japão) acoplado a um detector de massas (SHIMADZU, Varian Saturno 2000, Japão) e injetor automático com amostrador (SHIMADZU, AO20i+S, Japão), localizado no Departamento de Biologia Vegetal do Instituto de Biologia da UNICAMP. O equipamento possui uma coluna cromatográfica com fase estacionária DB-5 (Durabond) com 30 m de comprimento x 0,25 mm de espessura de filme x 0,25 µm de revestimento.

A análise dos dados foi feita com auxílio do *software* “GCMS Analysis” (SHIMADZU, Versão 2.50 SU3, ano 2007) que inclui a base de dados de espectros de massas de compostos orgânicos NIST 05.

2.3 Ensaios com micropartículas

Se não indicado de outra forma, os ensaios com as micropartículas foram realizados no Laboratório de Físico-Química Aplicada do Instituto de Química da UNICAMP, supervisionado pela Profa. Dra. Inés Joeques (*in Memoriam*).

Foi empregado um homogeneizador Ultra-Turrax[®] (Modelo T18 basic, IKA) com ajuste de velocidade de agitação entre 6000 e 24000 rpm. O equipamento foi acoplado a um elemento dispersante (S18N-19G, IKA) ($\varnothing_{\text{estator}} = 19$ mm, $\varnothing_{\text{rotor}} = 12,7$ mm) com capacidade para gerar emulsões com tamanho de partículas entre 1–10 µm.

Banho metabólico tipo Dubnoff com agitação recíprocante (Nova Técnica) com ajustes de agitação e temperatura foi utilizado durante o procedimento.

pHmetro (Modelo PHS-3B, pH-TEK) acoplado à eletrodo (Modelo E-900) e termostato foi utilizado para aferir o pH do meio.

Centrífuga Excelsa II (206 BL, Fanem[®]), com controle de tempo e velocidade de agitação, foi utilizada para precipitar as partículas.

Micrografias de luz foram obtidas com Estéreo-Microscópio (Leica MZ12.5) acoplado a câmera digital (Nikon, modelo PXM-1200F). As imagens foram analisadas por meio do *software* MetaVue (Versão 6.3r4, ano 2001).

As medidas de difração de *laser* foram realizadas no Instituto de Química da UNICAMP, no laboratório de Físico-Química, com supervisão do Prof. Dr. Celso Bertran. Foi utilizando um analisador de tamanho de partícula Mastersize 2000 (Malvern[®]), com capacidade de medida entre 0,02 – 2000 µm de diâmetro. As condições de operação foram: análise por espalhamento de Mie, taxa de aquisição de 1 kHz, feixe de luz vermelha de Hélio e Neônio (632,8 nm, max. 4 mW), feixe de luz azul de LED (470 nm, max. 0,3 mW). Os dados foram analisados em *software* 21 CFR (part 11).

Micrografias eletrônicas foram adquiridas no Departamento de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da UNICAMP. As amostras foram fixadas nos porta-amostra metálicos do tipo *stubs* previamente limpos com acetona, utilizando-se fita adesiva de cobre dupla-face. Os *stubs* contendo as amostras foram recobertos com fina camada de ouro, por meio do método de “Sputtering”, utilizando-se um Sputter coater (SCD-050, Balzers). As micrografias foram obtidas em um microscópio eletrônico de varredura (MEV) (5800LV, Jeol), operando a 10 kV na modalidade SEI (elétrons secundários), capturadas com câmera digital e transferidas para computador com auxílio do *software* da Jeol.

3. Métodos

3.1 Análises por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS)

Condições cromatográficas:

A taxa de aquecimento da coluna foi ajustada de modo a obter boa resolução dos picos, baseada na seguinte rampa: 60 °C mantidos por 1 min, seguidos de uma taxa de 6 °C min⁻¹ até atingir 180 °C. Em seguida a taxa de aquecimento foi de 15 °C min⁻¹ até 220 °C, mantendo-os por mais 1 min. Hélio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1,5 mL min⁻¹ e a temperatura do injetor foi de 250 °C.

Condições do espectrômetro de massas:

Foi utilizado o detector de captura iônica, operando com energia de impacto de 70 eV, a uma temperatura de 250 °C. Foram detectados os picos a partir de 3,5 min de corrida cromatográfica, a fim de que se evitasse a saturação do detector com o solvente.

Verificação da metodologia analítica:

Para garantir que a metodologia atenda às exigências de suas aplicações analíticas e assegurar a confiabilidade dos resultados, ela deve cumprir com um conjunto de parâmetros específicos [58]. Os ensaios para determinação destes parâmetros encontram-se detalhados no Anexo 1.

3.2 Caracterização dos constituintes voláteis do óleo essencial

Preparo de amostra:

Uma alíquota de 0,5 µL de óleo essencial foi diluída em 100 µL de n-hexano em *vials* para análise cromatográfica. As análises foram realizadas em modo

particionado (*split*) 1:100 v v⁻¹ a partir da injeção de 1,0 uL de amostra e analisados de acordo com o item 3.1 deste capítulo.

Análise qualitativa:

Foi empregado o índice de retenção (*IR*), obtido a partir da injeção do padrão analítico de n-alcenos (C₈–C₂₀) sob as mesmas condições cromatográficas descritas no item 3.1 deste capítulo. *IR* é o valor numérico relativo ao tempo de retenção (*TR*) do componente de interesse com os tempos de retenção de uma série homóloga de misturas de hidrocarbonetos lineares, facilitando a identificação dos componentes do óleo essencial. O cromatograma típico do padrão de n-alcenos obtido se encontra no item 1 do Anexo 2 (Cromatogramas). O cálculo foi realizado por interpolação a partir da equação de van den Dool e Kratz [59]:

$$IR = 100i \left[\frac{TR_X - TR_A}{TR_D - TR_A} \right] + 100N \quad \text{Equação 1}$$

onde: *IR* = índice de retenção; *TR_X* = tempo de retenção do composto de interesse; *TR_A* = tempo de retenção do alcano que elui antes do composto de interesse; *TR_D* = tempo de retenção do alcano que elui depois do composto de interesse; *i* = diferença do número de carbonos entre os alcanos que eluem depois e antes (normalmente igual a 1); *N* = número de carbonos do alcano que elui antes do composto de interesse.

O índice de retenção calculado e o espectro de massas para cada componente foram comparados com os dados: da literatura, do banco de dados do equipamento (NIST 05) e de biblioteca digital (NIST Web Book) [60, 61].

Análise semi-quantitativa:

A proporção dos constituintes foi obtida por normalização de áreas, por meio de integração manual e automática dos picos cromatográficos.

3.3 Obtenção do óleo essencial encapsulado

A encapsulação do óleo essencial foi realizada com envoltório de melamina-formaldeído (M-F) pelo método de polimerização *in situ*. O procedimento incluiu a síntese da solução com pré-condensado, preparação de uma emulsão contendo o ativo a ser encapsulado, e a formação do material de parede. Este procedimento foi baseado em experimentos preliminares adaptados de metodologias documentadas na literatura [62, 63].

Pré-condensado:

Alíquotas de 5,05 g de melamina (M) e 9,74 g de solução de formaldeído a 37 % (F) foram pesadas e diluídas com água destilada para 200,00 g de solução, resultando em uma concentração dos reagentes de 0,2 e 0,6 mol kg⁻¹, respectivamente (razão molar M:F de 1:3). O pH da mistura foi ajustado para 8,8 ± 0,1 com solução de NaOH a 0,5 mol L⁻¹. A suspensão foi aquecida em chapa de aquecimento (± 88 °C) e mantida em agitação mecânica até que uma solução límpida fosse obtida.

Após atingir temperatura ambiente, o pH da solução foi novamente ajustado para 8,8 ± 0,1 e a amostra foi armazenada em geladeira (≈ 4 °C) por, no máximo, quatro dias.

Emulsão:

Duas emulsões foram formuladas: 10,00 ou 20,00 g de óleo essencial de capim-limão e 30,00 g de Tween-20 foram pesados e diluídos com água destilada para 200,00 g de solução, resultando em concentrações de 5 e 10 % *m/m* de óleo essencial, respectivamente. Inicialmente, o tensoativo foi diluído em metade da quantidade de água, seguido da adição da fragrância e, por fim, do restante de água. Esta mistura inicial foi homogeneizada em Ultra-Turrax a 10000 rpm, durante 10 min.

Polimerização in situ:

Em erlenmeyers de 50 mL, adicionou-se a emulsão à solução de pré-polímero, na proporção de 1:1, e o pH da mistura foi ajustado para 8,0 ± 0,1. A reação ocorreu sob agitação, em um banho termostático tipo Dubnoff. Inicialmente, a temperatura das amostras foi mantida a 50 °C, durante 2 h, e o pH foi ajustado para 6,5 ± 0,1, a fim de que houvesse a deposição do pré-condensado. Em seguida, a temperatura foi aumentada para 65 °C, mantendo-a por mais 2 h, e o pH foi ajustado para 5,0 ± 0,1, para que houvesse reticulação (*crosslink*) do polímero.

Para investigação deste procedimento, foram avaliados os seguintes parâmetros: agitação, velocidade de acidificação do meio e proporção de óleo essencial, conforme mostrado na Tabela 2. Agitação e influência do pH foram avaliados concomitantemente em relação ao diâmetro e morfologia das partículas obtidas, enquanto que a quantidade de óleo essencial foi avaliada em relação à porcentagem de encapsulação. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Tabela 2. Variáveis avaliadas durante a reação de polimerização *in situ* para obtenção de óleo essencial de capim-limão encapsulado em polímero de melamina-formaldeído.

Variáveis	Valores		Avaliação
Agitação:	Lenta	Rápida	
Acidificação do meio:	0,25 unidades de pH a cada 20 minutos de reação	1,5 unidades de pH no início de cada etapa de reação	Diâmetro e morfologia das partículas
Proporção de óleo essencial (% m/m):	2,5	5,0	Porcentagem de encapsulação

As suspensões obtidas foram filtradas em cadinho de vidro do tipo Gooch com placa porosa (Nº 4, ASTM). O material retido foi enxaguado duas vezes com água destilada, seguido de enxágue com solução de etanol a 30 % *m/m*, para remover resquícios de material não encapsulado. Após estes procedimentos, as cápsulas, que apresentavam coloração amarelada semelhante à do óleo essencial, tornaram-se de coloração branca, indicando a remoção de excesso de óleo essencial não encapsulado.

As partículas foram secas em dessecador contendo sílica gel e pentóxido de fósforo (UR \approx 0 % [64]) por 24 horas, tempo necessário para que se obtivesse massa constante. As amostras foram armazenadas em frascos âmbar hermeticamente fechados e mantidas em geladeira (\approx 4 °C) durante o estudo.

3.4 Caracterização das partículas obtidas e percentual de encapsulação

Morfologia:

Análise visual: após o término da reação de formação das partículas, uma alíquota homogênea da suspensão foi coletada e adicionada em tubos de ensaio do tipo *Falcon* (V = 10 mL). Os tubos foram mantidos a temperatura ambiente e no final de 24 h avaliou-se a formação de precipitados.

Microscopia óptica: uma alíquota de 0,1 g de partículas secas foram ressuspendidas em 10,0 mL de água destilada. 5 μ L desta suspensão foram adicionados em lâminas de vidro para microscópio. As micrografias de luz foram obtidas nos modos de luz transmitida e refletida e as partículas foram analisadas quanto à morfologia.

Microscopia eletrônica de varredura (MEV): as imagens por MEV foram obtidas por meio da pulverização de uma pequena quantidade de partículas sobre os *stubs* metálicos, previamente recobertos com fita adesiva de cobre dupla face. O material a ser

analisado ficou retido na face exposta da fita adesiva e o excesso não fixado foi retirado com auxílio de uma pera de sucção. Foi realizada a verredura de toda a amostra e as imagens adquiridas foram representativas do todo.

Tamanho de partícula:

O diâmetro das partículas secas ressuspendidas foi obtido por difração de *laser*. O grau de obscuração do *laser* foi maior que 10 % em todas as medidas. O índice de refração de referência para a resina polimérica melamina-formaldeído utilizado para as análises foi de 1,53 [65] enquanto que o índice de refração do material dispersante foi o da água destilada (1,00).

Percentual de encapsulação:

Com a finalidade de determinar a quantidade de óleo essencial que foi encapsulado, o conteúdo das partículas secas foi extraído em solvente orgânico, seguido de análise quantitativa por GC-MS – de acordo com o tópico 3.1 deste capítulo.

A quantificação ocorreu a partir de uma curva analítica construída com padrão de citral. Além disso, foi utilizado o padrão interno octadecano, a fim de corrigir erros de injeção e aperfeiçoar a etapa de quantificação. Diferentes concentrações de citral foram diluídas em 100 μL de hexano; aos *vials*, foi adicionada solução de octadecano em hexano (0,25 $\mu\text{g g}^{-1}$).

A Figura 7 mostra a curva analítica construída a partir da razão das áreas dos picos de citral e do pico de octadecano, em função das concentrações conhecidas de citral presentes nas amostras.

A extração do conteúdo das cápsulas deu-se da seguinte forma: uma alíquota de 10,0 mg das partículas filtradas e secas, formuladas com 2,5 ou 5,0 % de óleo essencial, foram adicionados em tubos de ensaio contendo 2,00 mL de hexano. Os tubos de ensaio foram mantidos em banho sonificador a fim de que as cápsulas fossem rompidas e o conteúdo interno migrasse para o solvente. As amostras foram centrifugadas para precipitação das partículas em suspensão. Uma alíquota de 100 μL do sobrenadante foi diluída em 2,00 mL de hexano e adicionou-se o padrão interno (0,25 $\mu\text{g g}^{-1}$). Após esta etapa, as amostras foram injetadas em cromatógrafo a gás.

A eficiência do procedimento de extração foi verificada ao longo do tempo de sonicação das partículas sintetizadas com 5,0 % de óleo essencial, como mostrado na Figura 8. Vê-se que a razão entre as áreas dos picos de citral e octadecano estabilizaram-se a partir de 30 min de sonicação, indicando a extração do conteúdo das cápsulas. Entretanto, o erro experimental das triplicatas cai em função do tempo de extração. Por isso, o tempo de 90 min foi empregado na extração das demais partículas para a determinação do conteúdo encapsulado.

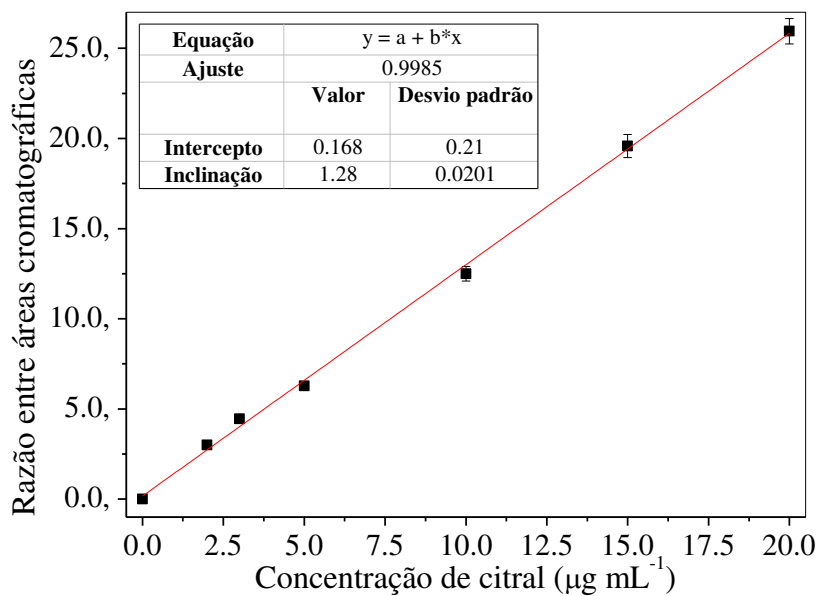


Figura 7. Curva analítica da razão de áreas cromatográficas entre os picos de citral e o pico de octadecano em função de concentrações conhecidas de padrão de citral, utilizada para quantificação de óleo essencial encapsulado.

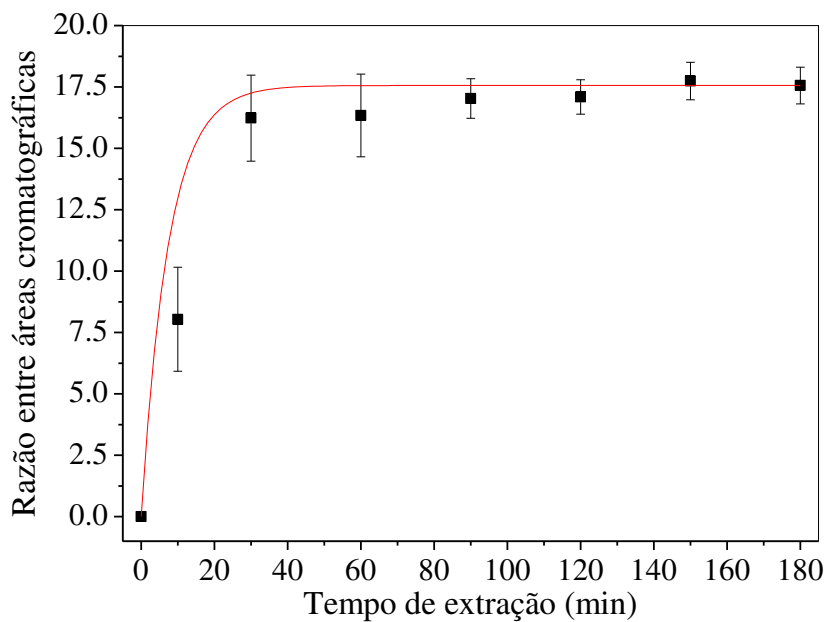


Figura 8. Perfil de extração das cápsulas contendo óleo essencial de capim-limão relacionando razão de áreas cromatográficas entre os picos de citral e o pico de octadecano em função do tempo de sonicação das partículas em hexano.

O percentual de encapsulação foi obtido utilizando a equação da regressão linear apresentada na Figura 7, considerando-se as diluições realizadas para análise das amostras. O rendimento do processo, $R(\%)$, por sua vez, foi calculado a partir da Equação 2.

$$R(\%) = \frac{Q_{encapsulado}}{Q_{inicial}} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

onde: Q = quantidade de óleo essencial.

3.5 Formulações

Com a finalidade de avaliar o perfil de liberação de fragrância a partir de mechas de cabelo, bem como estabelecer os parâmetros de análise, foram realizadas formulações de xampu e condicionador sem enxágue (ou *leave-on*). Como fragrância, foram utilizados: padrão analítico de citral, óleo essencial de capim-limão puro, ou na forma encapsulada, em diferentes concentrações, como mostrado na Tabela 3. Os ingredientes voláteis foram adicionados a soluções de tensoativos aniônico (SDS, em xampu) e catiônico (CTAB, em *leave-on*), ambos à concentração de 2,0 % *m/m* e os frascos agitados manualmente.

As formulações contendo óleo essencial ou citral apresentaram limpidez, indicando que a concentração de tensoativo utilizada foi suficiente para dissolver a fragrância. As formulações contendo o óleo essencial encapsulado apresentaram turbidez, devido ao espalhamento de luz provocado pelo material particulado.

Tabela 3. Ingredientes empregados como fragrâncias nas formulações base de xampu e condicionador sem enxágue, e faixas de concentração utilizadas.

Formulação	Base	Fragrância	Faixa de concentração (% <i>m/m</i>)
Xampu	SDS a 2,0 % <i>m/m</i>	Citral (FCC)	0,063 – 1,00
		Óleo essencial de capim-limão	0,25
		Óleo essencial encapsulado	<i>qsp</i> 0,25 de óleo essencial
Condicionador sem enxágue (<i>leave-on</i>)	CTAB a 2,0 % <i>m/m</i>	Citral (FCC)	0,006 – 0,10
		Óleo essencial de capim-limão	0,10
		Óleo essencial encapsulado	<i>qsp</i> 0,10 de óleo essencial

3.6 Cabelos

Preparo das amostras:

Os cabelos foram separados manualmente em mechas de $0,57 \pm 0,01$ g, presos por abraçadeiras de poliamida.

Limpeza das mechas:

Este procedimento teve por finalidade a remoção de impurezas depositadas sobre os fios – seja por resíduos cosméticos, seja por sujidades adquiridas do ambiente –, de modo a se minimizar a extração significativa de componentes da fibra capilar. Este tipo de procedimento é empregado em trabalhos da literatura científica e também por nosso Grupo de Pesquisa [66].

O pré-tratamento consiste na aplicação de uma solução aquosa de tensoativo aniônico (SDS a 2,0 % *m/m*) na proporção 1:1 (massa de cabelo:volume de solução *m/v*) e fricção do fio por meio de massagem digital, simulando uma aplicação cosmética.

O ensaio foi realizado individualmente utilizando luvas vinílicas, como segue: 1. Molhamento da mecha em água corrente (≈ 40 °C, 30 s, vazão ≈ 50 mL s⁻¹). O excesso de água foi retirado com os dedos; 2. Aplicação da solução de SDS na mecha com auxílio de uma pipeta automática; 3. Massagem digital por 30 s no sentido raiz-ponta da mecha; 4. Enxágue da mecha por 2 min em água corrente (~ 40 °C, ≈ 50 mL s⁻¹) para retirar os resíduos de tensoativo. Após este procedimento, as amostras de cabelo foram secas ao ar e, em seguida, mantidas em um dessecador contendo solução saturada de NaBr (UR = 58 % [64]).

Aplicação das formulações:

Todas as formulações descritas na Tabela 3 foram diluídas na proporção de 1:1 com água destilada. Alíquotas de 100 μ L foram depositadas nas mechas de cabelo com auxílio de uma pipeta automática.

As formulações de xampu foram aplicadas por meio de massagem digital, de maneira semelhante ao ensaio de limpeza das mechas. Realizou-se a massagem no sentido raiz-ponta nas mechas de cabelos previamente limpas por 1 min, enxaguando-se em seguida por 30 s em água corrente, a temperatura ambiente (≈ 20 °C, ≈ 50 mL s⁻¹).

As formulações de condicionador sem enxágue foram aplicadas individualmente com auxílio de uma pipeta automática, no sentido raiz-ponta, ao longo das mechas lavadas com formulação de xampu não contendo fragrância (Tabela 3), simulando uma aplicação cosmética. Algumas mechas, tratadas com condicionador sem enxágue contendo óleo essencial encapsulado como fragrância, foram penteadas cinco vezes antes de cada amostragem, a fim de se verificar a ocorrência do rompimento das cápsulas. O penteamento

foi realizado com um pente de polipropileno por ser o mais comumente utilizado. Um grupo controle, o qual não foi submetido à penteamento prévio às amostragens, também foi realizado.

3.7 Perfis de liberação

As substâncias voláteis de óleo essencial de capim-limão, provenientes das mechas de cabelo, foram avaliadas ao longo do tempo neste estudo. A amostragem ocorreu a partir do *headspace* de *vials* fechados e limpos contendo as amostras de interesse, por meio de microextração em fase sólida (SPME).

Coleta dos voláteis:

Amostragem de *headspace* por SPME é uma técnica de preparo de amostra que utiliza uma fibra revestida como fase estacionária, capaz de sorver moléculas orgânicas presentes no *headspace* de um espaço confinado. Os voláteis são concentrados até que seja alcançado um equilíbrio químico entre as três fases presentes no sistema: amostra (fase líquida ou sólida), *headspace* (fase gasosa) e a fibra (fase sólida) [38]. Parâmetros como tempo de repouso da amostra dentro do *vial*, temperatura de amostragem e tempo de contato da fibra com a amostra influenciam no tempo de equilíbrio e, portanto, no método de amostragem. Estes parâmetros foram considerados neste estudo.

Os *vials* contendo as amostras de interesse foram encaixados em uma placa de isopor com aberturas na largura dos *vials*, de modo que ficaram presos pela tampa. A placa de isopor contendo os *vials* fechados foi armazenada em banho termostático (38 ± 1 °C) durante 10 min. Após este período, a fibra de PDMS foi introduzida na amostra para concentração dos voláteis.

Nestes ensaios, foram consideradas como branco as amostragens de *vials* vazios submetidos às condições anteriormente descritas, bem como controles contendo mechas tratadas com formulações sem fragrância. Os cromatogramas típicos obtidos nestes ensaios encontram-se no item 2 do Anexo 2 (Cromatogramas).

Determinação do tempo de equilíbrio:

A fim de se verificar o tempo necessário de amostragem para que fosse alcançado o equilíbrio entre os voláteis presentes no *headspace* da amostra e a fibra de PDMS, variou-se o tempo de exposição da fibra nas mechas de cabelo tratadas com as formulações de xampu ou condicionador sem enxágue que continham padrão de citral como fragrância. Duas concentrações distintas foram empregadas para cada formulação, a fim de verificar se havia saturação da fibra, como mostrado na Tabela 4.

Os tempos de equilíbrio para as formulações testadas podem ser vistos na Figura 9. Vê-se que 5 e 8 minutos de exposição da fibra foram necessários para atingir o equilíbrio

entre as fases, nas mechas tratadas com xampu e condicionador sem enxágue, respectivamente. Ainda, vê-se que não houve saturação da fibra, uma vez que há duas concentrações de equilíbrio, uma para cada concentração de citral utilizada.

Tabela 4. Variáveis avaliadas na verificação do tempo de equilíbrio para técnica de microextração em fase sólida (SPME).

Formulação	Concentrações de citral (% m/m)	Tempos de exposição da fibra (min)
<i>Xampu</i>	0,063 e 0,250	0, 1, 3, 4, 5, 8, 10, 11 e 12
<i>Condicionador sem enxágue</i>	0,025 e 0,100	

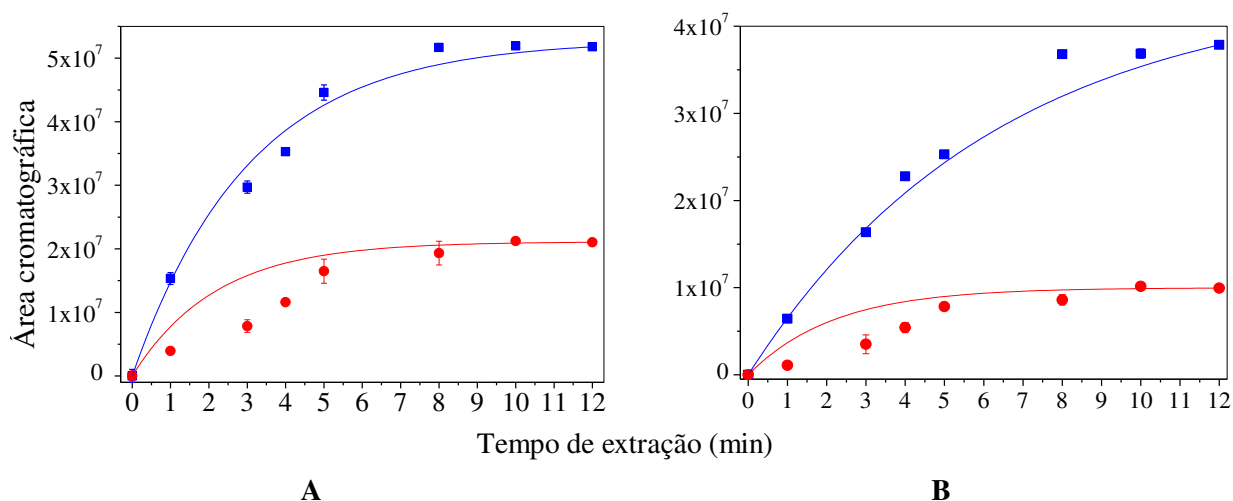


Figura 9. Área cromatográfica dos picos de citral em função do tempo de exposição da fibra de extração ao *headspace* das mechas de cabelo tratadas com: A. Xampu contendo citral a 0,063 % (●) ou a 0,250 % (■) como fragrância. B. Formulação sem enxágue contendo citral a 0,025 % (●) ou a 0,100 % (■) como fragrância. Dados obtidos com triplicata de amostra. Temperatura de extração: 38 °C; tempo de repouso das amostras: 10 min.

Perfil de extração:

O ensaio de perfil de extração teve por finalidade estabelecer a faixa de concentração de amostragem adequada à análise por SPME, avaliando-se a resposta da técnica frente a diferentes concentrações de analitos. Do mesmo modo que no ensaio do tempo de equilíbrio, diferentes concentrações de citral em xampu e condicionador sem enxágue foram utilizadas neste ensaio, como é mostrado na Tabela 5. As concentrações de citral verificadas foram pré-determinadas levando-se em conta a faixa usual de concentração empregada para fragrâncias nestes tipos de formulações, de acordo com Salvador e Chisvert [67].

Tabela 5. Variáveis avaliadas na verificação do perfil de extração para técnica de microextração em fase sólida (SPME).

Formulação	Concentrações de citral (% m/m)	Tempo de exposição da fibra (min)
<i>Xampu</i>	0,000; 0,063; 0,125; 0,250; 0,500; 0,750; 1,000	5
<i>Condicionador sem enxágue</i>	0,000; 0,006; 0,013; 0,025; 0,050; 0,075; 0,100	8

A Figura 10 mostra os perfis de extração em função da concentração de citral para formulações de xampu e condicionador sem enxágue. Vê-se que, em ambas as situações, a faixa de concentração utilizada se ajustou ao modelo linear, mostrando-se adequada às análises de perfil de liberação, uma vez que áreas cromatográficas distintas puderam ser atribuídas a diferentes concentrações dos analitos nos *headspaces* das amostras.

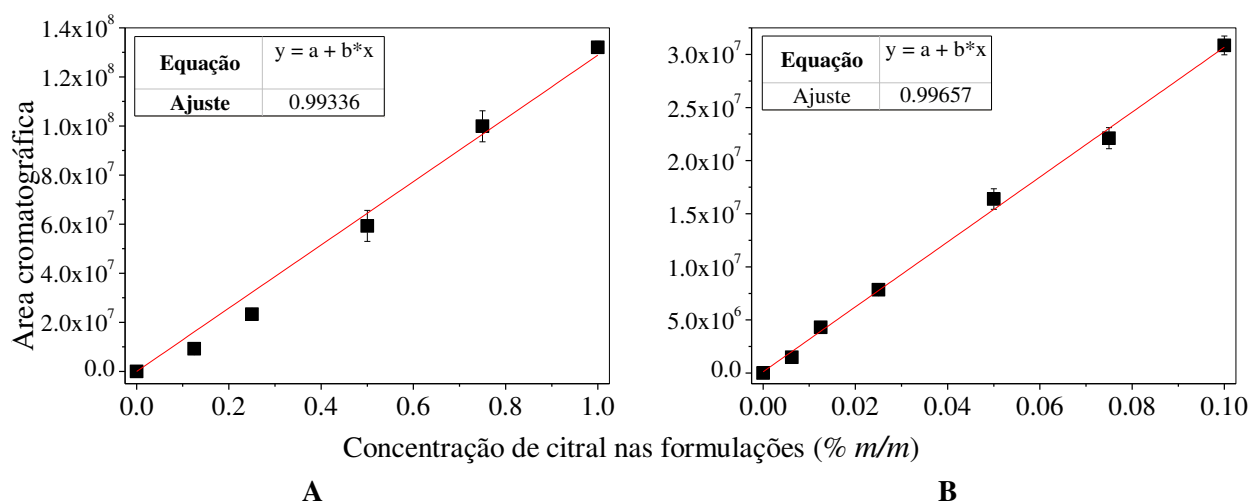


Figura 10. Área cromatográfica dos picos de citral em função da concentração de citral nas formulações (% m/m) de xampu (A) e condicionador sem enxágue (B) após aplicação em mechas de cabelo, amostragem por SPME seguida de dessorção em cromatógrafo gasoso, e análise por GC-MS. Dados obtidos com triplicata de amostra. Tempo de exposição da fibra: 5 min (A) e 8 min (B); temperatura de extração: 38 °C; tempo de repouso das amostras: 10 min.

Análise do perfil de liberação de fragrância:

Os *headspaces* das mechas tratadas individualmente com formulação de xampu ou condicionador sem enxágue, contendo óleo essencial de capim-limão puro ou encapsulado como fragrância (Tabela 3) foram amostrados por SPME de acordo com os parâmetros estabelecidos. Realizaram-se amostragens imediatamente após o tratamento das mechas (tempo zero) e também 0,5; 1,0; 3,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 12,0 h após a aplicação das

formulações. Durante o ensaio, as mechas foram armazenadas em atmosfera isolada com temperatura e umidade relativa controlados ($T = 23 \text{ }^\circ\text{C}$ e $UR = 58 \%$ [64]).

As curvas de perfil de liberação foram construídas individualmente para os componentes do óleo essencial a partir da área cromatográfica, obtida por integração dos picos. Para cada curva de perfil de liberação, as amostragens foram tomadas a partir da mesma mecha de cabelo. Mechas tratadas com formulações sem fragrância foram utilizadas como controle, assim como *headspaces* de *vials* sem amostras de cabelo foram amostrados como “branco” dos experimentos. Os ensaios foram realizados em triplicata de amostra e os cromatogramas típicos apresentados nos ensaios de perfil de liberação são apresentados no item 2 do Anexo 2 (Cromatogramas).

Microscopia eletrônica de varredura (MEV):

As mechas tratadas com a formulação de condicionador sem enxágue contendo óleo essencial encapsulado como fragrância foram analisadas por MEV. As imagens foram obtidas por meio de fixação de 12 fios de cabelos sobre os *stubs* metálicos, previamente recobertos com fita adesiva de cobre dupla face. Os ensaios foram realizados após três horas de aplicação das formulações, sendo que parte das mechas tratadas foi penteada com pente de polipropileno por 15 vezes. Para fins de comparação, fios de cabelo não tratados foram utilizados como controle. Foi realizada a verredura de toda a amostra e as imagens adquiridas foram representativas do todo.

V. RESULTADOS

Os resultados obtidos estão apresentados de modo a racionalizar os diferentes fenômenos e processos envolvidos neste estudo.

Inicialmente apresentamos o estudo de encapsulação do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus*), que constituiu uma etapa prévia à investigação de sua interação com a fibra capilar.

Assim como as fragrâncias, um óleo essencial é uma mistura complexa de substâncias voláteis, que conferem ao insumo seu odor característico. Para compreensão desta propriedade – que é explorada neste estudo –, mostramos a caracterização dos constituintes do óleo essencial, de sua fração volátil e de sua porção encapsulada.

Por fim, apresentamos os perfis de liberação do óleo essencial puro e encapsulado, que ajudam a compreender a interação entre as substâncias odoríferas e o fio de cabelo.

1. Obtenção do óleo essencial encapsulado

O procedimento de polimerização *in situ* envolveu três etapas, conforme discutido no capítulo I deste trabalho: na primeira delas, uma emulsão do perfume foi formada por meio de sua mistura com um tensoativo. Paralelamente, ocorreu a formação do pré-condensado, a partir dos monômeros de melamina (M) e formaldeído (F). A segunda etapa ocorreu após a mistura dos produtos obtidos na etapa anterior, e se baseou na precipitação do pré-polímero, que recobre a interface entre óleo essencial e água por meio de alteração no pH e temperatura. Por fim, a terceira etapa constituiu a reticulação (ou *crosslink*) do polímero, por meio de aumento da temperatura do sistema, o que promoveu a formação das cápsulas.

Ensaio exploratórios foram realizados, baseando-se em metodologias de encapsulação por polimerização *in situ* descritas na literatura [62, 63]. Adicionalmente, alguns parâmetros críticos do processo foram avaliados.

Segundo Hwang *et al.* [68], a velocidade de agitação durante a encapsulação de fragrâncias por polimerização *in situ* está inversamente correlacionado com o tamanho de partícula obtido no processo. Assim, a velocidade de agitação empregada durante a etapa de polimerização foi variada entre 50 e 150 oscilações min^{-1} , sendo investigada a influência deste parâmetro no tamanho e morfologia das partículas obtidas.

A reação de polimerização *in situ* é dependente do aumento da temperatura e redução do pH do meio para que haja reticulação do polímero e, conseqüentemente, a formação das cápsulas [69]. Óleos essenciais são constituídos por substâncias voláteis; assim, a temperatura utilizada durante o processo de reticulação (65 °C) pode gerar perda

dos constituintes mais voláteis, que é dependente do tempo de exposição. A velocidade de acidificação do meio reacional torna-se fator limitante no tempo de reação e, assim, no tempo em que o óleo essencial estará exposto à temperatura elevada. Dessa forma, a velocidade de acidificação também foi avaliada em função da morfologia e diâmetro das partículas.

Os parâmetros morfologia e tamanho de partícula foram investigados a partir de quatro ensaios distintos, mostrados na Tabela 6. Um controle, constituído do meio reacional excluindo-se a adição de emulsão ou óleo essencial, foi utilizado para todos os procedimentos, mas em todos os casos não houve a formação de cápsulas.

Tabela 6. Variáveis do processo de encapsulação do óleo essencial de capim-limão (*C. citratus*), empregadas na análise de morfologia e tamanho de partícula para os ensaios A, B, C e D.

Ensaio	Velocidade de agitação (oscilações min ⁻¹)	Decaimento de pH em função do tempo de reação (min)
A	50	0,25 unidades a cada 20 min
B	150	0,25 unidades a cada 20 min
C	50	1,5 unidades no início de cada etapa de reação
D	150	1,5 unidades no início de cada etapa de reação

A concentração de óleo essencial utilizada nos ensaios A, B, C e D foi de 2,5 % m/m.

Por fim, diferentes proporções entre o pré-condensado de M-F e o teor de óleo essencial (2,5 ou 5,0 % m/m) foram investigadas em função da porcentagem de encapsulação, *i.e.*, a quantidade de óleo essencial internalizada nas cápsulas formadas.

O mecanismo de microencapsulação por polimerização *in situ* encontra-se bastante elucidado na literatura científica. Os parâmetros e os valores designados foram estabelecidos por apresentarem resultados relevantes em termos de encapsulação e passíveis de comparação. Apresentamos, aqui, as diferenças morfológicas, de diâmetro e de rendimento do processo dos produtos obtidos, em função da variação dos parâmetros reacionais à luz do entendimento deste mecanismo.

Neste estudo, convencionou-se que o decaimento de pH reacional, em 0,25 unidades a cada 20 min, ou em 1,5 unidade ajustada no início da reação, fossem tratados como decaimentos gradual ou abrupto, respectivamente.

1.1 Morfologia

A morfologia do produto obtido por polimerização *in situ* pode ser modulada por alguns parâmetros reacionais, já descritos na literatura, como velocidade de agitação,

proporção entre monômeros e material a ser internalizado e temperatura empregada durante a encapsulação [50, 52]. Neste estudo, a morfologia dos produtos obtidos foi avaliada visualmente, e também por meio de técnicas de microscopia óptica e eletrônica. A análise morfológica foi realizada com os quatro ensaios descritos na Tabela 6, variando-se parâmetros reacionais durante a formação das partículas.

Análise visual

A análise visual de um sistema pode fornecer informações acerca de suas propriedades e dimensões. Ao final da reação de polimerização, os produtos apresentavam aparência leitosa típica de uma suspensão de partículas. Estas suspensões permaneceram em repouso para que seu comportamento pudesse ser observado.

A Figura 11 mostra o aspecto das suspensões obtidas nos ensaios A, B, C e D, apresentados na Tabela 6, após permanecerem 24 horas em repouso. Visualmente, nota-se que as suspensões obtidas nos ensaios C e D apresentaram quantidade de precipitados considerável, sendo mais evidente no ensaio C. Os ensaios obtidos com acidificação suave do meio apresentaram pouco (ensaio A) ou nenhum precipitado (ensaio B).

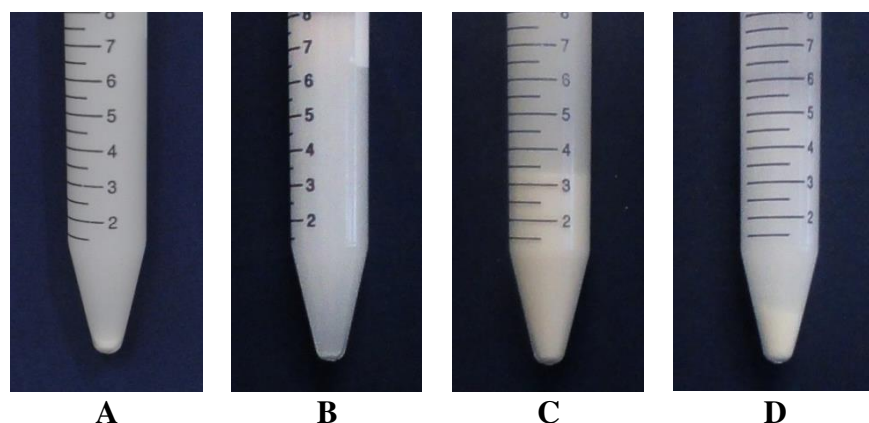


Figura 11. Aparência das suspensões contendo partículas de resina de melamina-formaldeído contendo óleo essencial de capim-limão encapsulado, obtidas por polimerização *in situ*, variando-se parâmetros reacionais (vide Tabela 6).

A ocorrência de precipitado nos ensaios C e D mostra a influência da força gravitacional sobre as partículas formadas nestes ensaios, sugerindo a formação de aglomerados ou partículas maiores, quando se compara com os ensaios A e B. Nota-se, ainda, que ao aumentar a velocidade de agitação, reduziu-se o volume de precipitado (ensaio B em relação ao A, ensaio D em relação ao C) e que, em geral, este volume foi menor quando se utilizou decaimento suave de pH reacional (ensaios A e B em relação aos ensaios C e D).

Microscopia óptica

A morfologia das partículas, analisada por meio de microscopia de luz, possibilitou a visualização dos produtos formados.

A Figura 12 apresenta as micrografias ópticas obtidas para cada um dos ensaios descritos na Tabela 6, sendo que os produtos obtidos da reação de polimerização são evidenciados pelos corpos de coloração amarelada. Os produtos mostrados nas figuras da esquerda (ensaios A e C) foram obtidos empregando-se agitação de 50 oscilações min^{-1} , enquanto que os apresentados à direita (ensaios B e D), 150 oscilações min^{-1} . A velocidade de acidificação do meio reacional pode ser interpretada comparando-se os ensaios A e B – nos quais o ajuste de pH foi gradual, decaindo 0,25 unidades a cada 20 min de reação – com os ensaios C e D – nos quais o pH ideal foi ajustado no início da reação, de maneira abrupta.

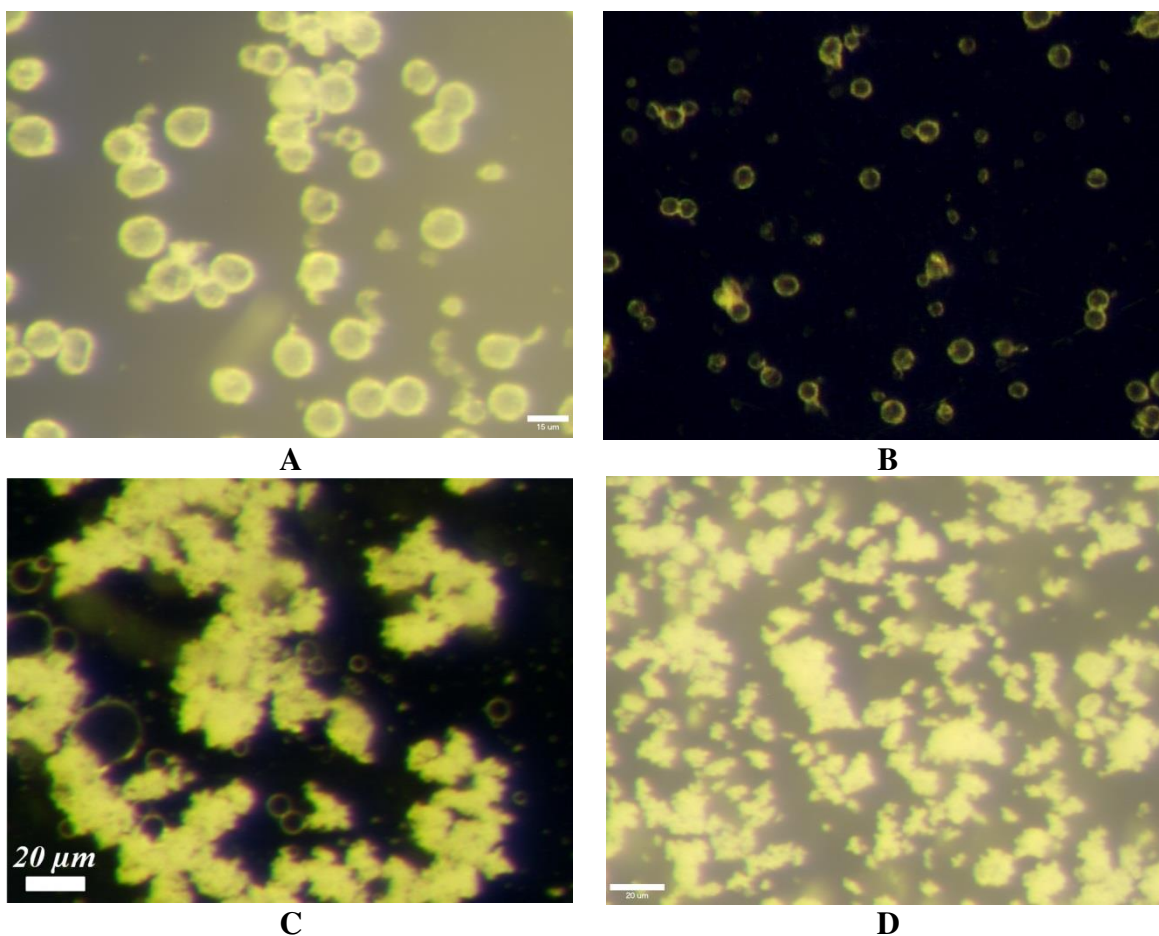


Figura 12. Fotomicrografias ópticas das partículas de melamina-formaldeído (M-F) contendo óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus*), obtidas por polimerização *in situ*, variando-se os parâmetros: velocidade de agitação de 50 (A e C) para 150 oscilações min^{-1} (B e D); decaimento lento de pH reacional de 0,25 unidades a cada 20 min (A e B) para decaimento abrupto (1,5 unidade no início da reação) (C e D). Condições: luz transmitida, aumento de 40 X.

Analisando o impacto da velocidade de acidificação durante a reação, vê-se que o decaimento gradual (Figura 12-A e B) foi favorável à formação de partículas morfologicamente mais uniformes em relação ao decaimento abrupto de pH. Neste último caso (Figura 12-C e D), nota-se que, além da irregularidade do produto obtido, houve formação de agregados.

Aumentando-se a velocidade de agitação de 50 para 150 oscilações min^{-1} , ocorreu uma aparente diminuição das dimensões das partículas, sendo mais evidente nos ensaios que foram realizados com decaimento gradual de pH (Figura 12-A e B). Ademais, nota-se que houve a formação de agregados menores no ensaio D em relação ao C, sem que houvesse, entretanto, mudança em relação a não uniformidade das partículas obtidas. Estes dados estão de acordo com a análise visual, pois mostram que a ocorrência de precipitados se deu pela formação de agregados, o que dificultou a manutenção da integridade da dispersão.

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A formação de agregados em função da mudança da taxa de acidificação do meio foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), empregando-se os ensaios B e C (vide Tabela 6) neste estudo. As micrografias apresentadas na Figura 13 mostram a morfologia do produto obtido no ensaio B (Figura 13-B-I e II) e no ensaio C (Figura 13-C-I e II).

Analisando as micrografias da Figura 13, nota-se, em todos os ensaios, a formação de cápsulas com cerca de 1 μm de diâmetro, que se arranjam de maneiras distintas, a depender da forma de acidificação do meio. No decaimento gradual de pH reacional (Figura 13-B-I e II) estas pequenas cápsulas aglomeraram-se em cápsulas maiores, com cerca de 10 μm de diâmetro, que foram as identificadas pela microscopia óptica (Figura 12-A e B). Quando foi empregado o decaimento abrupto de pH, estas pequenas cápsulas aglomeraram-se em blocos maiores e não uniformes (Figura 13-B-I e II).

Assim, a acidificação abrupta do meio reacional levou à formação de aglomerados de partículas não uniformes. Alguns procedimentos de encapsulação por polimerização *in situ* empregaram um decaimento abrupto de pH para obtenção de microcápsulas [54, 56, 69]. Entretanto, neste estudo, este parâmetro influenciou na formação de partículas agregadas e pouco uniformes.

Durante a reação de polimerização, a acidificação do meio promove a precipitação dos monômeros pré-condensados, que deve recobrir as partículas provenientes da emulsão para que, no fim do processo, haja a formação de uma microcápsula contendo óleo essencial em seu interior. Dessa forma, um decaimento abrupto no pH reacional nestas etapas irá favorecer uma precipitação abrupta e, portanto, não específica à interface óleo-água, justificando a formação de partículas não uniformes, evidenciado pelas micrografias eletrônicas apresentadas.

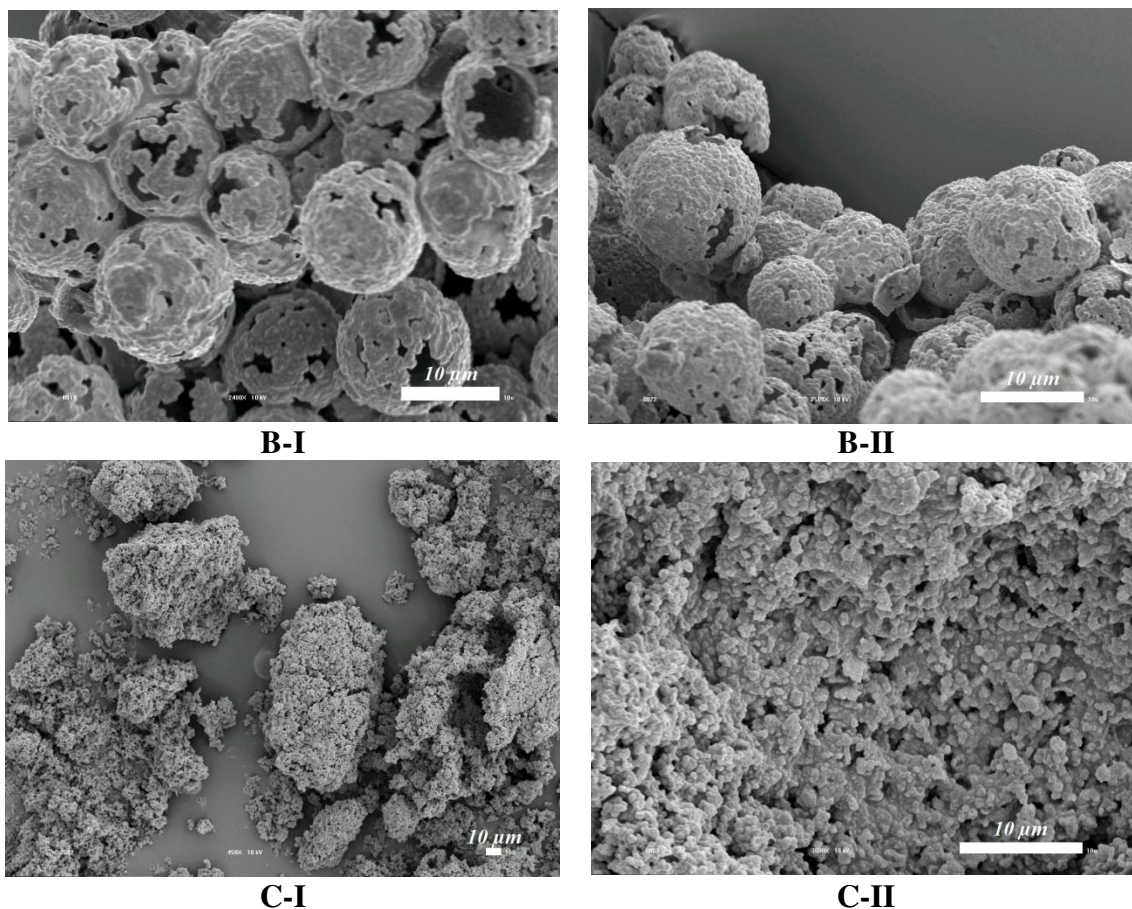


Figura 13. Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) das partículas contendo óleo essencial de capim-limão, sintetizadas pelo método de polimerização *in situ* do aduto melamina-formaldeído (M-F), variando-se a velocidade de acidificação do meio durante o processo em decaimento gradual de pH (B-I e II) ou decaimento abrupto (C-I). A figura (C-II) mostra em maior aumento a morfologia de um aglomerado de partículas obtido no ensaio no qual se adotou a acidificação abrupta.

1.2 Tamanho de partícula

As medidas de diâmetro aparente das partículas foram obtidas a partir da técnica de difração de *laser*, por ser compatível com partículas na faixa micrométrica de tamanho. Além disso, a técnica foi utilizada no intuito de investigar a presença de aglomerados gerados nos ensaios C e D (Tabela 6).

A difração de *laser* reportada pelo detector do equipamento é proporcional ao volume do material particulado presente, e os dados podem ser gerados em relação ao número ou volume de partículas. Existe uma relação cúbica ($1:10^3$) entre o tamanho de uma partícula e seu volume. Quando ocorrem simultaneamente duas ou mais distribuições de tamanho de partículas, medidas baseadas em volume são sensíveis ao surgimento de poucas partículas grandes com determinada distribuição, evidenciando a presença de aglomerados,

uma vez que o volume de uma partícula grande é maior que o apresentado por uma pequena [70].

A Tabela 7 apresenta o diâmetro hidrodinâmico médio para os ensaios A, B, C e D (Tabela 6). Vê-se que, com o aumento da velocidade de agitação, o diâmetro médio foi reduzido em cerca de 50 %. Ademais, os valores obtidos concordam com os dados de morfologia, mostrando que houve a formação de partículas cerca de 10 vezes maiores quando se utilizou o decaimento abrupto de pH durante a reação de formação das cápsulas.

Tabela 7. Diâmetro hidrodinâmico médio (quintuplicata de medida) baseado em % volume obtido por difração de *laser* para partículas de óleo essencial de capim-limão (*C. citratus*), sintetizadas por polimerização *in situ* (vide Tabela 6).

Diâmetros hidrodinâmicos (µm)	A	B	C	D
D[4,3]	18,1 ± 0,9	9,1 ± 0,6	167,5 ± 6,2	80,1 ± 3,6
d(0,9)	37,0 ± 1,0	14,7 ± 0,4	329,4 ± 7,8	114,4 ± 4,5
d(0,5)	14,1 ± 0,6	8,4 ± 0,6	160,3 ± 5,9	40,0 ± 3,1
d(0,10)	4,8 ± 0,7	4,6 ± 0,2	18,2 ± 2,6	20,4 ± 3,7

D[4,3] é o diâmetro médio relativo a uma esfera de mesma dimensão das partículas, d(0,9), d(0,5) e d(0,1) representam os diâmetros máximos obtidos para 90, 50 e 10 % das medidas, respectivamente.

A Figura 14 apresenta as distribuições de diâmetro hidrodinâmico dos ensaios A, B, C e D (Tabela 6), obtidas por difração de *laser* a partir das partículas secas e ressuspendidas em água destilada.

Vê-se que, nos ensaios em que foi adotado o decaimento gradual do pH reacional (Figura 14, A e B), houve a formação de uma única população de partículas, mostrado pela distribuição uniforme de tamanho de partícula. Por outro lado, o ajuste abrupto do pH implicou na formação de partículas maiores e não uniformes, indicado pela presença de duas populações distintas nas distribuições de diâmetro das Figura 14 C e D.

Ainda, para os ensaios onde o decaimento de pH foi gradual, o aumento da velocidade de agitação implicou na redução da dispersão dos valores de diâmetro das partículas, evidenciado pela presença da distribuição mais estreita da Figura 14-B em relação ao ensaio A. Para os ensaios onde o decaimento de pH foi abrupto, nota-se que as distribuições de tamanho de partícula mantiveram-se em duas populações distintas, mesmo quando se aumentou a velocidade de agitação de 50 para 150 oscilações min⁻¹ (Figura 14-C e D). Entretanto, houve uma inversão na intensidade de luz difratada, evidenciando um aumento da população de menor dimensão de acordo com o aumento da velocidade de agitação.

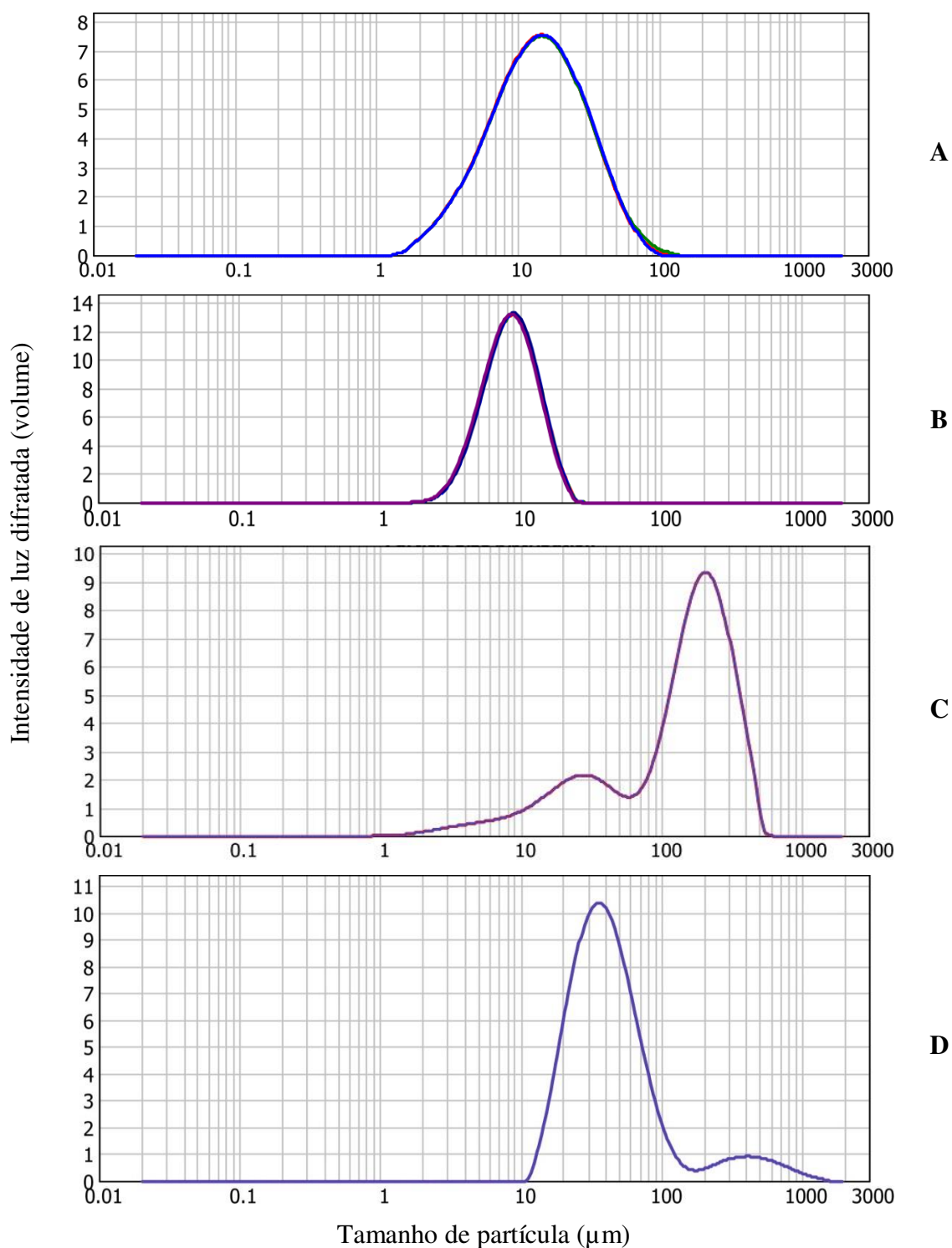


Figura 14. Distribuições de diâmetro hidrodinâmico (volume, $D[4,3]$) obtidas por difração de *laser* para partículas de óleo essencial de capim-limão (*C. citratus*), obtidas por polimerização *in situ*, variando-se os parâmetros: velocidade de agitação de 50 (A e C) para 150 oscilações min^{-1} (B e D); decaimento lento de pH reacional de 0,25 unidades a cada 20 min (A e B) para decaimento abrupto (1,5 unidade no início da reação) (C e D). As partículas foram secas e dispersas em água destilada, na concentração de 1 % *m/m*.

Comparando com as análises de morfologia e macroscópica das partículas, foi possível correlacionar os dados de distribuição de tamanho com a ocorrência de precipitados nos ensaios C e D e a ausência deles no ensaio B (Figura 11). Apesar de o ensaio A ter mostrado uma única distribuição de tamanho de partículas, apresentou uma faixa que abrange dimensões entre cerca 1 e 100 μm (Figura 14-A). Entretanto, a análise morfológica do ensaio A mostrou relativa uniformidade na dimensão das partículas (Figura 12-A). Isto indica a possibilidade da formação de agregados de partículas ao longo do tempo; estes agregados são interpretados pelo equipamento de difração de *laser* como sendo partículas esféricas únicas e também caracterizam a formação de precipitados.

Influência da emulsão no tamanho de partícula

No processo de polimerização *in situ*, o caráter iônico do tensoativo empregado na etapa de emulsificação influencia na uniformidade de tamanho final das partículas, bem como na morfologia da superfície [68].

No estudo de Wu *et al.* [69], SDS, um tensoativo aniônico, favoreceu a formação de partículas nanométricas (30 – 250 nm), enquanto que a ausência de tensoativo influenciou na formação de partículas micrométricas, com tamanho de até cerca de 4,5 μm . No estudo de Hwang e colaboradores [68], Tween-20, que é um tensoativo não-iônico, influenciou na formação de partículas de escala micrométrica de diâmetro.

Ainda, de acordo com evidências empíricas reunidas na revisão de Bône *et al.* sobre fragrâncias encapsuladas em invólucro de melamina-formaldeído [51], cápsulas de dimensão micrométrica (entre 10 – 40 μm) são mais adequadas à liberação sustentada de fragrância em relação às nanométricas. Assim, empregou-se um tensoativo não-iônico (Tween-20) na etapa de emulsificação neste estudo, por ser mais adequado aos fins de liberação de fragrância.

A Figura 15 apresenta a distribuição de tamanho de partícula adquirida por difração de *laser* para emulsão de óleo essencial de capim-limão obtida com o tensoativo não-iônico Tween-20 e que foi utilizada em todos os ensaios descritos na Tabela 6. Vê-se a presença de duas populações de partículas com dimensões distintas: uma, de maior intensidade, com diâmetro médio de cerca de 0,5 μm , e outra, de menor intensidade e mais distribuída, cujo diâmetro variou entre 1 e 10 μm .

Nota-se que o tensoativo não-iônico empregado no processo influenciou na obtenção das partículas da emulsão com dimensões micrométricas que, por sua vez, determinaram as dimensões das partículas de melamina-formaldeído, evidenciando que a precipitação do polímero durante a etapa de polimerização se deu, preferencialmente, na interface óleo-água.

Estes dados sugerem que a formação de pequenas cápsulas, com cerca de 1 μm , foi devida ao recobrimento das partículas da emulsão com menor dimensão

(Figura 13). Isto é mais evidente para o ensaio B, no qual se empregou agitação vigorosa aliada a acidificação gradual, mostrando que há uma combinação de fatores influenciando na morfologia e tamanho de partícula. A emulsão e a dimensão de sua fase oleosa têm papel fundamental na formação das cápsulas, uma vez que sem a presença de óleo ou emulsão no meio reacional, não houve a formação de cápsulas.

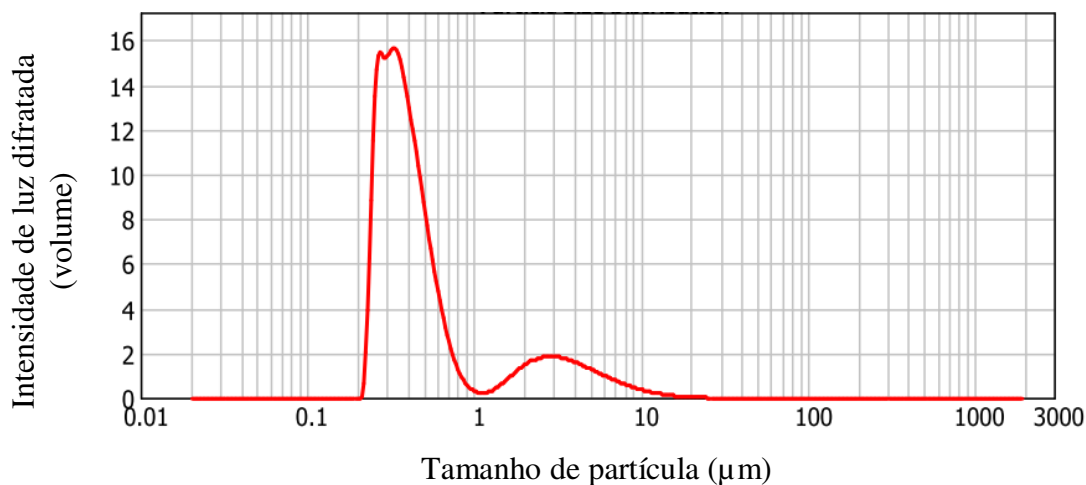


Figura 15. Distribuição de diâmetro hidrodinâmico (volume, D[4,3]) obtida por difração de laser para emulsão de óleo essencial de capim-limão (*C. citratus*) a 2,5 % m/m, obtidas por homogeneização utilizando-se Tween-20 como tensoativo.

As cápsulas obtidas no ensaio B mostraram, ainda, dimensões adequadas para liberação de fragrância, de acordo com Bône *et al.* [51], sendo, portanto, empregadas como fragrância nas formulações de xampu e condicionador sem enxágue.

1.3 Percentual de encapsulação e rendimento

O percentual de encapsulação e rendimento do processo foram avaliados em função da quantidade de óleo essencial utilizada no procedimento de encapsulação. Esta avaliação teve por finalidade propor a melhor proporção entre óleo essencial e pré-polímero a ser utilizada. O material extraído das cápsulas foi analisado por cromatografia gasosa e quantificado por meio da equação da curva analítica mostrada na Figura 7, como já empregado por Preece e colaboradores [56]. Ainda, a quantificação foi realizada baseada no componente majoritário do óleo essencial, citral, e corrigida em relação ao teor deste componente no óleo essencial.

O percentual de encapsulação corresponde à quantidade relativa de material encapsulado encontrado em uma quantidade de produto [49] e é apresentado na Tabela 8 com os dados que levaram ao seu cálculo. Vê-se que, dobrando-se a quantidade de óleo essencial no processo de encapsulação, não houve diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) no percentual relativo de fragrância internalizada.

Tabela 8. Dados utilizados para o cálculo de percentual de encapsulação de óleo essencial.

Ensaio	Massa de partículas (g)	Razão de áreas cromatográficas ¹	% m/m de citral ²	% m/m de óleo essencial ³
2,5 %	0,011 ± 0,002	17,8 ± 0,7	25 ± 2	32 ± 3
5,0 %	0,011 ± 0,003	22,5 ± 1,0	32 ± 3	39 ± 4

1. razão entre as áreas cromatográficas de *cis/trans*-citral e padrão interno octadecano

2. segundo equação: $y = 1,3x + 0,17$.

3. considerando que citral corresponde a 80 % da composição do óleo essencial encapsulado.

O rendimento do processo corresponde à quantidade de óleo encapsulada em relação à quantidade deste produto adicionada no início, e diz respeito à porcentagem de perdas inerentes do processo. A partir da análise dos dados da Tabela 9, nota-se que quando se aumentou a quantidade de óleo essencial para 5,0 %, houve uma queda no rendimento da reação, sendo coerente com os dados de percentual de encapsulação.

Tabela 9. Dados utilizados para o cálculo de rendimento de óleo essencial no processo de encapsulação.

Ensaio	Partículas obtidas ¹ (g)	Total de óleo essencial adicionado (g)	Óleo essencial encapsulado ² (g)	Rendimento % m/m
2,5 %	1,35 ± 0,05	0,5	0,43 ± 0,02	86 ± 4*
5,0 %	1,42 ± 0,07	1,0	0,56 ± 0,03	56 ± 5*

1. a partir de 20 g de suspensão, filtradas e secas.

2. considerando os valores de % de encapsulação obtidos para cada ensaio (Tabela 8).

* valores significativamente diferentes ($p < 0,05$), de acordo com teste *T* de Student para 3 amostras.

Para o ensaio com 2,5 % de óleo essencial, os valores obtidos tanto para percentual de encapsulação, quando de rendimento, encontram-se próximos aos descritos na literatura científica [54, 56, 71]. Os valores obtidos para o ensaio com 5,0 % de óleo essencial indicam uma saturação na proporção entre óleo essencial e polímero formado.

2. Caracterização dos constituintes do óleo essencial de capim-limão, de sua fração volátil e da fração encapsulada

A identificação dos constituintes do óleo essencial utilizado neste trabalho constituiu a etapa de caracterização da matéria-prima, com a finalidade de verificar os componentes que pudessem ser designados como fragrância. O conteúdo das cápsulas, obtido por extração com hexano, foi caracterizado no intuito de averiguar a compatibilidade dos constituintes do óleo essencial com o procedimento de encapsulação. Por fim, as moléculas voláteis do óleo essencial de *C. citratus* foram identificadas, considerando-se que a volatilidade destas moléculas permite que esta fração acesse os receptores olfativos do nariz humano, sendo responsável pelo odor característico da planta.

2.1 Constituintes do óleo essencial de capim-limão

A Tabela 10 apresenta as substâncias presentes no óleo essencial puro. A proximidade dos valores calculados do índice de retenção para cada substância com valores da literatura, bem como a comparação dos espectros de massa, obtidos com a base de dados NIST05, foram suficientes para identificação da maioria dos picos presentes no cromatograma da Figura 16-A.

Na Figura 16-A, vê-se que os picos majoritários referentes aos terpenos mirceno, *cis*-cital (neral) e *trans*-cital (geranial) representaram cerca de 85 % da composição do óleo essencial, sendo que apenas a mistura dos isômeros de cital somaram 79 %. Concentrações de cital próximas às identificadas neste estudo foram também encontradas por Guterres *et al.* (76 % de cital) [72] e Moreira *et al.* (75 %) [73]. Ainda, os dados estão de acordo com a Farmacopéia Brasileira, que estabelece um teor mínimo de 60 % de cital para o óleo essencial de *C. citratus* [74].

Das 22 substâncias identificadas como componentes do óleo essencial estudado, grande parte concorda com outros estudos que utilizaram óleos essenciais de *C. citratus* [73, 75, 76]. Linalol, citronelal, mentenol, citronelol, cital, geraniol, acetato de geranila são amplamente utilizados na composição de fragrâncias; mirceno, *cis* e *trans*-ocimeno possuem uso restrito em perfumaria devido à instabilidade e odor pungente; as substâncias metil-heptenona, cariofileno, bergamoteno são utilizadas na indústria química como reagentes para formação de outros ingredientes de fragrâncias [77]. Das moléculas caracterizadas, crisantemal, *cis*-cital, *trans*-cital e 2-undecanona são os principais responsáveis pelo odor característico de capim-limão, de acordo com estudo de Brito e colaboradores [28].

Tabela 10. Substâncias presentes no óleo essencial capim-limão (*Cymbopogon citratus*).

	Tempo de retenção (min)	Substância	Índice de retenção calculado [59]	Índice de retenção referência [60, 61]	Área relativa (%)
1	5,876	6-metil-5-hepten-2-ona	987	985	1,4
2	5,964	β -Mirceno	991	991	5,7
3	7,123	<i>cis</i> - β -Ocimeno	1038	1040	0,2
4	7,391	<i>trans</i> - β -Ocimeno	1048	1050	0,1
5	8,762	β -Linalol	1101	1098	1,2
6	9,988	Verbenol	1146	1140	0,3
7	10,126	<i>trans</i> -Crisantemal	1151	1150	0,4
8	10,21	β -Citronelal	1155	1153	0,5
9	10,529	β -Terpineol	1166	1165	1,3
10	10,945	<i>p</i> -Menth-1-en-3-ol	1181	1175	0,1
11	11,025	α -Terpineol	1185	1189	2,4
12	12,302	β -Citronelol	1231	1228	0,7
13	12,68	<i>cis</i> -Citral (Neral)	1245	1240	32,9
14	13,007	Geraniol	1258	1255	3,4
15	13,474	<i>trans</i> -Citral (Geranial)	1274	1271 [78]	45,7
16	14,018	2-Undecanona	1295	1291	0,7
17	16,36	Acetato de geranila	1386	1383	0,3
18	17,285	β -Cariofileno	1424	1428	0,2
19	17,672	α -Bergamoteno	1441	1436	0,2
20	18,979	2-Tridecanona	1498	1496	0,6
21	20,403	Óxido de cariofileno	1590	1581	0,1
22	20,859	Selina-6-en-4-ol	1620	1615	0,1
Total identificado:					98,5

Constituintes identificados com base no índice de retenção e perfil de fragmentação no espectro de massas em GC-MS (NIST, 2005) e listados de acordo com a ordem de eluição na coluna Durabond-DB5 (30m). Índice de retenção de Kovats, baseado em série homóloga de n-alcanos, calculado para cada substância e comparado com valores da literatura; área total: 100 %; não determinados: 1,5 %.

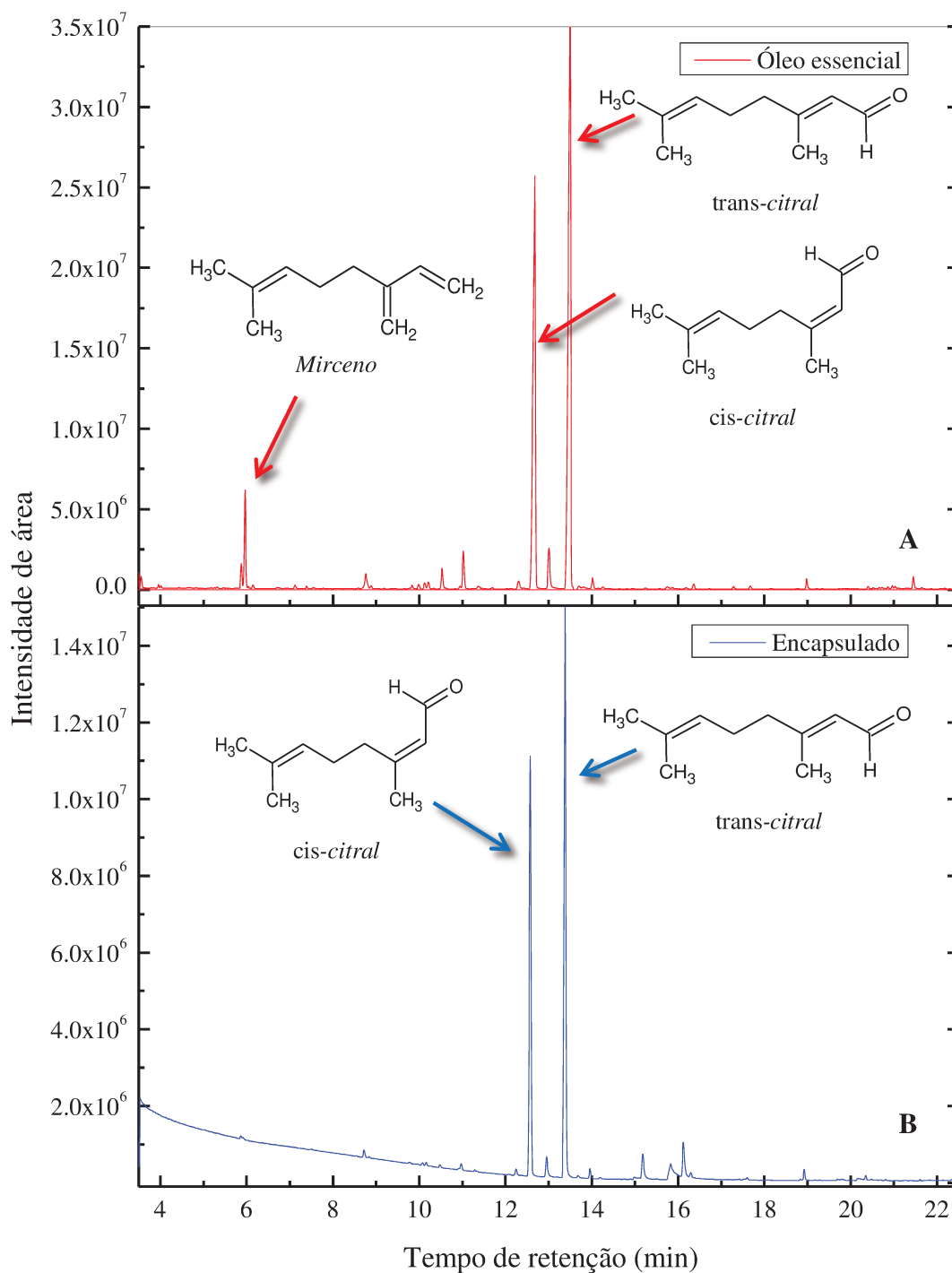


Figura 16. Perfis cromatográficos (intensidade de área em função do tempo) do óleo essencial de campim-limão (*Cymbopogon citratus*) puro (A) e do conteúdo das partículas sintetizadas extraído com hexano e sonicação por 90 min (B), ambos obtidos por GC-MS. As estruturas moleculares dos constituintes principais estão indicadas nos picos cromatográficos respectivos a elas.

2.2 Constituintes do óleo essencial de capim-limão que foram encapsulados

Na Figura 16 são apresentados os cromatogramas das amostras de óleo essencial puro e a fração encapsulada, sendo que estes dados se referem ao experimento onde foram empregadas as seguintes condições para produção das microcápsulas: velocidade de agitação de 150 osc min^{-1} , acidificação gradual do meio e 2,5 % *m/m* de óleo essencial. A Tabela 11 compara a composição da fração pura e encapsulada e a proporção de cada substância identificada.

Tabela 11. Comparação entre as proporções dos constituintes do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) e da fração encapsulada em envoltório de melamina-formaldeído, analisada por GC-MS.

Substância	Proporção no óleo essencial (%)	Proporção na fração encapsulada (%)
6-metil-5-hepten-2-ona	1,4	0,1
β -Mirceno	5,7	—
<i>cis</i> - β -Ocimeno	0,2	—
<i>trans</i> - β -Ocimeno	0,1	—
β -Linalol	1,2	0,5
Verbenol	0,3	0,1
<i>trans</i> -Crisantemal	0,4	0,2
β -Citronelal	0,5	0,2
β -Terpineol	1,3	—
<i>p</i> -Menth-1-en-3-ol	0,1	0,4
α -Terpineol	2,4	—
β -Citronelol	0,7	0,4
<i>cis</i> -Citral	32,9	32,0
Geraniol	3,4	1,7
<i>trans</i> -Citral	45,7	48,6
2-Undecanona	0,7	0,7
Acetato de geranila	0,3	0,4
β -Cariofileno	0,2	0,1
α -Bergamoteno	0,2	0,1
2-Tridecanona	0,6	0,7
Óxido de cariofileno	0,1	0,2
Selina-6-en-4-ol	0,1	0,1

—: a substância não foi encontrada ou está abaixo do limite de detecção da técnica.

Vê-se que a porção encapsulada apresentou percentual de constituintes menor que o exibido pelo óleo essencial original (86,2 e 98,5 %, respectivamente). Isto ocorreu devido a um aumento do percentual de alguns componentes em detrimento da diminuição ou ausência de outros. Comportamento semelhante foi encontrado por Leimann e colaboradores na encapsulação de capim-limão por coacervação simples [79]. A não encapsulação de alguns componentes como mirceno, ocimeno e terpineol deveu-se à perda por volatilização das substâncias, mas também à solubilidade em água de algumas delas.

2.3 Fração volátil do óleo essencial de capim-limão

Assim como fragrâncias, os óleos essenciais são uma mistura complexa de dezenas a centenas de substâncias voláteis, que possuem características odorantes. Uma vez que estas substâncias diferem entre si em volatilidade, a percepção olfativa de uma fragrância ao seu redor muda em função da taxa de evaporação e tempo. Com esta finalidade, a constituição da fração volátil do óleo essencial foi caracterizada em dois tempos distintos: zero e 24 h após a inserção de uma alíquota de amostra em *vial* fechado.

A Figura 17 mostra os perfis cromatográficos obtidos para os tempos 0 e 24 h. A Tabela 12 relaciona as substâncias identificadas e as áreas dos picos cromatográficos com as duas amostragens utilizadas. No cromatograma A, vê-se que ocorreu uma inversão dos picos majoritários: mirceno, mais volátil, corresponde cerca de 50 % da área cromatográfica total. O cromatograma B, obtido após 24 h em ambiente fechado, mostrou um perfil cromatográfico semelhante ao observado na Figura 16-A. Neste caso, a proporção dos constituintes foi próxima à encontrada no óleo essencial (Tabela 11), ainda que não fossem identificadas substâncias com menor volatilidade no *headspace* após 24 h, como, por exemplo: acetato de geranila, β -cariofileno, α -bergamoteno, óxido de cariofileno e selin-6-en-4-ol.

Nota-se, portanto, que os constituintes da fração volátil do óleo essencial de *C. citratus* e as proporções entre eles alteraram-se em função do tempo, modificando seu perfil cromatográfico e também seu perfume. Como o ambiente foi mantido fechado, os constituintes tenderam a equilibrar-se em proporção semelhante à encontrada no óleo essencial.

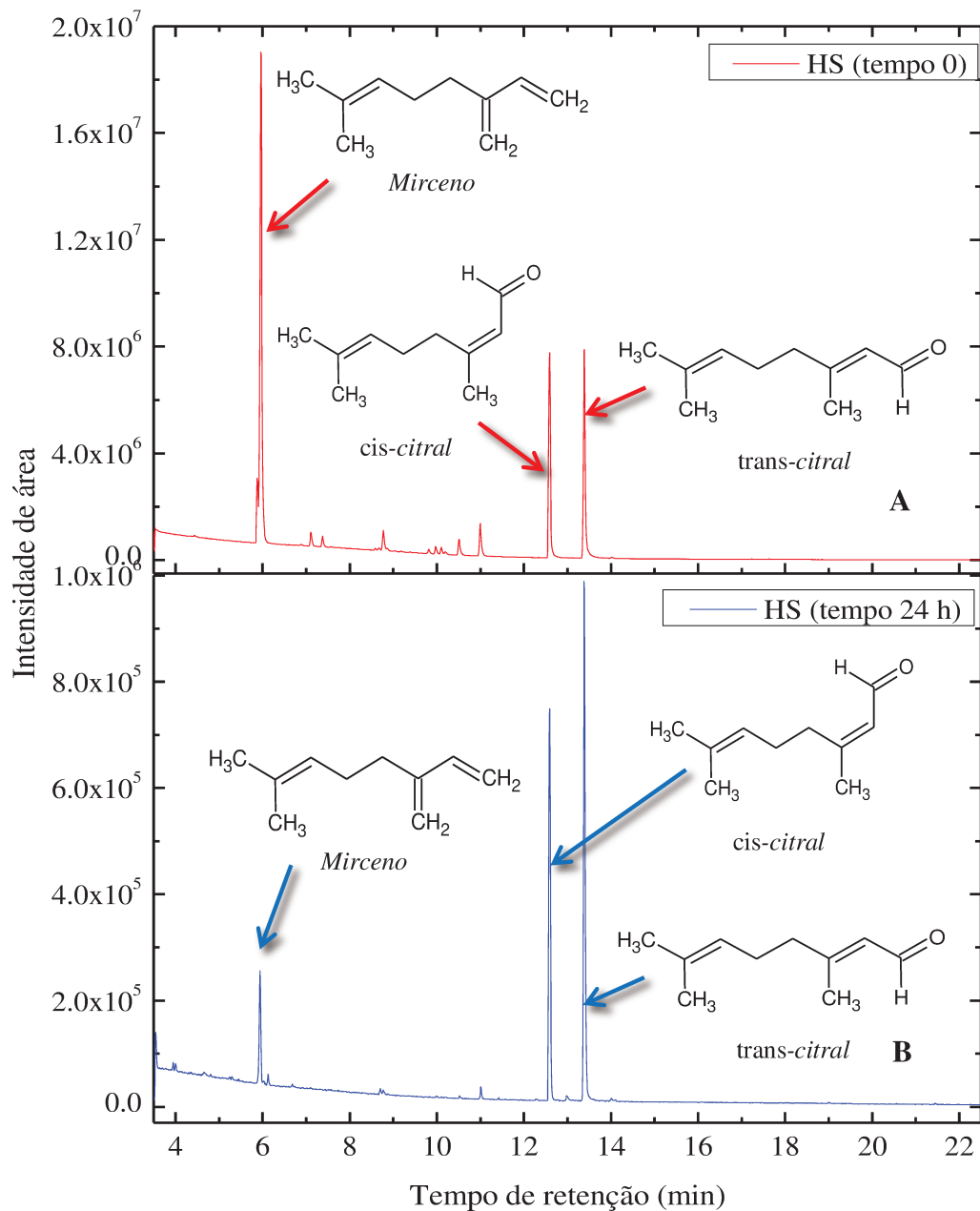


Figura 17. Perfis cromatográficos (intensidade de área em função do tempo) da fração volátil (*headspace*) em sistema fechado imediatamente após inserção de óleo de capim-limão em *vial* (A, HS tempo 0) e após 24 h (B, HS – 24 h), obtidos por GC-MS.

Tabela 12. Comparação das proporções das substâncias presentes no óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) e de seu *headspace* imediatamente após a colocação do óleo volátil em *vial* fechado (HS – 0 h) e após 24 h (HS – 24 h).

	Substância	Proporção no óleo essencial (%)	Área relativa para HS – 0h	Área relativa para HS – 24h
1	6-metil-5-hepten-2-ona	1,4	5,2	—
2	β -Mirceno	5,7	46,5	9,2
3	<i>cis</i> - β -Ocimeno	0,2	1,2	—
4	<i>trans</i> - β -Ocimeno	0,1	0,9	0,5
5	β -Linalol	1,2	1,9	0,4
6	Verbenol	0,3	0,7	0,1
7	<i>trans</i> -Crisantemal	0,4	0,6	—
8	β -Citronelal	0,5	0,2	—
9	β -Terpineol	1,3	1,5	0,2
10	<i>p</i> -Menth-1-en-3-ol	0,1	—	—
11	α -Terpineol	2,4	3,02	0,8
12	β -Citronelol	0,7	—	0,2
13	<i>cis</i> -Citral	32,9	18,2	36,4
14	Geraniol	3,4	—	0,4
15	<i>trans</i> -Citral	45,7	19,6	50,4
16	2-Undecanona	0,7	—	0,4
17	Acetato de geranila	0,3	—	—
18	β -Cariofileno	0,2	—	—
19	α -Bergamoteno	0,2	—	—
20	2-Tridecanona	0,6	—	0,1
21	Óxido de cariofileno	0,1	—	—
22	Selin-6-en-4-ol	0,1	—	—

Proporção relativa dos constituintes obtida por normalização de áreas, a partir da área obtida por meio de integração manual e automática dos picos cromatográficos.

3. Perfis de liberação

Os perfis de liberação de perfume foram tomados ao longo do tempo a partir do *headspace* de mechas de cabelo, após aplicação de formulações de xampu e condicionador sem enxágue (*leave-on*), contendo óleo essencial livre ou encapsulado, conforme descrito na Tabela 3. Para maior correlação com a realidade, e para que não houvesse saturação do espaço confinado, as mechas de cabelo permaneceram em ambiente com umidade e temperatura controladas ($UR \approx 58\%$, $T \approx 23^\circ\text{C}$), sendo inseridas em frasco fechado apenas 10 minutos antes de serem extraídos com a fibra de PDMS, conforme descrito no capítulo IV. As formulações contendo fragrância encapsulada foram formuladas com as partículas obtidas no ensaio B, descrito na Tabela 6.

A investigação permitiu avaliar o comportamento dos constituintes voláteis da fragrância frente à matriz complexa (cabelo), bem como se a aplicação desta fragrância encapsulada prolonga seu período de liberação.

3.1 Mechas tratadas com formulações contendo fragrância pura

Voláteis encontrados

A Tabela 13 apresenta as substâncias presentes no óleo essencial de capim-limão que puderam ser identificadas após a aplicação de cada formulação em cabelos. Conforme esperado, vê-se que algumas substâncias permaneceram por mais tempo em relação a outras, evidenciando a presença de notas de cabeça, corpo e fundo, como mostrado no capítulo I.

Analisando o perfil de liberação das amostras tratadas com xampu, nota-se que foram encontradas 12 das 22 substâncias presentes no óleo essencial puro (Tabela 10). As outras substâncias foram provavelmente levadas pelo procedimento de enxague, mostrando pouca ou nenhuma interação com a fibra capilar.

Um menor número de substâncias foi encontrado nos cabelos tratados apenas com condicionador. Isto não era esperado, uma vez que na aplicação desta formulação, não houve procedimento de enxágue. Ainda, o número e tipo de substâncias, encontradas ao longo do tempo para esta formulação, foram diferentes dos encontrados para as mechas tratadas com xampu contendo a mesma fragrância. Isto pôde ser observado, por exemplo, para o β -mirceno: a substância permaneceu no cabelo tratado com xampu até 8 h de análise, entretanto não foi mais detectada após a segunda hora de análise nas mechas tratadas com condicionador. O contrário ocorreu para a 2-tridecanona. A substância geraniol não foi detectada após o tempo inicial de análise das mechas tratadas com a formulação de xampu, enquanto que a ausência de mirceno, verbenol, terpineol, após este tempo inicial de análise, foi detectada no tratamento com condicionador sem enxágue (Tabela 13).

Tabela 13. Substâncias provenientes do óleo essencial de capim-limão, retidas em mechas de cabelo após tratamento com xampu ou condicionador sem enxágue contendo o óleo volátil como fragrância.

	Tempo após aplicação da formulação (h)	Substâncias retidas ¹	Número de substâncias
Xampu	0	β -mirceno, β -linalol, verbenol, β -terpineol, α -terpineol, <i>cis</i> -citral (neral), geraniol, <i>trans</i> -citral (geranial), 2-undecanona, β -cariofileno, α -bergamoteno, 2-tridecanona	12
	1	β -mirceno, β -linalol, verbenol, β -terpineol, α -terpineol, <i>cis</i> -citral (neral), <i>trans</i> -citral (geranial), 2-undecanona, β -cariofileno, α -bergamoteno	10
	2	β -mirceno, β -linalol, <i>cis</i> -citral (neral), <i>trans</i> -citral (geranial), 2-undecanona	5
	6	β -mirceno, β -linalol, <i>cis</i> -citral (neral), <i>trans</i> -citral (geranial)	3
	8	β -mirceno	1
	Total	12 substâncias	
Condicionador sem enxágue	0	β -mirceno, β -linalol, verbenol, β -terpineol, α -terpineol, <i>cis</i> -citral (neral), geraniol, <i>trans</i> -citral (geranial), 2-undecanona, 2-tridecanona	8
	1	β -linalol, <i>cis</i> -citral (neral), <i>trans</i> -citral (geranial), 2-undecanona, 2-tridecanona	5
	3	<i>cis</i> -citral (neral), <i>trans</i> -citral (geranial), 2-undecanona, 2-tridecanona	4
	6	<i>cis</i> -citral (neral), <i>trans</i> -citral (geranial), 2-tridecanona	3
	Total	8 substâncias	

1. apresentadas em ordem de eluição.

Ademais, as substâncias β -cariofileno e α -bergamoteno – presentes no óleo essencial, mas ausentes na caracterização de seu *headspace* (Tabela 12) – foram detectadas nas análises das mechas de cabelo tratadas tanto com xampu, quanto com condicionador.

Perfis de liberação

Com a finalidade de avaliar a interação das substâncias provenientes da fragrância com a fibra capilar, os perfis de liberação foram construídos, para cada substância, na forma de decaimento de áreas em função do tempo de análise. Para isso, considerou-se a área no tempo 0 (zero) de análise para determinado pico cromatográfico como sendo 100 %, e as áreas obtidas nos tempos subsequentes foram calculadas relativamente à área inicial.

Os resultados acerca dos perfis de liberação das substâncias fragrantes são interpretados e comparados em termos de suas “persistências”. Desta forma, quanto maior a persistência de uma substância no fio de cabelo, maior será o tempo de sua detecção no *headspace* da amostra. Neste caso, a sua velocidade de decaimento também será menor em relação a outras substâncias com menor persistência.

Ainda, para fins de comparação, os perfis de liberação apresentados serão discutidos para aquelas substâncias que compõem uma fração do óleo essencial maior que 0,5 % em área. Considerando a diluição do óleo essencial nas formulações, estas substâncias poderiam encontrar-se próximas ou fora do limite de quantificação da técnica analítica empregada nas análises, o que compromete a análise correta de sua interação com a fibra capilar.

A Figura 18 apresenta os perfis de liberação da fragrância provenientes das mechas de cabelo tratadas com formulações de xampu (Figura 18-A) ou condicionador sem enxágue (Figura 18-B) contendo óleo essencial de capim-limão. Nota-se que as substâncias diminuíram de intensidade abruptamente até a segunda hora de análise e depois assumiram um declínio lento, o que caracteriza um decaimento exponencial. Isto não foi válido apenas para a substância linalol liberada a partir das mechas tratadas com condicionador (Figura 18-B), que apresenta um decaimento linear. Entretanto, esta substância foi detectada apenas até a primeira hora de análise.

Considerando os pontos relativos às médias das áreas cromatográficas, obtidos a partir da primeira hora de análise, e aplicando a eles o teste estatístico T para diferença de médias, foi possível agrupar as substâncias analisadas de acordo com o padrão de suas curvas de decaimento. Logo, foi possível relacionar este comportamento com a persistência destas substâncias nas mechas de cabelo tanto para as mechas tratadas com xampu, quanto para aquelas tratadas com formulação de condicionador sem enxágue. Assim, com 90 % de confiança ($p < 0,10$) a ordem de persistência dos constituintes da fragrância nas mechas tratadas com xampu foi:

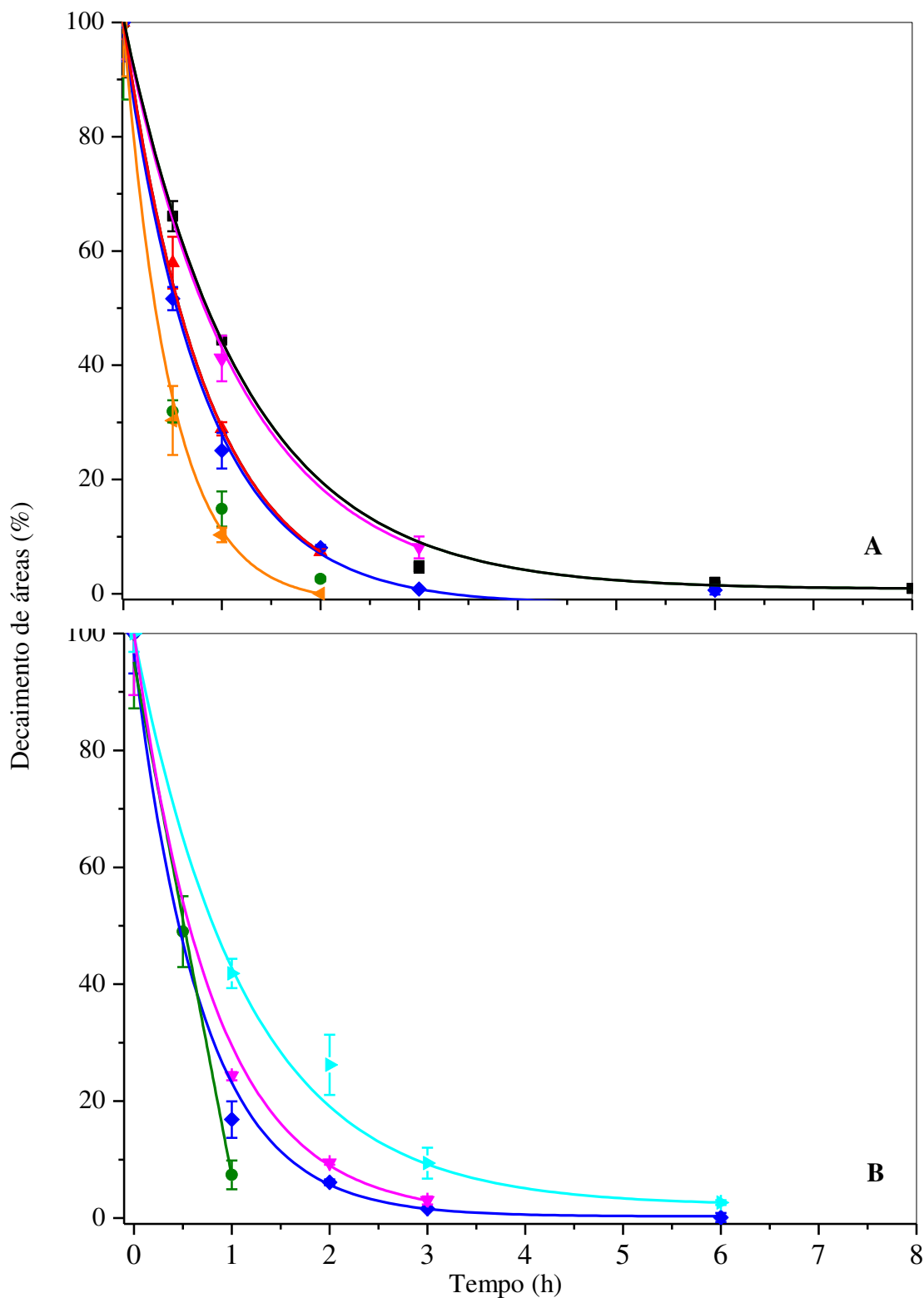


Figura 18. Perfis de liberação dos constituintes do óleo essencial de capim-limão incorporado em formulações após aplicação de xampu (A) e condicionador sem enxágue (B) em mechas de cabelo. Substâncias: mirceno (■), linalol (●), geraniol (▲), 2-undecanona (▼), citral (◆), terpineol (◀), 2-tridecanona (▶).

Mirceno \approx 2-undecanona $>$ citral \approx geraniol $>$ linalol \approx terpineol

Enquanto que, nas mechas tratadas com condicionador sem enxágue, a ordem foi a seguinte:

2-tridecanona $>$ 2-undecanona \approx citral $>$ linalol

Os tempos de retenção determinados pelo cromatógrafo para os componentes de um óleo essencial (Tabela 10) levam a uma indicação da volatilidade relativa para cada substância [21], e conforme mostrado na caracterização da fração volátil do óleo essencial ao longo do tempo (Tabela 12). Entretanto, a ordem de eluição dos componentes não concordou totalmente com as ordens de persistência encontradas a partir dos perfis de liberação. O componente mirceno, por exemplo, é aquele que possui maior volatilidade em relação às outras substâncias, mas é o que mais persistiu nas mechas tratadas com xampu.

3.2 Mechas tratadas com condicionador sem enxágue contendo fragrância encapsulada

De acordo com Bône e colaboradores [51], a liberação de fragrância a partir das cápsulas de melamina-formaldeído, sintetizadas por polimerização *in situ*, ocorre após o rompimento do envoltório resinoso. Para que isto pudesse ser comprovado, os perfis de liberação de fragrância a partir das mechas de cabelo tratadas com condicionador sem enxágue foram tomados de duas maneiras distintas. As mechas foram penteadas cinco vezes antes de cada coleta de voláteis, e os perfis de liberação foram comparados com aqueles obtidos a partir de mechas que não foram penteadas. Estes decaimentos são mostrados na Figura 19.

A Figura 19 compara os perfis de liberação a partir do material encapsulado com aqueles obtidos após aplicação de condicionador sem enxágue contendo óleo essencial puro para as substâncias citral, linalol e geraniol. Nota-se que, a partir da segunda hora de análise em diante, as substâncias analisadas, nas formas encapsuladas, apresentaram intensidade no *headspace* da amostra significativamente maior ($p < 0,1$) em relação a sua forma não encapsulada, mostrando que, conforme esperado, a liberação de fragrância ocorreu de maneira sustentada.

A persistência dos componentes foi 2 vezes maior para o citral e 12 vezes maior para o linalol, nas mechas tratadas com condicionador sem enxágue contendo a fragrância encapsulada, evidenciando o êxito do processo de encapsulação. Além disso, o componente geraniol, que não havia sido detectado após a aplicação da formulação contendo óleo essencial puro, foi identificado por, no mínimo, 12 h após a aplicação da formulação contendo as cápsulas.

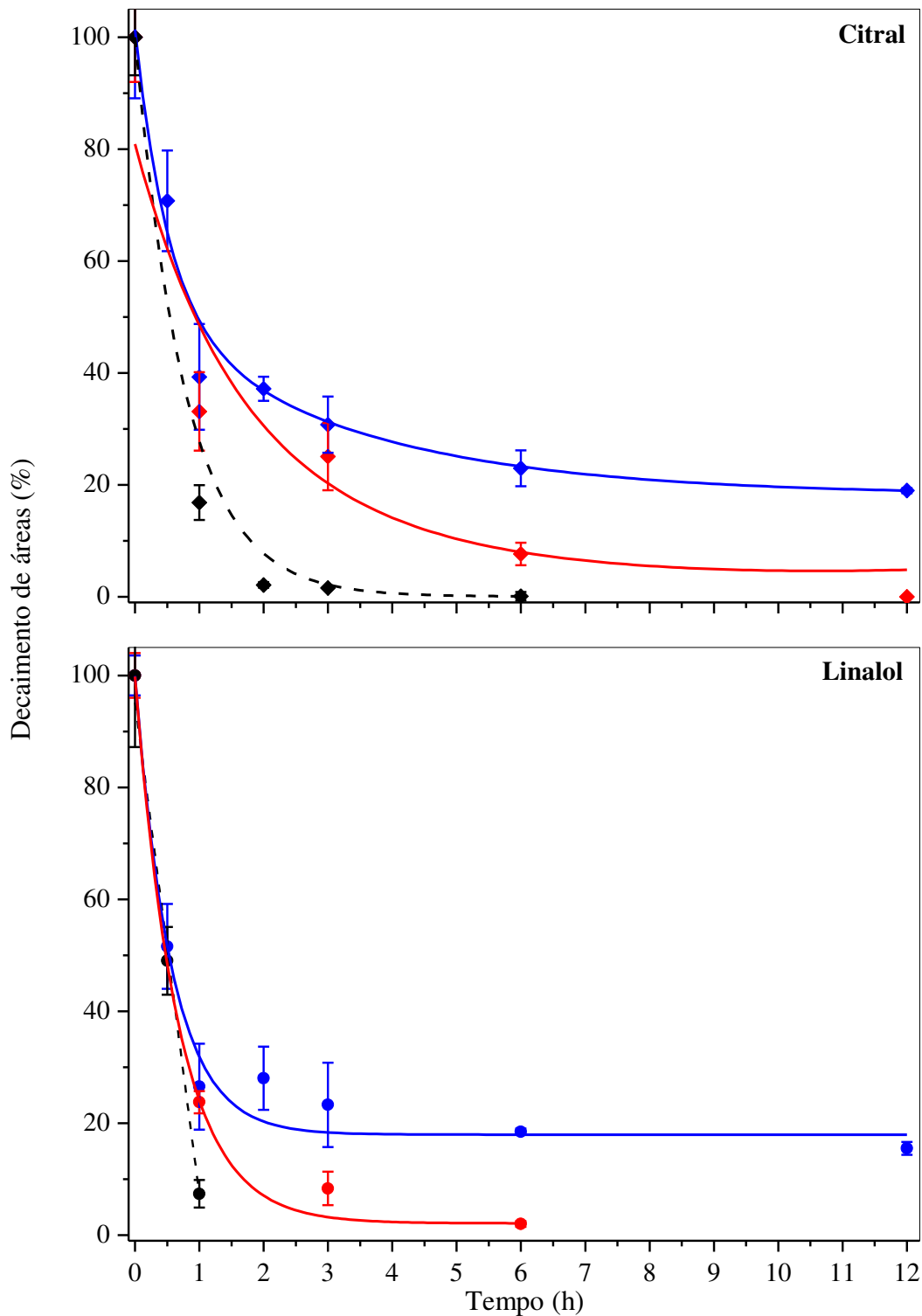


Figura 19. Perfis de liberação de fragrância provenientes das mechas de cabelo tratadas com formulações de condicionador sem enxágue contendo óleo essencial puro (linhas tracejadas) ou encapsulado (linhas cheias) submetidas à penteamento entre as análises (linhas azuis) ou não (linhas vermelhas). Substâncias analisadas: citral (◆), linalol (●) e geraniol (▲).

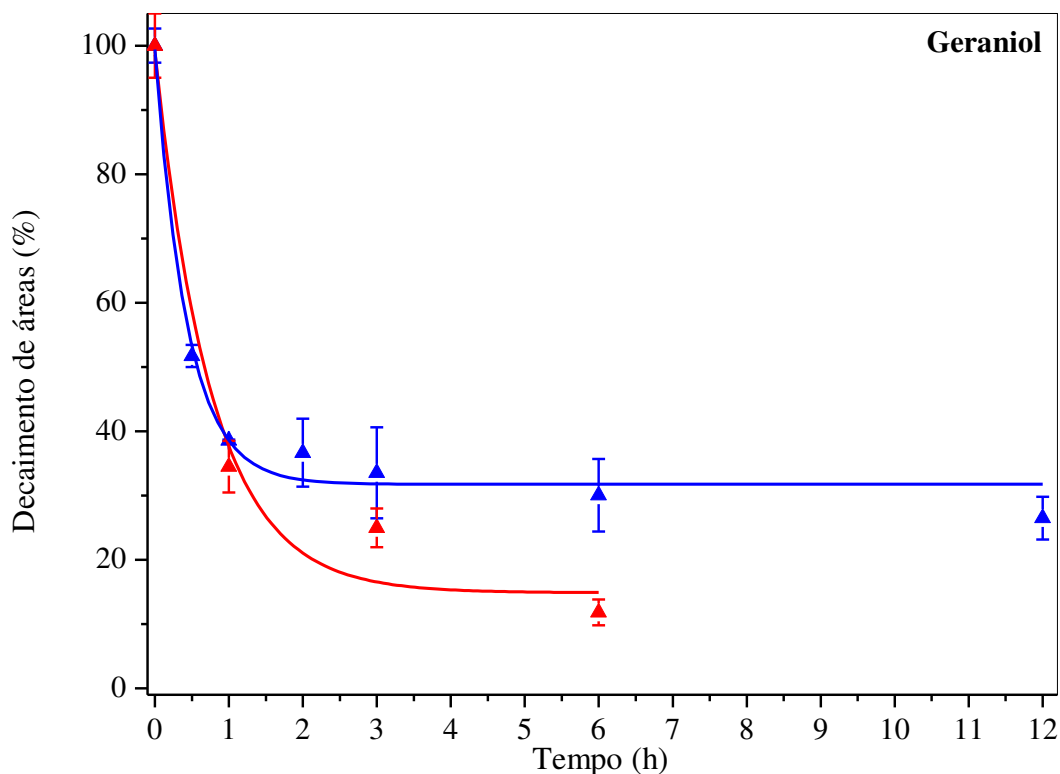


Figura 19 (continuação). Perfis de liberação de fragrância provenientes das mechas de cabelo tratadas com formulações de condicionador sem enxágue contendo óleo essencial puro (linhas tracejadas) ou encapsulado (linhas cheias) submetidas à penteamento entre as análises (linhas azuis) ou não (linhas vermelhas). Substâncias analisadas: citral (◆), linalol (●) e geraniol (▲).

Ainda, observa-se que a ordem de persistência das substâncias analisadas nas mechas tratadas com fragrância encapsulada foi diferente daquela apresentada para a fragrância livre (para este caso, citral > linalol >> geraniol), uma vez que estas substâncias podem ser notadas até a 12.^a hora de análise, mostrando que houve redução da volatilidade dos constituintes:

$$\text{citral} \approx \text{linalol} \approx \text{geraniol}$$

Vê-se, ainda, que, em todas as situações apresentadas pela Figura 19, os decaimentos das substâncias em função do tempo mantiveram-se seguindo o modelo exponencial. A queda abrupta na intensidade, observada a partir da primeira hora de liberação, sugere a presença de óleo essencial não encapsulado, adsorvido na superfície das cápsulas. Este comportamento pode, ainda, ser referente ao rompimento das estruturas maiores (com cerca de 10 μm) apresentadas pelas partículas obtidas no ensaio B, seguido da liberação a partir das cápsulas menores (menores que 1 μm) a partir da segunda hora de análise – consulte Tabela 6 e Figura 13.

Os perfis de liberação das mechas que não foram penteadas apresentaram persistência significativamente menor ($p < 0,10$) após a 6.^a hora em comparação àquelas que foram submetidas ao procedimento. Isto sugere que a fricção gerada pelo pente foi capaz de romper as cápsulas, sendo um dos responsáveis pela liberação de perfume. No entanto, sabe-se que mesmo quando não houve fricção, ocorreu liberação do perfume, que foi mais intensa e duradoura se comparado com a fragrância não encapsulada, sugerindo a presença de não apenas um mecanismo de liberação, conforme descrito na literatura [49, 80].

Para comprovar esta hipótese, micrografias eletrônicas de varredura foram adquiridas de fios penteados ou não, que foram previamente tratados com fragrância encapsulada, conforme mostra a Figura 20. Nota-se a presença de cápsulas aderidas na superfície dos fios tratados com a fragrância encapsulada quando comparamos com aquele fio que não foi submetido a nenhum tratamento (Figura 20-A).

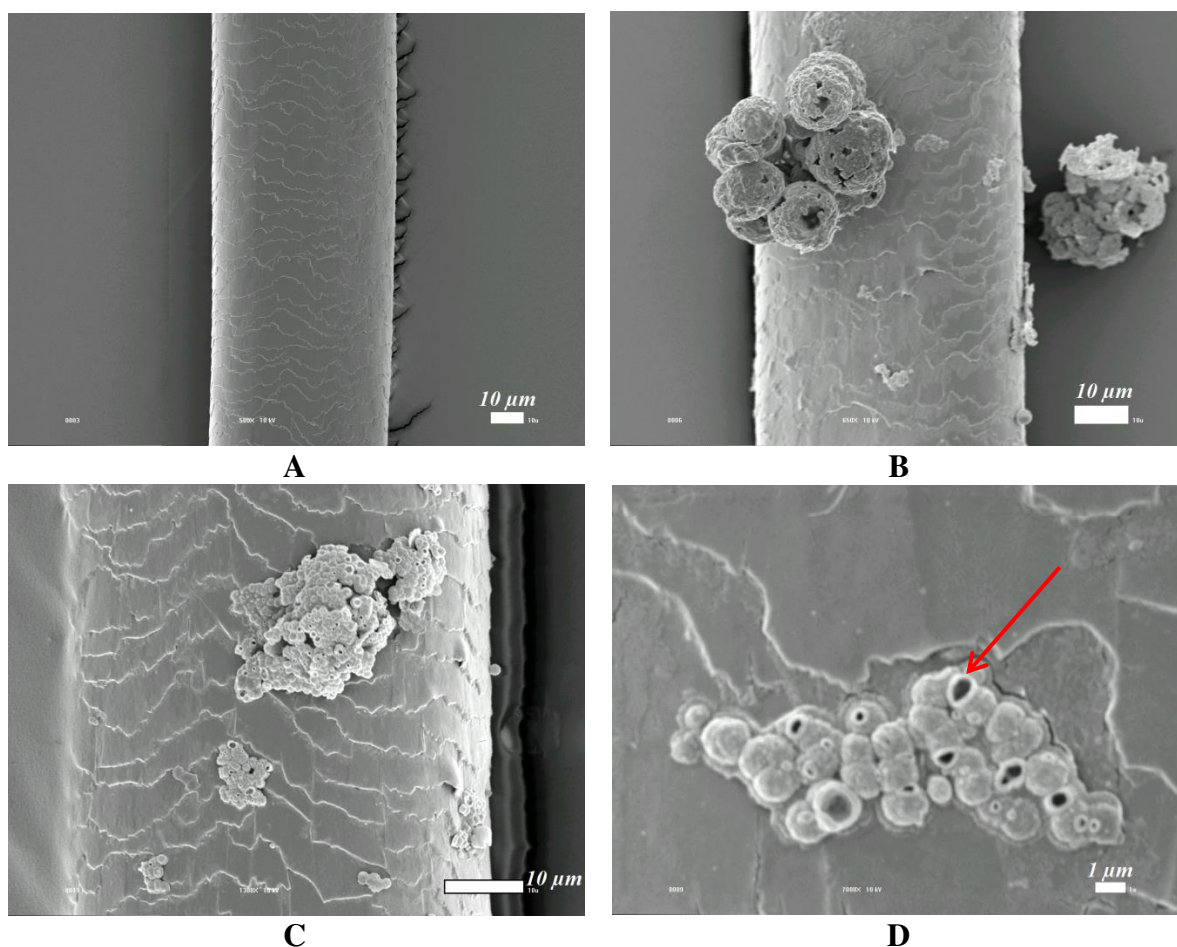


Figura 20. Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de fios de cabelo sem tratamento (A) ou tratados com condicionador sem enxágue contendo óleo essencial de capim-limão encapsulado como fragrância, não penteados (B) ou penteados (C). A figura (D) mostra em detalhe partículas aderidas no fio de cabelo e rompimento de algumas após penteamento do fio; a seta aponta uma cápsula rompida.

Vê-se que, naqueles fios que não foram penteados (Figura 20-B), as cápsulas aderidas na superfície do fio possuíam morfologia idêntica a observada durante a fase caracterização (Figura 13-B), mostrando que a integridade das cápsulas é mantida quando as mechas não são penteadas. Já naqueles fios submetidos a penteamento (Figura 20-C), nota-se que a morfologia esférica das cápsulas foi desfeita, sendo evidente o rompimento destas cápsulas após o procedimento de penteamento, como mostra o detalhe da Figura 20-D, indicado pela seta.

3.3 Mechas tratadas com xampu contendo fragrância encapsulada

Os perfis de liberação de fragrância após tratamento das mechas com xampu contendo óleo essencial de capim-limão encapsulado são apresentados na Figura 21.

Assim como nas mechas tratadas com condicionador sem enxágue, as substâncias majoritárias que foram encapsuladas (linalol, citral e geraniol) puderam ser detectadas ao longo do tempo no *headspace* das mechas. Por outro lado, ao contrário do que foi visto para as mechas tratadas com óleo essencial puro, as substâncias que foram encapsuladas 2-undecanona e 2-tridecanona não puderam ser detectadas após tratamento das mechas com xampu contendo óleo essencial de capim-limão encapsulado.

A Figura 21 compara as curvas de decaimento de áreas para cada substância encapsulada com aquelas obtidas a partir da fração livre de óleo essencial. Nota-se que não ocorreu modificação no perfil de liberação e persistência das substâncias analisadas, uma vez que não há diferenças significativas ($p > 0,1$) entre o decaimento das substâncias livres e o decaimento das mesmas substâncias encapsuladas. Isto contraria a lógica de liberação para ativos encapsulados, que é a de retardamento em sua liberação ao longo do tempo [49].

Foi visto no tópico anterior que a liberação de fragrância encapsulada ocorreu após o rompimento da cápsula. No caso da fragrância proveniente das mechas de cabelo tratadas com formulações de xampu, a coincidência entre os perfis de liberação das substâncias encapsuladas e não encapsuladas sugere que o material encapsulado não se rompeu após a aplicação da formulação ou, ainda, que as cápsulas foram arrastadas pelo procedimento de enxágue.

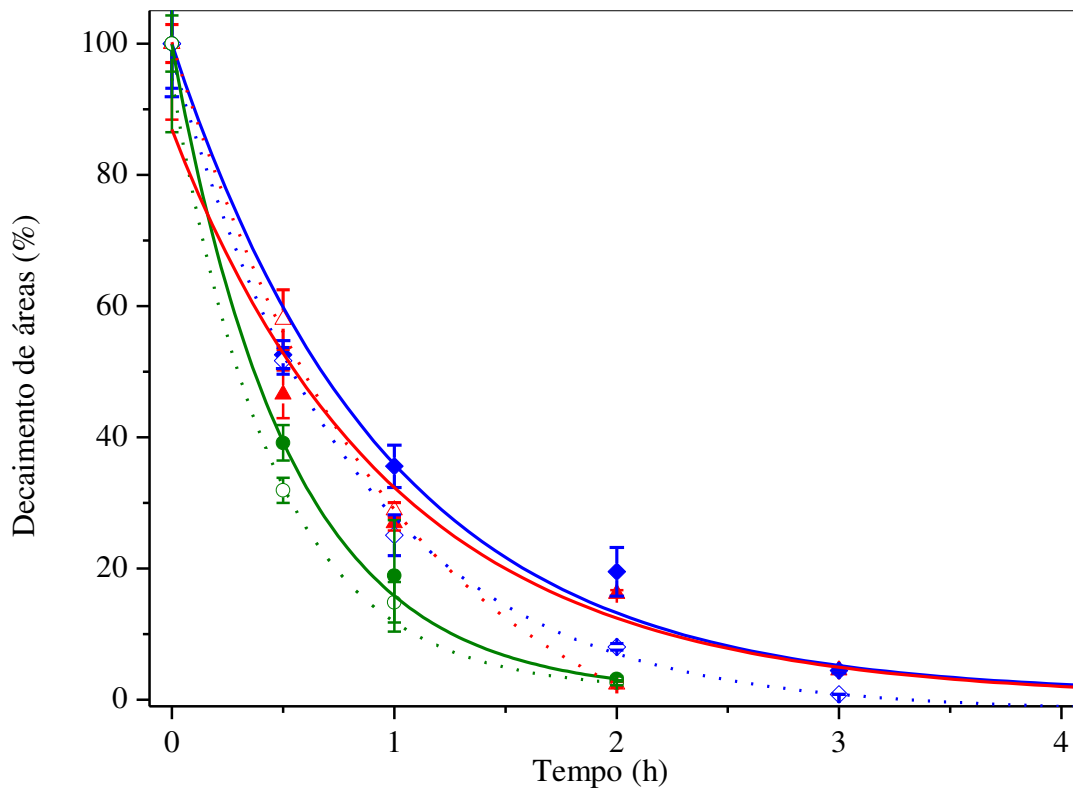


Figura 21. Perfis de liberação de fragrância provenientes das mechas de cabelo tratadas com formulações de xampu contendo óleo essencial puro (linhas tracejadas) ou encapsulado (linha cheia). Substâncias analisadas: citral (◆), geraniol (▲), linalol (●).

VI. DISCUSSÃO

1. Perfis de liberação

Com o objetivo principal de propor as possíveis interações responsáveis pelo comportamento dos perfis de liberação de fragrância descritos, os resultados obtidos neste trabalho são discutidos levando-se em conta propriedades físico-químicas e estruturais das substâncias estudadas, bem como da matriz à qual foram aplicadas – o cabelo.

Para fomentar a discussão dos resultados, os dados teóricos de propriedades físico-químicas das substâncias identificadas no óleo essencial de capim-limão são apresentados na Tabela 14. Por sua vez, as estruturas moleculares daquelas substâncias majoritárias encontram-se na Figura 22.

Propriedades físico-químicas das substâncias estudadas e sua persistência em cabelos

Foi visto que a ordem de persistência das substâncias presentes no óleo essencial estudado, ao contrário do que se esperava, não é totalmente inversa à sua ordem de eluição no cromatograma, ou à ordem de volatilização por elas apresentada na investigação da composição da fração volátil do óleo essencial. Por exemplo, no perfil de liberação do xampu contendo fragrância livre, o componente mirceno é aquele que apresenta maior persistência em relação aos outros. Entretanto, é o que possui o menor tempo de retenção (5,964 min) e maior volatilidade.

No capítulo I, vimos que o odor de uma substância é percebido quando ela se volatiliza, tendo potencial de atingir o sistema olfativo humano. A volatilidade de uma substância representa a sua facilidade de passar do estado líquido para o estado de vapor e está positivamente correlacionada com sua pressão de vapor. A pressão exercida pelo vapor de uma dada substância, quando em equilíbrio termodinâmico com a fase líquida, é denominada “pressão de vapor”. Assim, a pressão de vapor é uma medida de tendência de evaporação de um líquido. Portanto, poderíamos inferir que quanto maior a pressão de vapor de uma substância fragrante, menor será sua taxa de evaporação e, como consequência, maior a sua persistência em um determinado substrato.

Analisando os dados teóricos de pressão de vapor (em mmHg) (Tabela 14), vê-se que as ordens crescentes de volatilidade para as substâncias – consideradas nos perfis de liberação de fragrância não encapsulada –, proveniente de cabelos tratados com xampu ou condicionador sem enxágue são, respectivamente:

Tabela 14. Propriedades físico-químicas das substâncias identificadas no óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus*, DC. Stapf), retiradas de [29].

Substância	Massa molecular (Da)	Ponto de ebulição (°C, 760,00 mmHg)	Pressão de vapor (mmHg, 25 °C)	logP ¹ (o/a)
6-metil-5-hepten-2-ona	126,2	173,1	1,277	1,947
β-Mirceno	136,2	166,5	2,290	4,170
<i>cis</i> -β-Ocimeno	136,2	177	1,560	4,700
<i>trans</i> -β-Ocimeno	136,2	174,5	1,559	4,418
β-Linalol	154,2	195,5	0,016	2,970
Verbenol	152,2	214,5	0,033	2,554
<i>trans</i> -Crisantemal	152,2	186,4	0,065	2,940
β-Citronelal	154,3	206,5	0,028	3,297
β-Terpineol	154,3	209,5	0,034	2,837
<i>p</i> -Ment-1-en-3-ol	154,3	231	0,020	2,919
α-Terpineol	154,3	216	0,028	2,670
β-Citronelol	156,3	225	0,020	3,300
<i>cis</i> -Citral	152,2	228	0,071	3,170
Geraniol	154,3	229,5	0,021	3,560
<i>trans</i> -Citral	152,2	228	0,071	3,450
2-Undecanona	170,3	231,5	0,098	4,090
Acetato de geranila	196,3	242,5	0,026	4,040
β-Cariofileno	204,4	275,5	0,013	6,300
α-Bergamoteno	204,4	260,5	0,020	6,535
2-Tridecanona	198,3	263,0	0,016	5,053
Óxido de cariofileno	220,3	279,7	0,007	4,429
Selina-6-en-4-ol	222,4	298,5	0,001	5,010

1. coeficiente de partição octanol/água empírico, obtido a 25 °C.

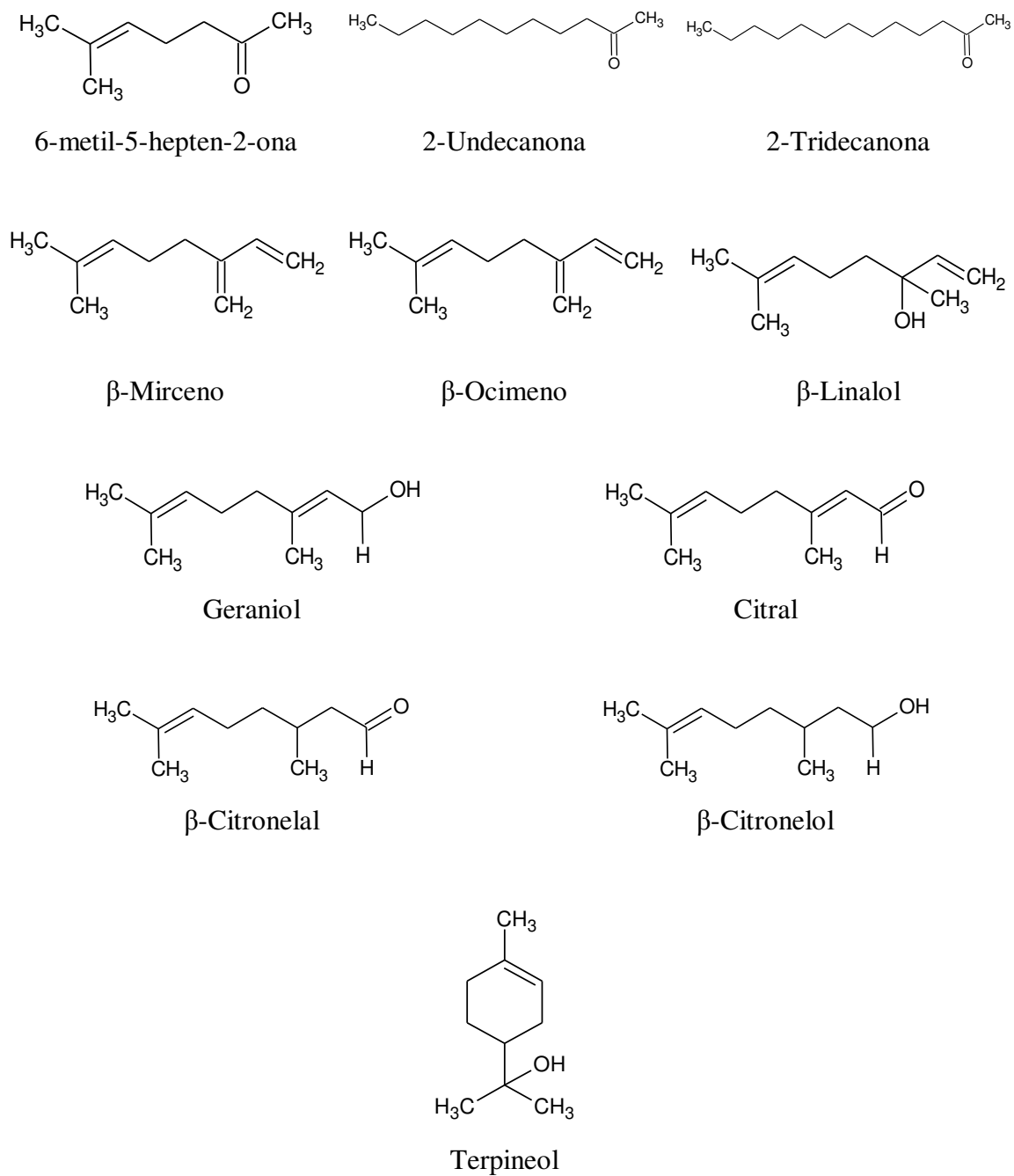


Figura 22. Estruturas moleculares das substâncias majoritárias identificadas no óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus*, DC. Stapf).

Linalol (0,02) \approx geraniol (0,02) \approx terpineol (0,03) < citral (0,07) < 2-undecanona (0,10) < mirceno (2,29)

E linalol (0,02) \approx 2-tridecanona (0,02) < citral (0,07) < 2-undecanona (0,10)

As ordens de volatilidade descritas diferem da ordem de persistência encontrada em ambas as situações (mirceno \approx 2-undecanona > citral \approx geraniol > linalol \approx terpineol, para xampu, e 2-tridecanona > 2-undecanona \approx citral > linalol, para condicionador sem enxágue).

A correlação entre volatilidade e persistência de uma molécula fragrante é encontrada na literatura em [12, 18, 21, 23]. Estes autores consideram, entretanto, que a volatilidade de uma dada substância fragrante pode ser alterada por outras propriedades que influenciam a interação entre esta substância e a matriz na qual ela é aplicada. Estas propriedades refletem uma alteração no perfil de liberação de uma composição fragrante. Neste estudo, exploraremos as propriedades hidrofóbicas das substâncias, uma vez que a aplicação ocorre em queratina, uma matriz insolúvel.

Em geral, uma substância é considerada hidrofóbica quando apresenta baixo grau de solubilização em solventes polares e alto grau de solubilização em solventes apolares. Uma vez que se trata de uma medida relativa, uma forma de representar numericamente a hidrofobicidade (ou lipofilicidade) de uma substância é calculando, ou obtendo empiricamente, seu coeficiente de partição entre uma fase aquosa e uma oleosa. O coeficiente de partição óleo-água é denominado $\log P$.

Desta forma, foram considerados os valores de $\log P$ para as substâncias estudadas, como medida de hidrofobicidade (Tabela 14). Para as substâncias consideradas nos perfis de liberação de fragrância não encapsulada, provenientes de cabelos tratados com xampu ou condicionador sem enxágue, obteve-se a seguinte ordem de lipofilicidade, respectivamente:

Mirceno (4,2) > 2-undecanona (4,1) > geraniol (3,6) > citral (3,3) > linalol (2,9) > terpineol (2,8)

E 2-tridecanona (5,1) > 2-undecanona (4,1) > citral (3,3) > linalol (2,9)

Nota-se que a ordem de $\log P$ é coerente com as ordens de persistência apresentadas, mostrando, portanto, que este parâmetro deve ser levado em consideração para prever o comportamento dos perfis de liberação de fragrância em cabelos.

Analisando as estruturas químicas das substâncias aqui discutidas (Figura 22), vê-se que a maioria é classificada como monoterpenos, com modificações apenas em alguns grupos funcionais. A pressão de vapor de uma substância depende de sua massa e tamanho

moleculares, que no caso das substâncias estudadas, são muito próximos (Tabela 14), o que lhes confere pouca variação em termos de volatilidade. Neste caso, uma variação no valor de $\log P$ é mais sensível a estas mudanças estruturais.

Por exemplo: os isômeros *cis* e *trans*-citral possuem a mesma fórmula molecular, massa molecular e mesma pressão de vapor (0,07 mmHg). Entretanto, apresentam valores de coeficiente de partição distintos (3,2 vs. 3,5), o que reflete em perfis de liberação distintos, observado no percentual de decaimento na 1ª hora de análise (Tabela 15). Assim, pode-se afirmar que, para os cabelos e substâncias estudadas, quanto maior a hidrofobicidade da substância, maior sua persistência nos cabelos.

Tabela 15. Percentual de decaimento de áreas para os componentes *cis* e *trans*-citral, liberados a partir de mechas de cabelo tratadas com condicionador sem enxágue contendo óleo essencial de capim-limão como fragrância.

	Decaimento na 1ª hora (% de áreas)
<i>cis</i> -citral	86 ± 1
<i>trans</i> -citral	83 ± 1

Efeitos de matriz na liberação de fragrâncias

Comparando-se os resultados de caracterização da fração volátil do óleo essencial (Tabela 12) com aqueles apresentados nos perfis de liberação de seus constituintes (Tabela 13), notam-se mudanças de comportamento, conforme discutido.

Desta forma, a matriz, a partir da qual as moléculas fragrantes são liberadas, influencia no perfil de liberação e na persistência destas substâncias, e depende de fatores como área e morfologia de superfície, temperatura e a presença de grupos que facilitam ou dificultam as interações matriz–substância [12]. Em um estudo de liberação de fragrâncias aplicadas em pele de 80 voluntários, separados de acordo com a quantidade de sebo, grau de hidratação e pH, Viulleumier e colaboradores encontraram comportamentos distintos de acordo com o tipo de pele [13].

Sabe-se que o cabelo é formado basicamente pela proteína insolúvel queratina [2]. O cabelo virgem, ou quimicamente inalterado, apresenta uma superfície hidrofóbica devido às ligações de cistina encontradas na camada A e exocutícula. O material lipídico, por sua vez, também é responsável por esta hidrofobicidade [6].

De acordo com dados compilados por Robbins [4], a maior parte dos aminoácidos que compõe a fibra capilar possui cadeia lateral de hidrocarbonetos, seguida de uma menor

quantidade de aminoácidos hidroxilados, e dos menos frequentes aminoácidos básicos e ácidos. Esta alta frequência de aminoácidos hidrofóbicos justifica as interações com aquelas substâncias com maior valor de $\log P$. Além disso, um estudo com cabelos da década de 80 sugeriu que a interação cabelo–fragrância poderia estar relacionada com mecanismos de partição da fragrância entre a base de xampu em que foi veiculada e a queratina que constitui o fio de cabelo [14].

Apesar de constituir uma barreira a procedimentos químicos, esta superfície hidrofóbica do fio de cabelo é modificável. A ação do meio ambiente, danos mecânicos e tratamentos químicos, provocam modificações na composição química da cutícula, como a formação do ácido sulfônico, no caso da oxidação, e grupo tiol, devido à redução. Como consequência, observa-se uma diminuição do caráter hidrofóbico da cutícula, pois estes grupos são mais hidrofílicos que a ligação de dissulfeto [81]. Logo, supõe-se que cabelos quimicamente alterados apresentem comportamento distinto do encontrado neste estudo em relação ao perfil de liberação de fragrância.

Efeitos da encapsulação da fragrância

No estudo de liberação de fragrância encapsulada, quando aplicada por meio de xampu, não houve diferenças significativas na persistência de seus constituintes quando comparamos com a mesma composição não encapsulada. Neste caso, o procedimento de fricção do frio durante a lavagem – que é mais intenso que o ato de pentear – leva ao rompimento de cápsulas. Ainda, o enxágue da formulação dificulta a adesão das cápsulas, que são provavelmente lixiviadas.

Quando a fragrância foi aplicada por meio de formulação sem enxágue, vimos que a ordem de persistência das substâncias analisadas é diferente daquela apresentada para a fragrância livre. O tempo de análise não foi suficiente para que fossem detectadas diferenças entre os perfis dos componentes citral, linalol e geraniol.

Neste caso, vimos, também, que o penteamento das mechas promove uma liberação sustentada com maior intensidade, quando se compara com o perfil de liberação das mechas que não foram penteadas (Figura 19). Este procedimento compõe um dos principais gatilhos de liberação do perfume, uma vez que é responsável pelo rompimento das cápsulas, conforme mostrado nas micrografias eletrônicas da Figura 20.

Assim, a liberação do perfume depende de duas etapas limitantes, a saber:

1. Forças de adesão cápsulas–matriz.

As cápsulas precisam aderir na superfície do fio e permanecer aderidas ao longo da liberação do óleo essencial de seu interior.

2. Rompimento do envoltório da cápsula.

Dentre outros mecanismos, o principal é o rompimento do envoltório das cápsulas, que permite a liberação do óleo essencial nelas internalizado. Nesta etapa, a interação das substâncias isoladas com a superfície do cabelo não parece ser significativa, uma vez que não se pode estabelecer uma ordem de persistência, muito menos correlacionar com valores de coeficiente de partição, como na fragrância livre.

Perfil de liberação é modificado de acordo com a base cosmética na qual a fragrância está inserida

Vimos que a mesma fragrância, quando aplicada em formulações diferentes (xampu ou condicionador), apresenta composições de *headspace* distintas, o que leva a uma percepção de odor distinta.

Binks *et al.* [82] mostraram que emulsões de fragrâncias em SDS retardam a liberação de moléculas lipofílicas (*e.g.* limoneno) em detrimento de hidrofílicas (*e.g.* acetato de benzila). Takuoka *et al.* [83] afirmam que o desempenho de um perfume depende do coeficiente de distribuição das substâncias que o compõem entre a fase micelar e seio da solução. Outros autores mostram que pode haver diferentes interações entre tensoativos presentes em formulações cosméticas e fragrâncias e estas interações dependem do tipo de tensoativo [11, 84].

Assim, nossos resultados mostram que a base na qual a fragrância está inserida, mesmo que constituída simplesmente por um único tensoativo, influencia no perfil de liberação de fragrância em cabelos.

VII. CONCLUSÕES

Este estudo possibilitou concluir que:

O perfil de liberação de uma fragrância está intrinsecamente relacionado a propriedades físicas e químicas da matriz na qual é aplicada e das substâncias que constituem a fragrância. Observou-se que:

- a. A persistência das substâncias odoríferas que constituem a fragrância (óleo essencial de *C. citratus*), com massas moleculares próximas, em cabelos virgens, dependeu de sua lipofilicidade, variando de maneira positiva de acordo com os valores de coeficiente de partição óleo-água ($\log P$) das moléculas do perfume.
- b. A matriz estudada – cabelos virgens – contribuiu para que estas interações hidrofóbicas fossem estabelecidas com algumas substâncias da fragrância devido à sua composição.

A encapsulação de uma fragrância modifica as forças de adesão de suas substâncias em relação à matriz de aplicação, modificando sua persistência. Neste caso:

- c. O aumento da persistência dependeu da adesão das cápsulas no fio de cabelo.
- d. A liberação do perfume dependeu, em sua maior parte, que haja o rompimento o envoltório da cápsula.

Variando-se parâmetros do processo de encapsulação do óleo essencial de *C. citratus* pelo método de polimerização *in situ*, é possível modular morfologia e tamanho das partículas obtidas. Portanto:

- e. A acidificação abrupta do meio levou a formação de aglomerados, que não são reduzidos pelo aumento da velocidade de agitação empregada durante a formação das cápsulas; enquanto que a acidificação lenta do meio leva a formação de partículas esféricas e pouco agregadas, sendo que, neste caso, a velocidade de agitação influencia no tamanho das partículas, bem como na formação de agregados.
- f. Observou-se uma proporção ideal entre óleo essencial de *C. citratus* e os monômeros de melamina e formaldeído durante a encapsulação. No ensaio com 2,5 % de óleo essencial foi possível se obter valores adequados de percentual de encapsulação e de rendimento, não ocorrendo saturação em termos de percentual de encapsulação, o que já passou a ocorrer com o emprego de 5% de óleo essencial.

- g. Micropartículas esféricas ($d_H = 9 \pm 1 \mu\text{m}$) e rendimento de processo de 86 % foram obtidos com decaimento lento de pH aliado a agitação vigorosa durante a reação de formação. Estas partículas promoveram liberação controlada para os constituintes do óleo essencial linalol e citral (12 e 2 vezes maiores, respectivamente), mostrando um aumento da persistência da fragrância encapsulada quando inserida em formulação sem enxágue, modificando as forças de interação cabelo–fragrância

VIII. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Este estudo visou a encapsulação de óleo essencial para aplicação em formulações cosméticas capilares e a avaliação da interação e da persistência da fragrância livre e encapsulada em cabelos, abrindo perspectivas para outros estudos com abordagens, tais como:

- Investigar as possíveis mudanças no perfil de liberação de uma fragrância quando aplicada em cabelos modificados por oxidação (descoloração) ou redução química (alisamento).
- Estudar os mecanismos de sorção de fragrâncias na fibra capilar correlacionando as propriedades físico-químicas, estruturais e moleculares do soluto (fragrância) e do sorvente (fibra capilar) neste processo.
- Realizar planejamento experimental e análise quimiométrica do processo de encapsulação a fim de se aprimorar o método de obtenção e investigar outros possíveis parâmetros que possuem influência sobre a formação, distribuição de tamanho e morfologia do produto obtido.
- Avaliar se o percentual residual de formaldeído, proveniente da reação de polimerização *in situ* se encontra em níveis aceitáveis para que haja um estudo posterior de incorporação deste tipo de cápsulas em formulações cosméticas direcionadas ao consumidor;
- Avaliação do potencial para o emprego da fragrância encapsulada com envoltório de melanina-formaldeído em formulações cosméticas capilares. Esta abordagem envolveria:
 - Avaliação da toxicidade *in vitro* e *in vivo* das formulações cosméticas contendo a fragrância livre e encapsulada;
 - Estudos de estabilidade das preparações cosméticas, avaliando-se a degradação dos constituintes voláteis em diferentes condições de exposição.

IX. REFERÊNCIAS

- [1] C. Scanavez, M. Silveira, I. Joekes, “Human hair: color changes caused by daily care damages on ultra-structure”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **28**, 39–52, (2003)
- [2] D.L. Nelson, M.A. Cox, “Lehninger – Princípios de bioquímica”, 3ª Ed., São Paulo: Sarvier, 2002.
- [3] S. Naito, K. Arai, M. Hirano, N. Nagasawa, M. Sakamoto, “Crosslinking structure of keratin. V. Number and type of crosslinks in microstructures of untreated and potassium cyanide treated human hair”, *Journal of Applied Polymer Science*, **61**, 1913–25, (1996).
- [4] C.R. Robbins, “Chemical and physical behavior of Human hair”, 5th Ed., New York: Springer-Verlag, 2012.
- [5] J.A. Swift, “Human hair cuticle: Biologically conspired to the owner's advantage”, *Journal of Cosmetic Science*, **50** (1), 23–47, (1999).
- [6] J.A. Swift, B. Bews, “The chemistry of Human hair cuticle – I: a new method for the physical isolation of cuticle”, *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*, **25**, 13–22, (1974).
- [7] M. Feughelman, “Intermicrofibrillar linkages in α -keratin fibers”, *Textile Research Journal*, **49**, 704–9, (1979).
- [8] R.C.C. Wagner, P.K. Kiyohara, M. Silveira, I. Joekes, “Electron microscopic observations of human hair medulla”, *Journal of Microscopy*, **226**, 54–63, (2007).
- [9] Portal MEC. <http://portal.mec.gov.br/seb/arquivos/pdf/livro092.pdf>. Acessado em 02/01/2014.
- [10] F.J. Mottram, C.E. Lees, “Hair shampoos”. In: H. Butler (Ed.), “Poucher’s perfumes, cosmetics and soaps”. 10th Ed., Great Britain: Kluwer Academic Publishers, 2000.
- [11] P. Somasundaran, S. Chakraborty, N. Deo, T. Somasundaran, “Nanoencapsulation for extraction and release profile of fragrance”, *Cosmetics & Toiletries*, **121** (12), 47–54, (2006).
- [12] D.H. Pybus, C.S. Sell, “The chemistry of fragrances. From perfumer to consumer”, 2nd Ed. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2006.

-
- [13] C. Vuilleumier, I. Flament, P. Sauvegran, “Headspace analysis study of evaporation rate of perfume ingredients applied onto skin”, *International Journal of Cosmetic Science*, **17**, 61–76, (1995).
- [14] J.M. Blakeway, M. Seusalerno, “Substantivity of perfume materials to hair”, *International Journal of Cosmetic Science*, **5**, 15–23, (1983).
- [15] R. Brugliato, “Persistência de fragrância em cabelo”, Trabalho de Conclusão de Curso, Instituto de Química, UNICAMP, 2011.
- [16] F. Nakamura, “Permanência de fragrância proveniente do xampu no cabelo”, Trabalho de Conclusão de Curso, Instituto de Química, UNICAMP, 2012.
- [17] R. Ashcar, “Brasileirês: a cultura do perfume”. 1ª Ed., São Paulo: Nova Cultural, 2001.
- [18] S.J. Herman, “Applications II: Fragrance”. In: D.J. Rowe (ed.), “Chemistry and technology of flavors and fragrances”. 1st Ed., Oxford: Blackwell Publishing Ltd., 2009
- [19] C. Quellet, M. Schudel, R. Ringgenberg, “Flavors & fragrance delivery systems”, *Chimia*, **55** (5), 421–28, (2001).
- [20] K. Bauer, D. Garbe, H. Surburg, “Common fragrance and flavor materials. Preparation, properties and uses”. 4th Ed., Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag, 2001.
- [21] R.R. Calkin, J.S. Jellinek, “Perfumery raw materials”. In: R.R. Calkin, J.S. Jellinek (Eds.), “Perfumery. Practice and principles”. 1st Ed., New York: John Wiley & Sons, Inc., 1994.
- [22] P. Kraft, J.A. Bajgrowicz, C. Denis, G. Fráter, “Odds and trends: recent developments in the chemistry of odorants”, *Angewandte Chemie International Edition*, **39**, 2980–3010, (2000).
- [23] M. Teixeira, O. Rodríguez, A. Rodrigues, “Perfumery radar: a predictive tool for perfume family classification”. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **49**, 764–77, (2010).
- [24] C.M.D.O. Simões, E.P. Schenkel, G. Gosmann, J.C.P. Mello, L.A. Mentz, P.R. Petrovick, “Farmacognosia: da planta ao medicamento”. 5ª Ed., Porto Alegre: Editora UFRGS, 2003.
- [25] A.A. Craveiro, D.C. Queiroz, “Óleos essenciais e química fina”, *Química Nova*, **16**, 224–30, (1993).

-
- [26] H.R. Bizzo, A.M.C. Hovell, C.M. Rezende, “Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas”, *Química Nova*, **32**, 588–94.
- [27] Web of Knowledge. <http://apps.webofknowledge.com>. Acessado em 21/09/2013.
- [28] E. S. de Brito, D. S. Garruti, P. B. Alves, A. F. Blank, “Caracterização odorífera dos componentes do óleo essencial de capim-santo (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf., Poaceae) por Cromatografia Gasosa (CG) – Olfatometria”, em “Boletim de pesquisa e desenvolvimento”, 1.^a ed., Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2011.
- [29] The Good Scents Company Database. <http://www.thegoodscentscompany.com/search.html>. Acessado em 04/07/2012.
- [30] L.G.L. Guimarães, M.G. Cardoso, L.M. Zacaroni, R.K. Lima, F.A. Pimentel, A.R. Morais, “Influência da luz e da temperatura sobre a oxidação do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf)”, *Química Nova*, **31**, 1476–80, (2008).
- [31] L. Turin, “Rational odorant design”. In: D.J. Rowe (ed.), “Chemistry and technology of flavors and fragrances”, 1st Ed., Oxford: Blackwell Publishing Ltd., 2009.
- [32] S. Firestein, “How the olfactory system makes sense of scents”, *Nature*, **413**, 211–18, (2001).
- [33] F. Augusto, A.L.E. Lopes, C.A. Zini, “Sampling and sample preparation for analysis of aromas and fragrances”, *TrAC-Trends in Analytical Chemistry*, **22** (3), 160–9, (2003).
- [34] S.M. van Ruth, “Methods for gas chromatography-olfactometry: a review”, *Biomolecular Engineering*, **17**, 121–8, (2001).
- [35] K. Persaud, G. Dodd, “Analysis of discrimination mechanisms in the mammalian olfactory system using a model nose”, *Nature*, **299** (5881), 352–5, (1982).
- [36] H.J. Jin, S.H. Lee, T.H. Kim, J. Park, H.S. Song, T.H. Park, S. Hong, “Nanovesicle-based bioelectronic nose platform mimicking human olfactory signal transduction”, *Biosensors and Bioelectronics*, **35** (1): 335–41, (2012).
- [37] J.G. Wilkes, E.D. Conte, Y. Kim, M. Holcomb, J.B. Sutherland, D.W. Miller, “Sample preparation for the analysis of flavors and off-flavors in foods”, *Journal of Chromatography A*, **880** (1–2), 3–33, (2000).
- [38] J.B. Pawliszyn, “Handbook of solid phase microextraction”. 1st Ed., New York: Elsevier, 2012.

-
- [39] H.J. Bertram, W. Bretschneider, S. Brennecke, P. Werkhoff, “Modern methods for isolating and quantifying volatile flavor and fragrance compounds”. In: R. Marsili (Ed.), “Flavor, fragrance and odor analysis”. 1st Ed., New York: Marcel Dekker, 2002.
- [40] J.G. Jeroen, “Encapsulation of fragrances and flavours: a way to control odour and aroma in consumer products”. In: R.G. Berger (Ed.), “Flavours and fragrances. Chemistry, bioprocessing and sustainability”. 1st Ed., Heidelberg, Germany: Springer-Verlag, 2007.
- [41] W. Mehnert, K. Mader, “Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **8** (5), 2216–29, (2001).
- [42] R. Beck, S. Guterres, A. Pohlmann (Eds.), “Nanocosmetics and Nanomedicines: new approaches for skin care”, 1st Ed., Heidelberg, Germany: Springer-Verlag, 2011.
- [43] The Procter & Gamble Company, Cincinnati, OH (US), T.A. Scavone, M.J. LeBlanc, L.A. Sanker, A.G. Switzer, “Composition and/or articles comprising cyclodextrin complexing material”. Patent No.: US 0213191 A1. Sep. 4, 2008.
- [44] S.A. Wissing, K. Mader, R.H. Muller, “Solid lipid nanoparticles (SLN) as a novel carrier system offering prolonged release of the perfume Allure (Chanel)”, *Proceedings of the International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials*, **27**, 311–2, (2000).
- [45] International Flavors & Fragrances Inc., NY, NY (US). L.M. Popplewell, K.D. Lee, J.G.L. Pluyter, J. Brain, Y. Zhen, D. Az, “Encapsulated Fragrance Chemicals”. Patent No.: US 7.294.612 B2. Nov. 13, 2007.
- [46] A.P. Esser-Kahn, S.A. Odom, N.R. Sottos, S.R. White, J.S. Moore, “Triggered release from polymer capsules”, *Macromolecules*, **44**, 5539–53, (2011).
- [47] S.R. Schaffazick, S.S. Guterres, L.L. Freitas, A.R. Pohlmann, “Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos”, *Química Nova*, **26** (5), 726–37, (2003).
- [48] N.J. Zuidam, V.A. Nedovic, “Encapsulations technologies for active food ingredients and food processing”. 1st. Ed., New York: Springer Science-Business Media, 2010.
- [49] S. Benita, “Microencapsulation. Methods and industrial applications”. 2nd Ed., New York: Taylor & Francis, 2006.
- [50] C.Y. Zhao, G.H. Zhang, “Review on microencapsulated phase change materials (MEPCMs): fabrication, characterization and applications”, *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, **15**, 3813–32, (2011).

-
- [51] S. Bône, C. Vautrin, V. Barbesant, S. Truchon, I. Harrison, C. Geffroy, “Microencapsulated fragrances in melamine formaldehyde resins”, *Chimia*, **65**, 177–81, (2011).
- [52] T.S. Hodgins, A.G. Hovey, S. Hewett, W.R. Barrett, C.J. Meeske, “Melamine-formaldehyde – Film-forming compositions”, *Industrial and Engineering Chemistry*, **33**, 769–79, (1941).
- [53] Ciba Limited (Basel, Switzerland). L. Schibler, “Process for the encapsulation of dispersible materials”, US Patent 3,594,328, July 12, 1966, Dec. 9, 1969.
- [54] K. Hong, S. Park, “Melamine resin microcapsules containing fragrant oil: synthesis and characterization”, *Materials Chemistry and Physics*, **58**, 128–31, (1999).
- [55] International Flavor & Fragrances, Inc. (New York, US). L.M. Popplewell, K.D. Lee, J.G.L. Pluyter, “Encapsulated fragrance chemicals”, US Patent 2004/0071742 A1, Oct. 10, 2002, Apr. 15, 2004.
- [56] Y. Long, D. York, Z. Zhang, J.A. Preece, “Microcapsules with low content of formaldehyde: preparation and characterization”, *Journal of Materials Chemistry*, **19**, 6882–7, (2009).
- [57] Anuário ABIHPEC, 3ª Edição, (2012).
- [58] Brasil. Resolução 899, de 23 de maio de 2003. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
- [59] H. Vandendool, P.D. Kratz. “A generalization of retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography”, *Journal of Chromatography*, **11**, 463–71, (1963).
- [60] R.P. Adams. “Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry”. 4th Ed., Allured Publishing Corporation, 2007.
- [61] National Institute of Standards and Technology. “NIST Web Book”. Disponível em: <<http://webbook.nist.gov/chemistry/>>. Acessado em setembro de 2013.
- [62] J. Hwang, J. Kim, Y. Wee. “Factors affecting the characteristics of melamine resin microcapsules containing fragrant oils”, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **11**, 391–95, (2006).
- [63] F. Salaün, E. Devaux, S. Bourbigot, “Influence of process parameters on microcapsules loaded with n-hexadecane prepared by *in situ* polymerization”, *Chemical Engineering Journal*, **155**, 457–65, (2009).
- [64] “Constant Humidity Solutions”. In: “CRC Handbook of Chemistry and Physics”, 93rd Ed., Internet Version 2013, Section 15, p. 33.

-
- [65] C. Gao, S. Moya, H. Lichtenfeld *et al.* “The decomposition process of melamine formaldehyde cores: the key step in the fabrication of ultrathin polyelectrolyte multilayer capsules”, *Macromolecular Materials and Engineering*, **6**, 355–61, (2001).
- [66] R.C.C. Wagner, I. Joekes, “Hair protein removal by sodium dodecyl sulfate”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **41** (1), 7–14, (2005).
- [67] A. Salvador, A. Chisvert, “Analysis of cosmetic products”. 1st Ed. Oxford: Elsevier B.V., 2007.
- [68] J. Hwang, J. Kim, Y. Wee, H. Jang, S. Kim, H. Ryu, “Factors affecting the characteristics of melamine resin microcapsules containing fragrant oils”, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **11**, 391–5, (2006).
- [69] Y. Wu, Y. Li, L. Qin, F. Yang, D. Wu, “Monodispersed or narrow-dispersed melamine-formaldehyde resin polymer colloidal spheres: preparation, size-control, modification, bioconjugation and particle formation mechanism”, *Journal of Materials Chemistry B*, **1**, 204–12, (2013).
- [70] C. Washington, “Particle size analysis in pharmaceuticals and other industries: theory and practice”, 1st Ed. England: Taylor & Francis, 1992.
- [71] H.Y. Lee, S.J. Lee, I.W. Cheong, J.H. Kim, “Microencapsulation of fragrant oil via in situ polymerization: effects of pH and melamine-formaldehyde molar ratio”, *Journal of Microencapsulation*, **19** (5), 559–69, (2002).
- [72] C. B. Silva, S. S. Guterres, V. Weisheimer, E. S. Schapoval, “Antifungal activity of the lemongrass oil and citral against *Candida* spp.”, *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, **12** (1), 63–6, (2008).
- [73] F. V. Moreira, J. F. A. Bastos, A. F. Blank, P. B. Alves, M. R. V. Santos, “Chemical compositions and cardiovascular effects induced by the essential oil of *Cymbopogon citratus* DC. Stapf, Poaceae, in rats”, *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, **20** (6), 904–9, (2010).
- [74] ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, “Farmacopéia Brasileira”. 5^a ed., Volume 2, Brasília: Fundação Oswaldo Cruz, 2010, 724–8.
- [75] E. H. A. Andrade, M. G. B. Zoghbi, M. P. Lima, “Chemical composition of the essential oils of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf cultivated in north of Brazil”, *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, **12** (1), 41–5, (2009).
- [76] A. A. Kasali, A. O. Oyedeji, A. O. Ashilokun, “Volatile leaf oil constituents of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf”, *Flavour and Fragrance Journal*, **16**, 377–8, (2001).

-
- [77] K. Bauer, D. Garbe, H. Surburg, “Common fragrance and flavor materials. Preparation, properties and uses”, 4th Ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2001.
- [78] Y. Wang, C. Finn, M. C. Qian, “Impact of growing environment on chickasaw blackberry (*Rubus l.*) aroma evaluated by gas chromatography-olfactometry dilution analysis”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 3563–71, (2005).
- [79] F. V. Leimann, “Microencapsulação de óleo essencial de capim-limão utilizando o processo de coacervação simples”, Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia Química, UFSC, 2008.
- [80] B.F. Gibbs, S. Kermasha, I. Alli, C.N. Mulligan, “Encapsulation in the food industry: a review”, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, **50** (3), 213–24, (1999).
- [81] Kamath, Y.K.; Dansizer, C.J.; Weigmann, H.D.; “Wettability of keratin fiber surfaces”, *Journal Society of Cosmetic Chemists*, **28**, 273–9, (1977).
- [82] B.P. Binks, P.D.I. Fletcher, B.L. Holt, P. Beaussoubre, K. Wong, “Selective retardation of perfume oil evaporation from oil-in-water emulsions stabilized by either surfactant or nanoparticles”, *Langmuir*, **26** (23), 18024–30, (2010).
- [83] Y. Takuoka, H. Uchiyama, M. Abe, S.D. Christian, “Solubilization of some synthetic perfumes by anionic-nonionic mixed surfactant systems. 1”, *Langmuir*, **11**, 725–9, (1995).
- [84] T. Mehling, L. Kloss, T. Ingram, I. Smirnova, “Partition coefficients of ionizable solutes in mixed nonionic/ionic micellar systems”, *Langmuir*, **29**, 1035–44, (2013).

ANEXOS

ANEXO I

VERIFICAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO

Para garantir que a metodologia atendesse às exigências analíticas e assegurar a confiabilidade dos resultados, foram verificados os parâmetros seletividade, linearidade e precisão.

1. Seletividade

Seletividade é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto na presença de outros componentes como impurezas, componentes da matriz ou moléculas com estruturas relacionadas – como derivados, produtos de degradação ou isômeros [1].

O padrão analítico utilizado nos ensaios é composto de uma mistura de *cis* e *trans*-citrinal. Estes isômeros são estruturas relacionadas que também se encontram presentes no óleo essencial. Desta forma, a resolução entre os picos cromatográficos de *cis* e *trans*-citrinal, bem como a pureza de cada um deles, foram os parâmetros tomados para determinar a seletividade do método.

A Figura 1 mostra o perfil cromatográfico do padrão de citrinal, sendo que os picos 1 e 2 correspondem aos isômeros *cis* e *trans*, respectivamente. Visualmente, houve boa separação entre os picos, o que pôde ser comprovado pelo cálculo da resolução entre eles.

O parâmetro resolução (R_S) é uma medida de separação de dois componentes consecutivos. Na cromatografia em coluna ela é calculada de acordo com a Equação 1.

$$R_S = 2 \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{(w_{b2} + w_{b1})} = 1,177 \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{(w_{h2} + w_{h1})} \quad \text{Equação 1}$$

onde t_R é tempo de retenção; w é distância; b é base; h , meia altura e 1 ou 2 correspondem aos picos do cromatograma.

A resolução é um termo sem unidades, sendo necessária a utilização das mesmas unidades para tempos de retenção e distâncias. A Tabela 1 relaciona os valores de resolução entre os picos de *cis* e *trans*-citrinal para as amostras injetadas do padrão analítico de citrinal.

[1] Brasil. Resolução 899, de 23 de maio de 2003. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária

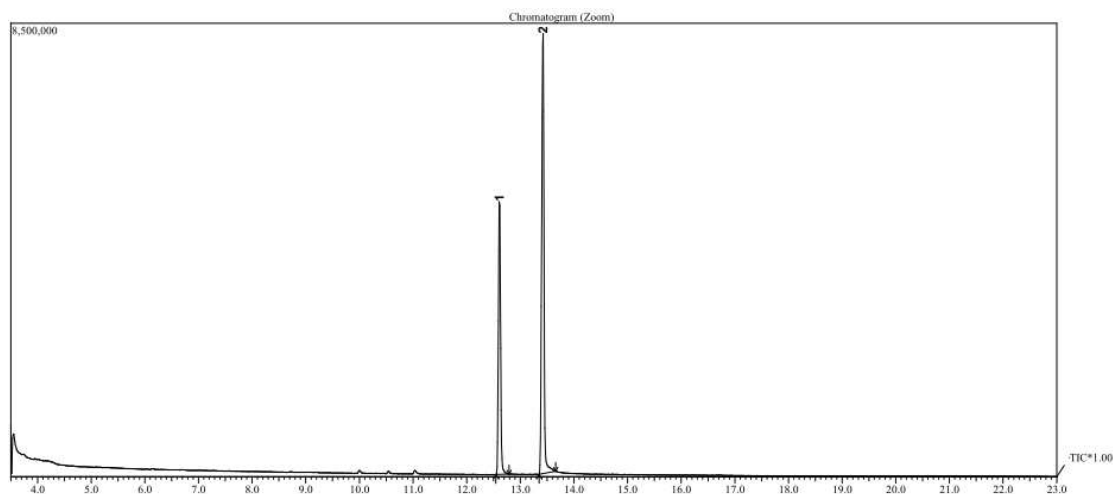


Figura 1. Cromatograma de íon total obtido por GC-MS a partir da injeção do padrão analítico de citral (1% $v v^{-1}$ em hexano). Trata-se de uma mistura dos isômeros *cis* (pico 1) e *trans* (pico 2).

Tabela 1. Resolução média ($n = 18$) entre os picos de *cis* e *trans*-citral calculada para diferentes concentrações (0,625; 1,25; 2,50; 5,0; 10,0 e 20,0 % $v v^{-1}$) do padrão analítico contendo a mistura dos isômeros.

Resolução média	Desvio padrão	CV%
1,6	0,1	3,8

De acordo com Collins *et al.*, um valor de $R_S = 1,25$ é suficiente para fins quantitativos. Já $R_S > 1,5$, conforme obtido nos ensaios, indica separação completa dos picos [2].

Uma vez que se constatou que os picos estão separados, foi necessário certificar de que eles estão relacionados, cada um, a apenas uma única substância. Isto pôde ser atribuído por meio da avaliação dos espectros de massa obtidos. Além disso, o fato de ter sido utilizado um padrão para determinação da seletividade do método indica a presença de uma única substância por pico.

Os espectros de massa relativos aos picos 1 e 2 da Figura 1 são mostrados na Figura 2. Observa-se que os íons mais abundantes são os de 41 e 69 m/z , tanto para *cis*-quanto para o *trans*-citral e a correlação entre os espectros obtidos e os padrões internos de referência utilizados pelo detector de massas é, respectivamente, 93 e 96 %, sendo considerada satisfatória para pureza dos picos cromatográficos.

[2] C.H. Collins, G.L. Braga, P.S. Bonato, “Fundamentos de cromatografia”, 1ª Ed., Campinas: Editora Unicamp, 2006

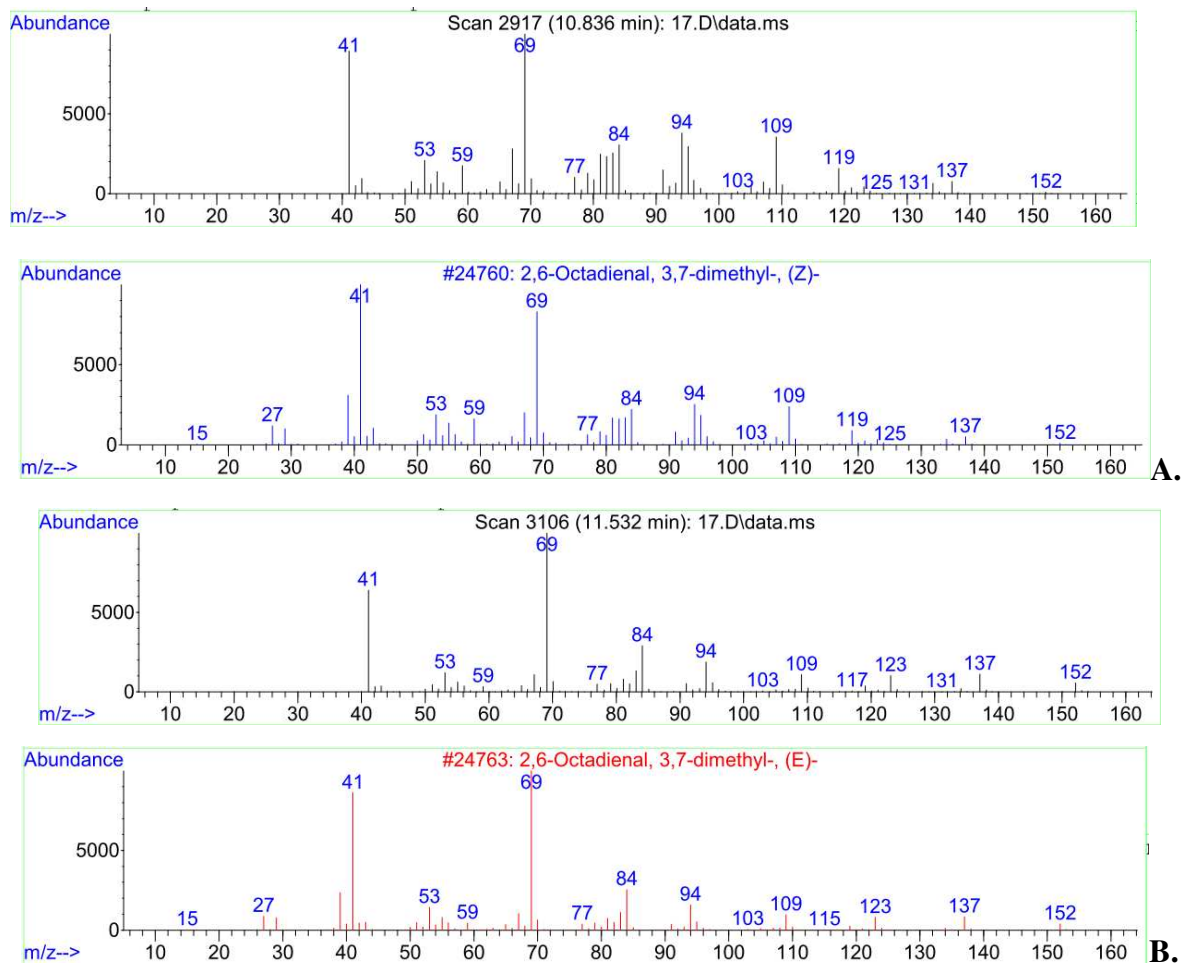


Figura 2. Comparação entre os espectros de massas obtidos por ionização em modo negativo (70 eV) e espectros padrão referentes aos picos de *cis* (a) e *trans*-citral (b). O grau de correlação entre amostra (acima) e padrão (abaixo) é de 93 e 96 % para os espectros de *cis* (a) e *trans*-citral (b), respectivamente.

2. Linearidade

Este parâmetro representa a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado [1].

A linearidade do método foi avaliada em triplicata, em três dias diferentes, na faixa de concentração de trabalho entre 0,625 – 2 % *m/v*. A correlação linear entre área do pico cromatográfico para o padrão de citral e sua resposta em unidades de área cromatográfica foi avaliada por regressão linear ($y = ax + b$). Para reduzir erros de injeção, foi adicionado às amostras o padrão interno octadecano, resultando na curva analítica apresentada na Figura 7 (Capítulo IV), utilizada para quantificação de citral.

3. Precisão

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra. Neste estudo, a precisão foi avaliada em dois níveis: repetibilidade entre os resultados em um curto período de tempo por meio de seis determinações a 100 % da concentração do teste; e precisão intermediária, sob as mesmas condições, mas variando-se o dia das análises [3].

A precisão de uma metodologia pode ser expressa por meio do desvio padrão relativo (*DPR*) ou coeficiente de variação (*CV%*), calculados a partir da Equação 2.

$$CV\% = \left(\frac{s}{\bar{X}} \right) \times 100\% \quad \text{Equação 2}$$

onde *s* é o desvio padrão amostral e \bar{X} , a média dos valores obtidos para as amostras.

Para verificação da precisão foi empregado o óleo essencial de *C. citratus* puro, diluído à concentração de trabalho de 0,5 mg g⁻¹. Os resultados foram tomados em termos de percentagem de área cromatográfica, tanto para repetibilidade quanto para precisão intermediária para os picos relativos às substâncias *cis* e *trans*-cital. A precisão intermediária foi determinada a partir do coeficiente de variação relativo às medidas realizadas em dois dias diferentes. Estes dados encontram-se na Tabela 2.

Os ensaios de repetibilidade mostraram que a resposta do sistema cromatográfico foi adequada aos fins da análise, haja vista que os valores dos coeficientes de variação para as injeções feitas em dias distintos foram próximos de zero. Por sua vez, o coeficiente de variação aumentou quando foram comparados os dois dias de injeção (1,7 % para *cis* e 0,9 % para *trans*-cital), sendo influenciado por outras variáveis que não o sistema cromatográfico. Mesmo assim, os valores obtidos para os ensaios de precisão encontram-se abaixo do limite recomendado de 5,0 para *CV%*.

[3] M. Ribani, “Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos”, *Química Nova*, 27 (5), 230–40, (2004).

Tabela 2. Repetibilidade (% área cromatográfica) e precisão intermediária para *cis* e *trans*-citral obtidas em dias diferentes a partir de seis determinações do óleo essencial à concentração de 0,5 % v v⁻¹.

REPETIBILIDADE				
	<i>cis</i> -Citral		<i>trans</i> -Citral	
Determinação	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2
1	36,19	35,01	50,12	48,95
2	36,13	34,95	49,45	48,99
3	36,17	34,98	49,86	48,96
4	36,17	35,02	49,34	48,97
5	36,19	34,99	49,57	48,97
6	36,17	35,02	50,02	48,94
média	36,17	34,99	49,73	48,96
Desvio padrão (s)	0,02	0,03	0,02	0,03
Repetibilidade (CV%)	0,06	0,08	0,06	0,08
PRECISÃO INTERMEDIÁRIA				
	<i>cis</i> -Citral		<i>trans</i> -Citral	
média	35,6		49,4	
Desvio padrão (s)	0,6		0,5	
Precisão intermediária CV%	1,7		0,9	

ANEXO II

CROMATOGRAMAS

1. Padrão de n-alcenos

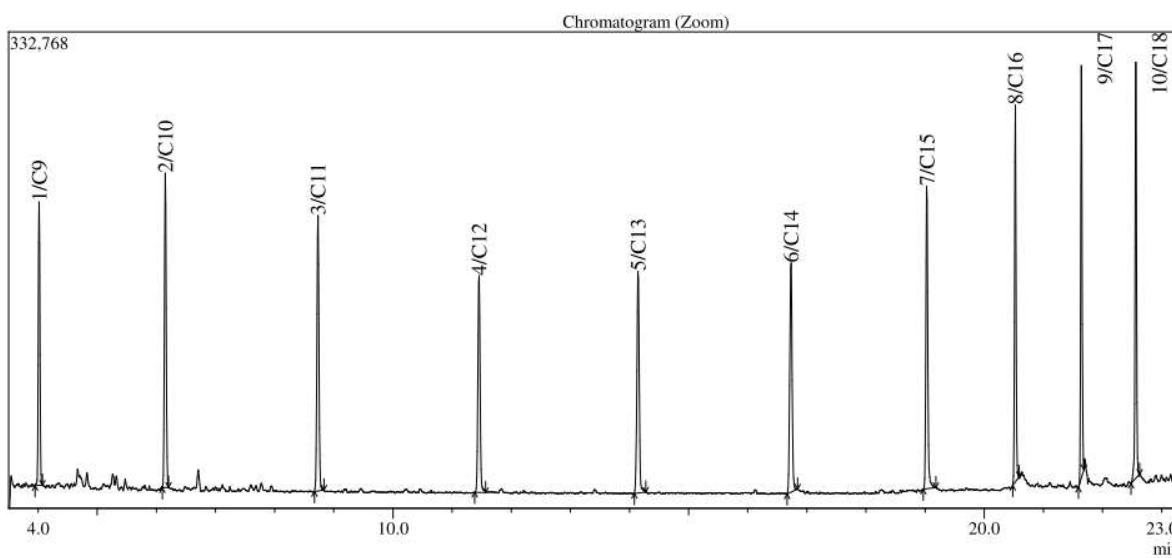


Figura 1. Cromatograma de íons totais, obtido por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) a partir da injeção do padrão analítico de n-alcenos (concentração de 40 ug g^{-1} para cada componente, diluído em hexano).

2. Brancos e controles dos ensaios de liberação de fragrância

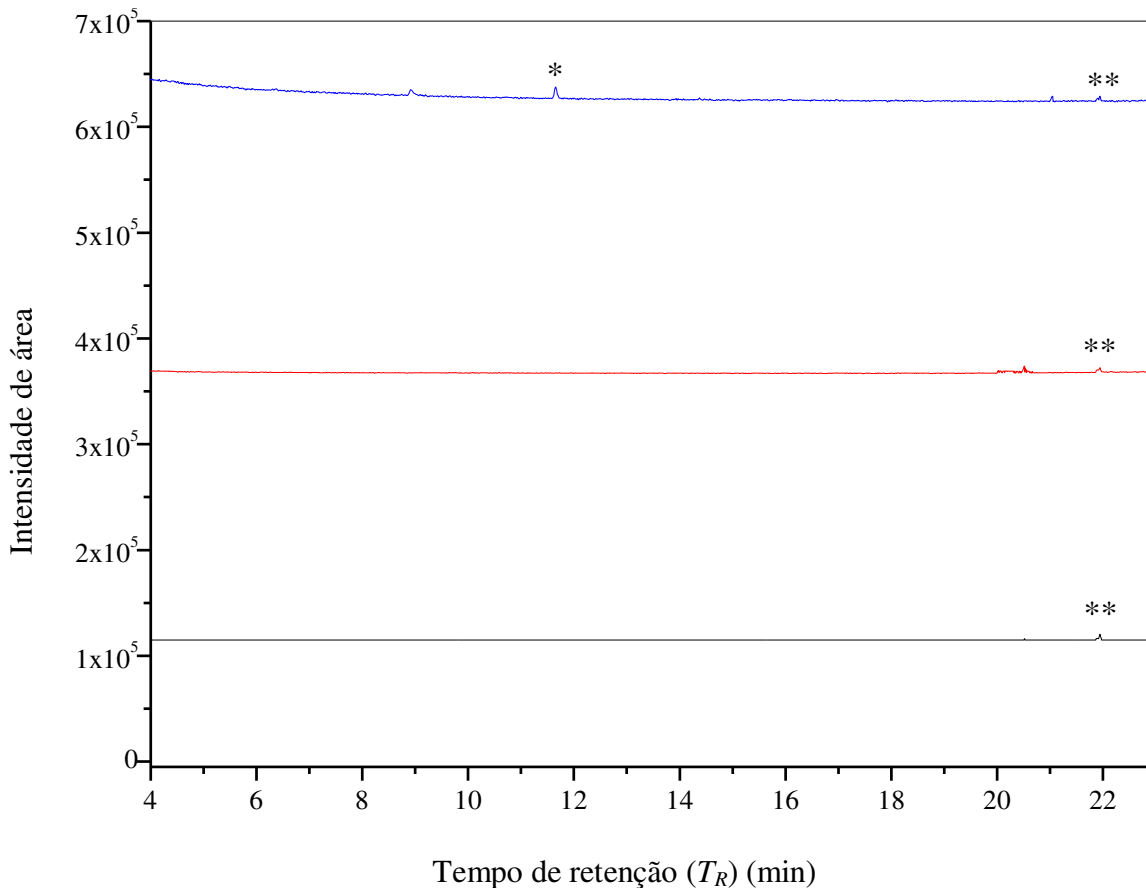


Figura 2. Cromatogramas de íons totais, obtidos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) a partir da injeção de fibra de microextração em fase sólida (SPME) antes de qualquer amostragem (branco da fibra) (●) e após amostragem de *headspace* de *vial* sem amostra (branco do frasco) (●) e contendo mecha tratada com formulação de xampu (SDS a 2,0 % *m/m*) sem fragrância (controle) (●). Duas substâncias foram identificadas: (*) $T_R = 11,66$ min (decanaldeído), proveniente da formulação de xampu, e (**) $T_R = 21,95$ min (siloxana), proveniente da fibra de PDMS. Os tempos de retenção destas substâncias não interferiram naqueles obtidos para as substâncias-alvo deste estudo.