



OBTENÇÃO DOS ESPECTROS VIBRACIONAIS DO CABELO HUMANO PELA UTILIZAÇÃO DE TÉCNICAS EM FT-IR: UM ESTUDO PILOTO.

Blanco, G. C.; Fernandes, A. C. S.; Barbosa, M. I.; dos Santos, L.; Fávero, P. P.; Martin, A. A.

Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, São José dos Campos, e-mail: guih.sjc@gmail.com

Resumo- O uso de técnicas de diferenciação FT-IR, consiste no estudo da interação de radiação eletromagnética com a matéria, determinando os níveis de energia de átomos e moléculas e fornece suporte adicional para o estudo científico do cabelo humano voltando-se tanto para área cosmetológica, como para ciências forenses. Sabe-se que a melanina, a qual está presente no córtex capilar de pelos humanos e animais, é formada nos melanócitos e transferida pelos melanomas para células corticais. A melanina age como corante da fibra capilar. Neste estudo piloto avaliou-se a eficácia do uso do FT-IR como técnica de caracterização de cabelo humano em relação à melanina. O FT-IR mostrou-se adequado para estudos de diferenciação e identificação dos dois tipos de cabelo, sendo detectada nas fibras de coloração castanho-escuro presença de melanina (eumelanina).

Palavras-chave: Cabelo humano; Caracterização da melanina; FT-IR.

Área do Conhecimento: Engenharia Biomédica

Introdução

Infravermelhos (IR) é uma ferramenta importante para estudos bioquímicos, devido à especificidade inerente química de frequências de vibração do espectro (ZHANG, G., 2011). Esta técnica estuda a interação de radiação eletromagnética com a matéria, determinando os níveis de energia de átomos e moléculas (SALA, 1995). O método fornece um espectro de absorção bioquímica devido às vibrações de ligações químicas (BALDAUF, 2007; AMIALI, 2007).

Técnicas de imagem providas deste equipamento permitem a medição de uma área específica dentro de uma amostra, fornecendo informações e auxiliando na compreensão da distribuição bioquímica das amostras sem a utilização de corantes ou sondas. A partir destas imagens obtidas, são extraídos espectros vibracionais (baseados nos níveis de energia das moléculas) que nos auxiliam a definir, caracterizar e localizar a composição da amostra biológica estudada (LIMA, K. M. G., 2009), por exemplo, o cabelo humano.

O cabelo humano é um material biológico complexo que se divide em três partes, cutícula, córtex e medula onde cada uma possui morfologia química distinta (ROBBINS, C. R.; LEWIS, D. M. e RIPPON, J. A.). A pigmentação capilar se dá pela presença de melanina, sendo que a concentração desta e o tamanho do grânulo determina a intensidade da cor do fio.

Existem dois tipos de grânulos de melanina sintetizados em melanossomas presentes dentro dos melanócitos: os grânulos de eumelanina dos cabelos de cor preta e castanho-escuro e os grânulos de feomelaninas dos cabelos de cor amarelo-vermelho e castanho-claro. (BILINSKA, B, 2001, Robbins, C. R. 2012, NIERSTRASZ, V. A. e CAVACO, 2010).

A cor do cabelo é determinada por várias variáveis, incluindo o tipo de pigmento de melanina presente, o tamanho dos grânulos de pigmento e a densidade (frequência) que se encontram dispersas ao longo do córtex de fibras capilares (LEWIS, D. M.; RIPPON, J. A, 2013, NIERSTRASZ, V. A.; CAVACO, 2010 e ROBBINS, C. R. 2012.). Existem exceções como quando há piebaldismo ou albinismo parcial caracterizado por uma genodermatose rara, autossômica dominante, sem preferência por cor ou raça. O quadro clínico clássico presente ao nascimento é constituído por mecha branca frontal nos cabelos (poliose), em cerca de 90% dos casos, e manchas despigmentadas simétricas na pele (GONTIJO, B.).

Os cabelos despigmentados surgem pela distribuição anormal e menor proliferação dos melanoblastos na vida embrionária. Sendo assim, há ausência de melanina, em ocorrência da falta de melanócitos (SPRITZ, R. A. 1994).

Este trabalho tem por objetivo verificar a eficácia do equipamento FT-IR (*Fourier transform infrared*) para obtenção de espectros vibracionais de fios de

cabelo pigmentado (preto) e despigmentado (branco).

Aqui estudaremos os comportamentos vibracionais da eumelanina e a suas diferenças quanto ao fio naturalmente despigmentado. Estes nos darão bases para estipular diretrizes de comportamentos vibracionais da estrutura capilar.

Pouco se conhece sobre a conformação da eumelanina, mas o modelamento mais aceito e citado é de uma molécula de alta complexidade com três grupamentos funcionais característicos, os ácidos carboxílicos (Ac), quinona-imina (Qi) e catecol (Cat)[2].

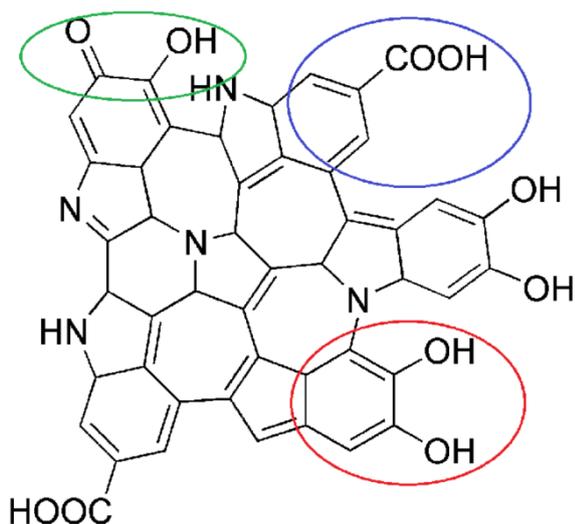


Figura 1- Ilustração da molécula de eumelanina, para tal observa-se os três grupos majoritários presentes: no círculo azul o grupamento ácidos carboxílicos, em verde o grupamento quinona-imina e em vermelho o grupamento catecol, segundo COSTA, 2012, LEWIS, D. M. e RIPPON, J. A.

Quando nossas amostras de cabelos forem submetidas ao infravermelho esperamos conseguir identificar a presença da eumelanina nos cabelos castanho-escuro, pela detecção das suas bandas características no espectro vibracional. Para tal, são selecionadas as seguintes regiões: 1498-1342 cm^{-1} ; 1718-1598 cm^{-1} e 2846-3700 cm^{-1} (COSTA, T.G., 2012) que são comparadas entre os dois tipos de cabelos.

A partir destas comparações é que saberemos quais as vantagens e quais estudos futuros serão necessários para uma análise mais incisiva da conformação e composição capilar.

Metodologia

Coleta de amostra:

Ambos os cabelos castanho caucasiano e branco Asiático (TAKAHASHI, T.) foram doados por algumas da Universidade do Vale do Paraíba. As mechas de cabelo foram lavadas com solução de Lauriléter sulfato de sódio, seguido por lavagem com água para remover qualquer possível contaminante da superfície.

Preparação das amostras:

Uma pequena mecha referente ao meio do cabelo castanho-escuro e outra do cabelo branco foram cortadas medindo cerca de 2 cm de comprimento. Cada mecha é disposta sobre a parte superior de um suporte de amostras incorporados em um meio de congelamento, Jung Tissue Freezing Medium™ (Leica Microsystems) e imediatamente congelados formando dois blocos distintos, um contendo cabelo castanho-escuro e o outro contendo cabelo branco. As amostras foram preparadas em cortes de seções transversais sequenciais de 4 μm cada, em uma temperatura de -14°C usando o Criostato Leica CM 110 (Leica Microsystems Inc., Bannockburn, Illinois); depositados em janelas de CaF_2 , para análise por espectroscopia de infravermelho (FT-IR).

As janelas de CaF_2 contendo as amostras de cabelo foram analisadas no modo imagem utilizando o equipamento de FT-IR (Spotlight 400 – Perkin-Elmer). Considerando o intervalo de 4000-1180 cm^{-1} , com 256 varreduras por pixel (6,25 μm^2) e resolução de 4 cm^{-1} . Para cada imagem obtida foram selecionados aleatoriamente cinco pontos do córtex capilar, sendo que cada ponto corresponde a um espectro vibracional médio (relativo às 256 varreduras).

Faixas espectrais da eumelanina:

Para cada espectro obtido da região cortical (cabelos castanho e branco) foram analisadas três faixas espectrais relacionados à eumelanina (BILINSKA, B., 2011 e COSTA, T.G., 2012): (1) a faixa espectral de 1498-1342 cm^{-1} , onde constam outros dois picos, 1490 e 1400 cm^{-1} para aromáticos (C=C), grupamentos iminicos (C=N) de anéis heterocíclicos e moléculas derivadas da o-hidroquinolina, estas deverão ser tratadas ou identificadas como quinona-imina e deve apresentar bandas de grandes intensidades para os cabelos castanhos, segundo (COSTA, T.G., 2012), (2) na faixa espectral de 1718-1598 cm^{-1} há mais intensidade em 1664 cm^{-1} que identifica modos vibracionais de ácidos carboxílicos (C=O); (3) a faixa espectral de 2846-3700 cm^{-1} há picos alargados em 3365 cm^{-1} que refere aos modos

vibracionais do estiramento (O-H) (BILINSKA, B., 2011 e COSTA, T.G., 2012).

Análise dos dados:

Após seleção das faixas espectrais da eumelanina a serem analisadas, as amostras foram submetidas à análise de dendrograma para verificar-se a similaridade espectral.

Para obtenção dos resultados foi utilizado o programa estatístico OPUS (versão 4.2, Bruker). Inicialmente os espectros foram pré-processados usando-se linha de base, normalização vetorial e a primeira derivada. Esse tratamento permitiu uma padronização dos dados.

Resultados

Para verificar a diferenciação bioquímica na ausência de eumelanina entre o córtex de cabelo branco e a presença de eumelanina córtex cabelo castanho-escuro, foram obtidas imagens bioquímicas destes cabelos. Nestas imagens foi possível fazer a distinção entre as estruturas morfológicas que compõem o cabelo (conforme apresentado na Figura 2). O tempo de coleta de cada imagem foi de aproximadamente 90 minutos.

A Figura 2 apresenta a imagem da secção transversal da amostra de cabelos branco em janela de CaF₂ e sua imagem bioquímica correspondente, ambas obtidas por FT-IR. A Figura 3 apresenta a imagem da secção transversal da amostra de cabelos castanho-escuro em janela de CaF₂ e sua imagem bioquímica correspondente obtidas por FT-IR.

Em ambas as Figuras (2 e 3) verifica-se que o FT-IR foi capaz de detectar as estruturas morfológicas, distinguindo as regiões de cutícula, córtex e medula capilar.

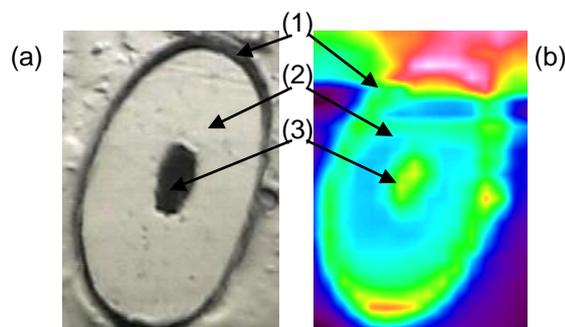


Figura 2- Imagens para o cabelo branco obtidas por FT-IR. (a) Janela de CaF₂ com amostra de secção transversal. Observa-se as regiões da fibra capilar: (1) região cuticular, (2) região cortical e (3) região medular. (b) Imagem bioquímica para obtenção dos espectros vibracionais.

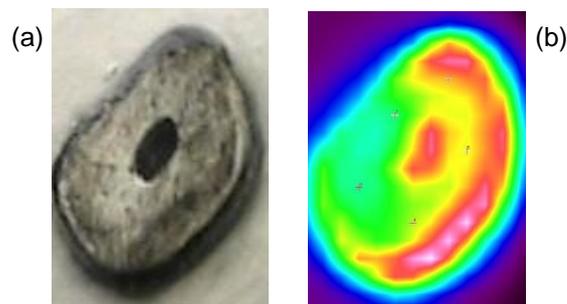


Figura 3- Imagens para o cabelo castanho-escuro obtidas por FT-IR. (a) Janela de CaF₂ com amostra de secção transversal. (b) Imagem bioquímica para obtenção dos espectros vibracionais.

Cada pixel da imagem bioquímica (Figuras 2b e 3b) contém um espectro médio de IR total (1180-4000 cm⁻¹) resultantes de 256 varreduras (*scans*).

Foram escolhidos, para este estudo piloto, de forma aleatória 5 espectros do córtex de cada tipo de cabelo (branco e castanho-escuro), ilustrado na Figura 4, comparando-se três regiões espectrais referentes aos principais constituintes moleculares da eumelanina: 1498-1342cm⁻¹; 1718-1598 cm⁻¹ e 2846-3700 cm⁻¹.

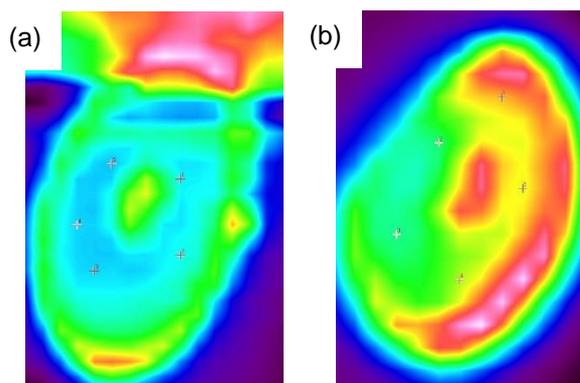


Figura 4- Localização dos espectros do córtex do cabelo branco (a) e castanho-escuro (b) analisados.

A análise estatística (análise de dendrograma) de todos os espectros médios obtidos foi realizada pelo software OPUS (versão 4.2, Bruker). O resultado obtido separa os dados por similaridade utilizando o algoritmo de Ward's (que consiste em agrupar os dados que tem características homogêneas) e são apresentados em forma de dendrograma. No dendrograma (Figura 5), foram excluídos da análise os espectros das amostras janela de CaF₂ e cola (utilizado no processo de corte), pois não faziam parte das estruturas das amostras de cabelo.

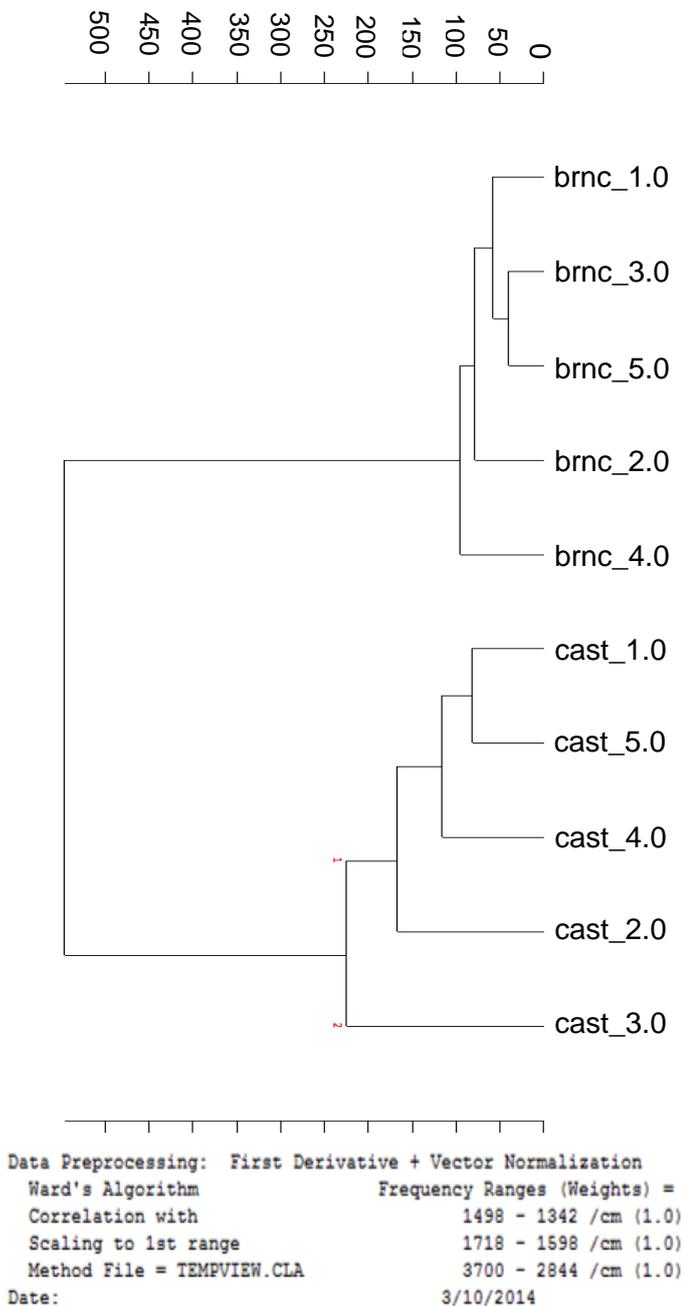


Figura 5- Dendrograma representativo da heterogeneidade entre os espectros do córtex do cabelo humano. As siglas **brnc** significa cabelo branco e **cast** significa cabelo castanho.

Analisando o dendrograma observa-se que entre as amostras classificadas como branco (córtex da amostra de cabelo branco) dividem-se em subgrupos, bem como as amostras classificadas como castanho (córtex da amostra de cabelo branco). A origem destes subgrupos pode ser devido a pequenas diferenças bioquímicas

entre as mesmas, mas que não caracterizam significativas mudanças ao ponto de serem classificadas como outro tipo de composição. Outro ponto importante a se salientar no dendrograma é a formação de dois grandes grupos entre os cabelos brancos e os cabelos castanhos, isso pode ser explicado pela diferença que os córtex possuem, já que no córtex do cabelo branco há presença de eumelanina.

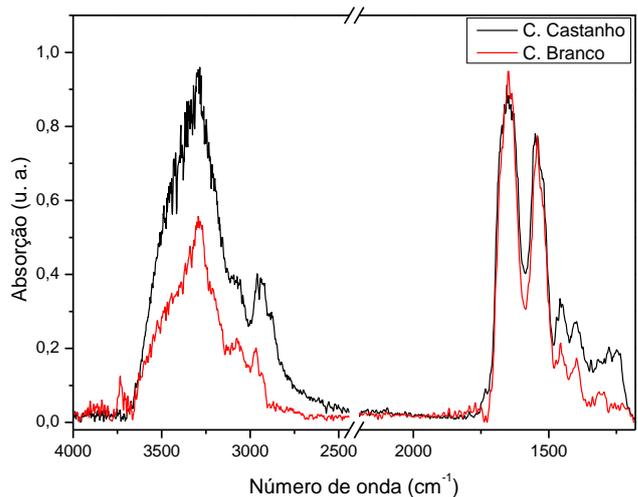


Figura 6- Espectros para cabelo castanho e cabelo branco. Ambos espectros foram obtidos do córtex.

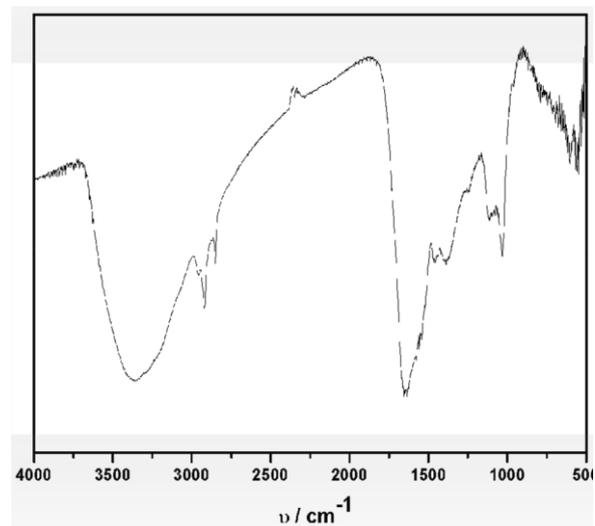


Figura 7- Espectro IR de eumelanina (COSTA, T.G,2012)

Para melhor visualização das diferenças espectrais entre cada tipo cabelo e as regiões referentes à eumelanina, plotou-se uma sobreposição de dois espectros: um do córtex do



cabelo branco e um do córtex do cabelo castanho-escuro (Figura 6), importados no software Origin 8.5 para podermos compará-los, visualmente (Figura 7).

Discussão

O uso da técnica FT-IR para estudo da caracterização de diferentes tipos de cabelo em relação à melanina permite que outras análises sejam realizadas considerando os demais constituintes capilares. Verificamos que as amostras são homogêneas considerando a constituição de melanina em cada cabelo analisado. E que, conforme descrito em literatura, a concentração de melanina entre cabelo castanho-escuro e branco é distinta.

Uma das principais barreiras deste estudo dá-se pela pouca quantidade de informação e publicação relevante existente sobre o assunto, reforçando assim, a importância e contribuição deste trabalho, ainda em fase inicial.

Conclusão

Vimos a partir desses dados que o FT-IR é capaz de identificar a diferença das estruturas capilares, bem como a presença/ausência de melanina no córtex, com o auxílio do dendrograma elucidou a homogeneidade das amostras e as diferenças entre os tipos capilares. Com tudo, o método utilizado demonstra total eficácia para este tipo de estudo.

Agradecimentos

Os autores agradecem a João Rangel pelo suporte e auxílio na obtenção dos espectros vibracionais e análise a partir das imagens FTIR dos dois tipos de cabelo.

Referências

- AMIALI, N. M.; Rapid identification of coagulase-negative staphylococci by Fourier transform infrared spectroscopy, 2007.
- BALDAUF, N. A.; Effect of selective growth media on the differentiation of Salmonella enterica serovars by Fourier-Transform Mid-Infrared Spectroscopy, 2007.
- BILINSKA, B. On the structure of human hair melanins from an infrared spectroscopy analysis of

their interactions with Cu²⁺ ions. Spectrochimica Acta Part A 57 p. 2525–2533, 2001

- COSTA, T.G. Caracterização da melanina natural extraída do cabelo (eumelanina): Afinidade pelos íons Fe(III) e interação com ácido gálico, Dissertação (mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

- GONTIJO, B. Piebaldismo: relato de dois casos. An. bras. dermatol; V.71, n.6, p. 503-5, nov.-dez. 1996.

- LIMA, K. M. G. Sensores Ópticos Com Detecção No Infravermelho Próximo E Médio, Quim. Nova, V.32, N.6, p.1635-1643, 2009.

- LEWIS, D. M. e RIPPON, J. A. The Coloration of Wool and other Keratin Fibres. Published by John Wiley & Sons in association with the Society of Dyers and Colourists, 2013

- NIERSTRASZ, V. A. e CAVACO, A. P. Advances in textile Biotechnology. Ed. Woodhead Publishing Limited, 357p., 2010

- ROBBINS, C. R. Chemical and Physical Behavior of Human Hair 5th Edition, Clermont, FL, 745 p., 2012.

- SALA, O. Fundamentos Da Espectroscopia Raman E No Infravermelho. São Paulo: ED. UNESP, 244 p., 1995.

- SPRITZ, R. A. Molecular Basis Of Human Piebaldism. J Invest Dermatol, V.5, n.5, p. 340–343, Nov. 1994.

- TAKAHASHI, T.; Morphologi and Properties of Asian and Caucasian Hair. J. Cosmet. Sci., V. 57, p. 327-338, july/aug., 2006.

- ZHANG, G.; SENAK, S.; MOORE, D.J. Measuring changes in chemistry, composition, and molecular structure within hair fibers by infrared and Raman spectroscopic imaging. Journal of Biomedical Optics Vol. 16, n.5, May 2011.