

MÔNICA CARDOSO SANTOS

Triagem da composição química de amostras de cabelo humano antes e após modificação estética utilizando técnicas espectroanalíticas e quimiometria

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutora em Química.

Orientadora: Prof^a Dr^a Fabíola Manhas Verbi Pereira

Araraquara
2019

FICHA CATALOGRÁFICA

S237t Santos, Mônica Cardoso
Triagem da composição química de amostras de cabelo humano antes e após modificação estética utilizando técnicas espectroanalíticas e quimiometria / Mônica Cardoso Santos. – Araraquara : [s.n.], 2019
94 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Fabíola Manhas Verbi Pereira

1. Cabelo. 2. Fluorescência de raio X. 3. Espectroscopia de emissão com plasma induzido por laser. 4. Elementos químicos. 5. Quimiometria. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Triagem da composição química de amostras de cabelo humano antes e após modificação estética utilizando técnicas espectroanalíticas e quimiometria"

AUTORA: MÔNICA CARDOSO SANTOS

ORIENTADORA: FABIOLA MANHAS VERBI PEREIRA

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



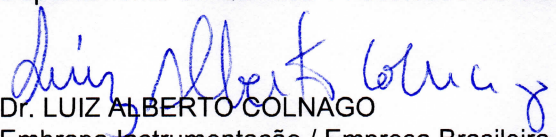
Prof^a. Dr^a. FABIOLA MANHAS VERBI PEREIRA
Departamento de Química Analítica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



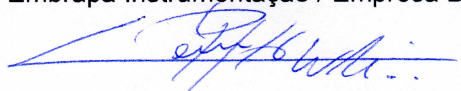
Prof^a. Dr^a. HIDEKO YAMANAKA
Departamento de Química Analítica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. FLAVIO JUNIOR CAIRES
Departamento de Química / Faculdade de Ciências - UNESP - Bauru



DR. LUIZ ALBERTO COLNAGO
Embrapa Instrumentação / Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - São Carlos



Prof. Dr. HUDSON WALLACE PEREIRA DE CARVALHO
Departamento de Química Analítica / Centro de Energia Nuclear na Agricultura - USP - Piracicaba

Araraquara, 14 de março de 2019

DADOS CURRICULARES

1) Identificação

Nome: Mônica Cardoso Santos

Nome em citações bibliográficas: SANTOS, M. C.; Santos, M. C.; SANTOS, MÔNICA C.; SANTOS, MÔNICA CARDOSO; SANTOS, MÔNICA.

Endereço eletrônico: monikita1304@hotmail.com

2) Formação Acadêmica

2016 - 2019: Doutorado em Química

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP

2014 - 2016: Mestrado em Química

Universidade Federal de Sergipe, UFS

2012 - 2013: Especialização em Gestão Ambiental e Recursos Hídricos

Faculdade São Luís de França, FSLF

2007 - 2010: Graduação em Química Bacharelado

Universidade Federal de Sergipe, UFS

2006 - 2008: Curso técnico profissionalizante em Análise e Processos Químicos

Instituto Federal de Sergipe, IFS

3) Atuação Profissional

2012 - 2013: Itaguassu Agro Industrial S/A (Grupo Nassau), Laranjeiras/SE

Analista Química

4) Prêmios

2015: Prêmio de melhor apresentação oral da II Escola de Química UFS - UFSCar com o trabalho intitulado “Desenvolvimento de método para determinação de alcaloides indólicos em amostras de ayahuasca”, pelo Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Sergipe.

5) Artigos publicados em periódicos durante o desenvolvimento da tese

Wavelength dispersive X-ray fluorescence (WDXRF) and chemometric investigation of human hair after cosmetic treatment.

X-Ray Spectrometry 2018, **47**, 252. (Anexo 1)

Chemical element profiles in commercial woven fabric combining laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) and chemometrics.

Journal of Applied Spectroscopy 2018, **85** (3), 543. (Anexo 2)

6) Artigos submetidos para publicação em periódicos durante o desenvolvimento da tese

Direct analysis of human hair before and after cosmetic modification using a recent data fusion method.

Journal of the Brazilian Chemical Society, submetido em janeiro/2019.

Chemometrics in analytical chemistry – an overview of applications from 2014 to 2018.

Eclética Química Journal, submetido em dezembro/2018.

7) Participação em eventos científicos relacionados com o tema da tese

Triagem da composição química em tecido capilar humano visando análise forense por meio da técnica de espectroscopia de emissão com plasma induzido por laser (LIBS) combinado à quimiometria

“Mulheres na Ciência 2016: o gênero na Pós-Graduação”, Araraquara/SP, 08 de agosto de 2016, apresentação na forma de pôster.

Elements distribution in commercial fabric combining score maps and laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS)

18º Encontro Nacional de Química Analítica, Florianópolis/SC, no período de 18 a 21 de setembro de 2016, apresentação oral.

Wavelength dispersive X-ray fluorescence (WDXRF) spectra standardization for human hair samples using exploratory analysis

VIII Workshop de Quimiometria, Salvador/BA, no período de 24 a 27 de abril de 2017, apresentação oral.

Evaluation of chemical variations in human hair composition using wavelength dispersive X-ray fluorescence and chemometrics

46th World Chemistry Congress, 40^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química e IUPAC 49th General Assembly, São Paulo/SP, no período de 7 a 14 de julho de 2017, apresentação na forma de pôster (AC1432).

Multivariate classification model using wavelength dispersive x-ray fluorescence (WDXRF) spectra for forensic purposes

III Escola de Inverno em Quimiometria (EIQ 2017), Araraquara/SP, no período de 24 a 26 de julho de 2017, apresentação na forma de pôster (P57).

Direct chemical information from strands of hair using laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) and chemometrics

2018 Winter Conference on Plasma Spectrochemistry, Amelia Island/Florida, no período de 8 a 13 de janeiro de 2018, apresentação na forma de pôster (TP31).

Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) combined with chemometrics for investigation of cosmetic modified hair samples

IX Workshop de Quimiometria, Natal/RN, no período de 23 a 27 de abril de 2018, apresentação na forma de pôster (C11).

8) Entrevistas, mesas redondas, programas e comentários na mídia

2018: Unesp em Araraquara discute participação das mulheres na ciência

9) Textos em jornais de notícias/revistas

2018: 5^a Edição do evento Mulheres na Ciência - UNESP - IQ/CAr - SP.

“O senhor é meu pastor e nada me faltará”
Salmo 23.1

Dedico essa Tese de Doutorado aos meus pais, José Cardoso e Silvany Barreto, aos meus irmãos Cleverson e Viviane, aos meus sobrinhos Ana Clara e Gustavo e ao meu noivo Renan Lira pelo amor, carinho, apoio e incentivo em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus que é presença constante em minha vida e me dá força e fé.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Fabíola Manhas Verbi Pereira pelos ensinamentos, confiança para a realização dessa tese de doutorado e também pela oportunidade em fazer parte do Grupo de Abordagens Analíticas Alternativas (GAAA).

Ao Instituto de Química (IQ) da Universidade Estadual Paulista (UNESP) pela oportunidade de estudo oferecida.

À CAPES pela bolsa concedida. Ao CNPq e à FAPESP pelo apoio financeiro.

Aos meus pais, Cardoso e Silvany, pelo exemplo de vida, apoio incansável e sobretudo pelo amor, otimismo e inspiração.

Aos meus irmãos, Cleverson e Viviane, por sempre me incentivarem, desejarem o melhor e torcerem por mim.

Aos meus queridos sobrinhos, Ana Clara e Gustavo, por entenderem, “às vezes”, a ausência da titia em diversos momentos na vida deles.

Ao meu amado noivo, Renan Lira, por estar sempre presente, me apoiando, incentivando e torcendo por mim, pelo amor, carinho, cumplicidade e paciência.

Às professoras Dr^a Maria Valnice Boldrin e Dr^a Vivian Vanessa França Henn, pelas contribuições dadas ao comporem a banca de qualificação dessa tese.

À Prof^a Dr^a Érica Regina Filleti, pela amizade, troca de conhecimentos, ajuda e colaboração no desenvolvimento dessa tese.

Ao Prof^o Dr^o Sandro Navickiene, pela amizade, ensinamentos, ajuda e contribuição na minha formação pessoal e acadêmica.

Aos professores, técnicos e funcionários do IQ da UNESP pelo suporte, ajuda, troca de conhecimentos e contribuição na minha formação profissional e pessoal.

Aos colegas do GAAA, Wesley, Josilei, Fábio, Bárbara, Lucas e Fernando pela amizade, incentivo, colaboração e discussões para enriquecimento dessa tese e pelos momentos de descontração.

Às minhas amigas da UNESP, em especial Igrayne, Andreia (minha querida portuguesa), Natalia (Fiote), Mayra, Camila, Carol, Jécika e Bárbara, bem como aos meus amigos, Rafael (Pt) e Guilherme (Gibbs) pela amizade, por continuarem presentes e pelos bons momentos vividos em Araraquara.

Aos professores e colegas do Grupo de Eletroanalítica de Araraquara (GEAr) da UNESP, bem como ao Grupo de Análise Instrumental Aplicada (GAIA) da UFSCar, por toda hospitalidade, apoio, ajuda, troca de conhecimentos e contribuições para o desenvolvimento dessa tese.

À minha grande amiga Andréa Cruz, uma linda amizade que fiz na cidade de Araraquara, que me ajudou e incentivou bastante em diversos momentos durante o desenvolvimento dessa tese.

Aos meus familiares de Aracaju/SE, em especial a minha avó Enedina e minha tia Jeane, que mesmo com a distância continuam me apoiando e proporcionando momentos de alegria e descontração, através das ligações telefônicas e pela rede social.

Às minhas amigas da UFS, em especial Dayara, Ingrid, Juciara e Schnaider, presentes da UFS durante meu mestrado e que apesar da distância nunca deixaram de me apoiar, ajudar, aconselhar, fazer rir e até mesmo chorar no nosso grupo do WhatsApp e, como lá está escrito e será, da UFS pra vida.

A todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente na realização dessa tese de doutorado e no meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Muito Obrigada!!!

RESUMO

O cabelo apresenta estabilidade elevada quanto à deterioração, que ocorre desde a coleta até a análise, o que pode permitir um amplo período de investigação entre alguns meses até anos. Nesse contexto, amostras de cabelo humano e sintético foram analisadas utilizando as técnicas de Fluorescência de raios X por dispersão de comprimento de onda (WDXRF) e Espectroscopia de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS). A ideia dessa tese de doutorado foi identificar variações na composição química que pudessem diferenciar estas amostras. Além disso, foi efetuado nas amostras um procedimento de modificação estética comum como a descoloração dos cabelos. Assim, o objetivo foi avaliar o cabelo antes e após este procedimento para abranger uma ampla representatividade destas amostras. A partir das técnicas espectroanalíticas foi possível obter perfis espectrais e correlacioná-los com as amostras antes e após o procedimento de descoloração dos cabelos. Outro fato importante foi que os resultados mostraram a complementaridade entre as técnicas, permitindo estabelecer uma impressão digital para os diferentes tipos de cabelo. Com a utilização de técnicas quimiométricas foram desenvolvidos modelos de classificação, que apresentaram resultados promissores no que concerne as amostras antes e após o procedimento de descoloração do cabelo.

Palavras-chave: cabelo, WDXRF, LIBS, impressão digital e técnicas quimiométricas.

ABSTRACT

Hair has a high stability against deterioration, from collection to analysis, which may allow a long period of investigation between a few months to years. In this context, human and synthetic hair samples were analyzed by using Wavelength Dispersive X-ray Fluorescence (WDXRF) and Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS) techniques. The idea of this PhD dissertation was to identify variations in the chemical composition that could differentiate these samples. In addition, a common aesthetic modification procedure, such as hair bleaching, was performed on the samples. Thus, the aim was to evaluate hair before and after this procedure to encompass a broad representation of these samples. From the spectroanalytical techniques it was possible to obtain spectral profiles and to correlate them with the samples before and after the hair discoloration procedure. Another important feature was that results showed the complementarity between both techniques, allowing to establish a fingerprint for the different types of hair. Using chemometric techniques, classification models were developed, which presented promising results regarding the samples before and after the hair bleaching procedure.

Keywords: hair, WDXRF, LIBS, fingerprint and chemometrics techniques.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração do processo de excitação por incidência de fonte de raios X, com ejeção eletrônica da camada K e emissão secundária (fluorescência) de fótons.....	5
Figura 2 - Ilustração para o diagrama de transições eletrônicas de um átomo.....	5
Figura 3 - Esquema ilustrativo dos componentes básicos em um equipamento WDXRF.....	6
Figura 4 - Publicações anuais de artigos relacionados à técnica LIBS, desde 1990 até 2019, baseado na base de dados <i>Web of Science</i>	10
Figura 5 - Ilustração do processo de ablação por meio de uma fonte de laser.....	11
Figura 6 - Esquema ilustrativo dos componentes básicos em um equipamento LIBS.....	12
Figura 7 - Procedimento experimental para preparação da amostra: A) molde utilizado para a conformação das amostras em forma de pastilha, B) prensa hidráulica manual e C) pastilhas de cabelo, sendo (I) original e (II) descolorido.....	18
Figura 8 - Imagem das amostras de cabelo, onde os números correspondem a idade das pessoas doadores, as letras F e M correspondem ao gênero feminino e masculino, respectivamente. A letra A representa cabelo com alisamento, T com tingimento e H com hena. As amostras de cabelo sintético foram assinaladas com a letra S conforme as cores: castanho (C1 e C2), loiro (L), preto com mechas loiras (M), preto (P) e vermelho (V).....	19
Figura 9 - Ilustração do mapeamento na pastilha de cabelo realizado com a LIBS.....	21
Figura 10 - Ilustração dos modos de normalização utilizados nos dados obtidos pelas técnicas WDXRF e LIBS.....	24
Figura 11 - Representação para as sete classes utilizadas na avaliação dos dados WDXRF e LIBS.....	25
Figura 12 - Perfil de espectros WDXRF para uma amostra de cabelo humano com cor castanho antes (cabelo original, linha verde) e após a modificação estética (cabelo descolorido, linha laranja).....	27

Figura 13 - Perfil de espectros LIBS para as amostras SC1 (linha marrom), SC2 (linha azul), SL (linha amarela), SM (linha violeta), SP (linha preta) e SV (linha vermelha). O número 1 corresponde ao Rh K β 0,55, número 2 ao Rh K α 0,62, número 3 ao Fe K α 1,94, número 4 ao Rh K β 4,37 e o número 5 ao Rh K α 4,61.....	28
Figura 14 - Gráficos de <i>scores</i> e <i>loadings</i> para as amostras de cabelo humano e sintético usando a média do perfil completo dos espectros WDXRF normalizados com a norma euclidiana; 133 amostras e 805 variáveis.....	29
Figura 15 - Representação da fórmula estrutural para o aminoácido cisteína (A) e a ligação da proteína S100A3 com íons Ca ²⁺ (B), bem como o sítio de ligação do íon Ca ²⁺ no interior da proteína S100A3 (C).....	30
Figura 16 - Gráficos de <i>scores</i> e <i>loadings</i> para as amostras de cabelo (O) e (D) usando a média do perfil completo dos espectros WDXRF normalizados com a norma euclidiana; 127 amostras e 805 variáveis.....	31
Figura 17 - Fórmula estrutural do composto persulfato de potássio.....	31
Figura 18 - Gráficos de <i>scores</i> e <i>loadings</i> para as amostras de cabelo (O) e (D) usando a média do perfil completo dos espectros WDXRF normalizados com a norma euclidiana e as linhas K α selecionadas de Ca, Fe, K e Rh e K β de S; 127 amostras e 183 variáveis.....	32
Figura 19 - Gráficos de <i>scores</i> e <i>loadings</i> para as amostras de cabelo (A) e (T) e para as mesmas amostras de cabelo (D), usando a média do perfil completo dos espectros WDXRF normalizados com a norma euclidiana; 20 amostras e 805 variáveis.....	34
Figura 20 - Gráficos de <i>scores</i> e <i>loadings</i> para as amostras de cabelo (T) e (D) usando a média do perfil completo dos espectros WDXRF normalizados com a norma euclidiana; 19 amostras e 805 variáveis.....	35
Figura 21 - Gráficos de <i>scores</i> e <i>loadings</i> para cada face das amostras de cabelo (O) e (D) usando a média do perfil espectral LIBS; 266 amostras e 12.288 variáveis.....	36
Figura 22 - Perfil de espectros LIBS para uma amostra de cabelo (O) preto e a mesma amostra de cabelo (D). Para as linhas atômicas, número 1 corresponde ao elemento químico C; 4, 6, 7 e 9 ao Ca; 5 e 10 ao H; 8 ao Na; 11, 14 e 16 ao N; 12 ao K; 13 e 15 ao O. Para as linhas iônicas, o número 2 corresponde ao Mg e o 3 ao Ca.....	37

Figura 23 - Perfil de espectros LIBS para as amostras SC1 (linha marrom), SC2 (linha azul), SL (linha amarela), SM (linha violeta), SP (linha preta) e SV (linha vermelha). O número 1 corresponde ao elemento químico C; 4 e 5 ao Ca; 6 ao Na; 7 ao H; 8, 11 e 13 ao N; 9 ao K; 10 e 12 ao O, referente as linhas atômicas. Para as linhas iônicas, Mg e Ca pelos números 2 e 3, respectivamente.....38

Figura 24 - Perfil de espectros LIBS para uma amostra de cabelo (O) preto e uma amostra de cabelo (S), também na mesma cor. Para as linhas atômicas, o número 1 corresponde ao elemento químico C; 4, 6, 7 e 9 ao Ca; 5 e 10 ao H; 8 ao Na; 11, 14 e 16 ao N; 12 ao K; 13 e 15 ao O. Para as linhas iônicas, o número 2 corresponde ao Mg e o 3 ao Ca.....39

Figura 25 - Fórmulas estruturais dos polímeros cloreto de polivinila (A), tereftalato de polietileno (B) e poliacrilonitrila (C).....39

Figura 26 - Fórmula estrutural do polímero alginato de sódio.....40

Figura 27 - Gráficos de *scores* e *loadings* para as amostras de cabelo humano e sintético usando a média do perfil espectral LIBS; 133 amostras e 12.288 variáveis..41

Figura 28 - Gráficos de *scores* e *loadings* para as amostras de cabelo (O) e (D) usando a seleção das variáveis importantes; 127 amostras e 422 variáveis.....42

Figura 29 - Representação gráfica para o valor da razão entre as linhas de emissão dos elementos para as amostras de cabelo descolorido pelo original.....43

Figura 30 - Valores percentuais das figuras de mérito para os modelos de classificação multivariada utilizando os dados WDXRF da matriz composta por 127 amostras e 183 variáveis para a classe tipo de amostra, composta por dois níveis: (O) e (D).....45

Figura 31 - Valores percentuais das figuras de mérito para os modelos de classificação multivariada utilizando os dados LIBS da matriz 127 amostras x 422 variáveis para a classe tipo de amostra, considerando dois níveis: (O) e (D).....46

LISTA DE ACRÔNIMOS

Acrônimo	Descrição	Tradução
A	Alisamento	---
AAS	<i>Atomic Absorption Spectroscopy</i>	Espectroscopia de absorção atômica
CCD	<i>Charge Coupled Device</i>	Detector de carga acoplada
CF-LIBS	<i>Calibration-Free Laser-Induced Breakdown Spectroscopy</i>	Espectroscopia de emissão óptica com plasma induzido por laser sem calibração
D	Descolorido	---
EDXRF	<i>Energy-Dispersive X-ray Fluorescence</i>	Fluorescência de raios X por dispersão de energia
FN	Falso Negativo	---
FP	Falso Positivo	---
FPC	<i>Flow Proportional Counter</i>	Contador Proporcional de Fluxo
ICCD	<i>Intensified Charge Coupled Device</i>	Detector de carga acoplada intensificada
ICP-OES	<i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission</i>	Espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente
ICP-MS	<i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>	Espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente
IR	<i>Infrared</i>	Infravermelho
kNN	<i>k-Nearest Neighbor</i>	k-ésimo vizinho mais próximo
LIBS	<i>Laser Induced Breakdown Spectroscopy</i>	Espectroscopia de emissão óptica com plasma induzido por laser
NIR	Near-Infrared	Infravermelho próximo
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>	---
O	Original	---
PCs	<i>Principal Components</i>	Componentes Principais
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>	Análise de Componentes Principais
PLS-DA	<i>Partial Least Squares Discriminant Analysis</i>	Análise discriminante pelo método de mínimos quadrados parciais
S	Sintético	---

SC	<i>Scintillation Counters</i>	Contadores de cintilação
SC1	Sintético Castanho 1	---
SC2	Sintético Castanho 2	---
SL	Sintético Loiro	---
SM	Sintético preto com mechas loiras	---
SP	Sintético Preto	---
SV	Sintético Vermelho	---
SIMCA	<i>Soft Independent Modeling of Class Analogy</i>	Modelagem flexível e independente por analogia de classe
SoHT	<i>Society of Hair Testing</i>	---
T	Tingimento	---
UV	<i>Ultraviolet</i>	Ultravioleta
VN	Verdadeiro Negativo	---
VP	Verdadeiro Positivo	---
WDXRF	<i>Wavelength Dispersive X-ray Fluorescence</i>	Fluorescência de raios X por dispersão de comprimento de onda
XRF	<i>X-ray Fluorescence</i>	Fluorescência de raios X

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1	Fluorescência de raios X por dispersão de comprimento de onda (WDXRF) 22	
2.1.1	<i>Histórico da Fluorescência de raios X (XRF).....</i>	<i>22</i>
2.1.2	<i>Fundamentos da Fluorescência de raios X (XRF).....</i>	<i>23</i>
2.1.3	<i>Princípio da Fluorescência de raios X por dispersão de comprimento de onda (WDXRF)</i>	<i>25</i>
2.1.4	<i>Aplicações utilizando a Fluorescência de raios X por dispersão de comprimento de onda (WDXRF)</i>	<i>27</i>
2.2	Espectroscopia de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS) 28	
2.2.1	<i>Histórico da Espectroscopia de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS)</i>	<i>28</i>
2.2.2	<i>Princípio da espectroscopia de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS)</i>	<i>29</i>
2.2.3	<i>Aplicações em matrizes biológicas usando a espectroscopia de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS)</i>	<i>32</i>
3	OBJETIVOS	35
3.1	Objetivo Geral	35
3.2	Objetivos Específicos.....	35
4	PARTE EXPERIMENTAL	35
4.1	Amostras.....	35
4.2	Procedimento de modificação estética das amostras	36
4.3	Conjunto amostral.....	36
4.4	Preparo das amostras para as medições espectrométricas	37

4.5	Medições utilizando WDXRF	39
4.6	Medições utilizando LIBS.....	39
4.7	Avaliação dos dados com ferramentas quimiométricas	40
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1	Informações analíticas geradas com a WDXRF	45
5.2	Informações analíticas geradas com a LIBS.....	55
5.3	Modelos de classificação multivariada.....	64
6	CONCLUSÕES	66
7	REFERÊNCIAS.....	67
8	ANEXOS	72

1 INTRODUÇÃO

O cabelo é considerado um biomaterial filamentoso constituído majoritariamente por proteínas, tal como a queratina que representa entre 65 e 95% em massa da fibra capilar. O crescimento do fio ocorre a partir de cavidades em forma de sacos chamado folículos. Cada folículo contém componentes glandulares e musculares, responsáveis por fornecerem material metabólico necessário para o crescimento saudável do cabelo. O diâmetro de um fio de cabelo humano varia entre 15 e 120 μm . Uma pessoa adulta contém, em média, 15.000 fios de cabelo e o crescimento desses fio é de aproximadamente 1 cm por mês [1, 2].

O cabelo possui três camadas essencialmente: (i) a cutícula é a camada externa composta por várias subcamadas separadas por um complexo de células - endocutícula, epicutícula e exocutícula, (ii) o córtex representa o principal componente do cabelo, formado por um conjunto de células cilíndricas denominado de matriz, local onde fica situada a queratina e outras proteínas e (iii) a medula que constitui a camada mais interna do folículo e pode ser ausente em alguns tipos de fios, porém não acarreta em modificação da estrutura do cabelo [3, 4].

O ciclo de crescimento de um fio de cabelo humano consiste em três estágios: anágena, catágena e telógena. A anágena é a fase de crescimento e do desenvolvimento do cabelo, onde o folículo está em contato com micronutrientes que são transportados por capilares sanguíneos. De maneira equivalente ocorre o transporte dos componentes não endógenos na base do folículo, expondo externamente à epiderme a um contaminante, assim como, aos medicamentos e/ou drogas ilícitas, os quais um indivíduo tenha consumido, mesmo que esporadicamente. A catágena é uma fase transitória com duração de apenas algumas semanas, onde não há replicação do bulbo germinativo dos folículos, e então o cabelo começa a entrar na fase de repouso, conhecida como telógena. Nesta fase o cabelo cai, sendo empurrado por um novo folículo que nasce no mesmo local [5, 6].

Dessa forma, o cabelo tem sido utilizado como alternativa às outras matrizes biológicas, tais como sangue, suor ou urina para monitorar a exposição ambiental, estimar a intoxicação por metais, analisar o estado nutricional e diagnosticar doenças em seres humanos [7, 8]. Outra particularidade atraente está no fato deste tipo de amostra possuir vantagens importantes, tais como simplicidade de amostragem,

facilidade de armazenamento, de transporte e de manuseio. Ressalta-se também a estabilidade elevada desta matriz analítica em relação aos processos de deterioração, desde a coleta até a análise, o que permite um amplo período de investigação entre meses até anos o que revela um caráter imprescindível para a representatividade do material durante o desenvolvimento de um método analítico para fins forenses [9, 10].

Em geral para este tipo de amostra, é frequente em encontrar na literatura científica métodos laboriosos que exigem muitas etapas de preparo da amostra, reagentes químicos tóxicos e efetuam a destruição da amostra, o que em muitos casos comprometem a frequência analítica e a exequibilidade considerando custos de reagentes e de instrumentação [11, 12].

Nesse contexto, a Fluorescência de raios X por dispersão de comprimento de onda (WDXRF) tem recebido apreciável interesse, uma vez que oferece medidas não invasivas, rápidas e multielementares [13, 14]. Por outro lado, outra técnica espectroanalítica tem recebido destaque como a Espectroscopia de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS) que permite uma ampla faixa de detecção elementar que inclui além dos elementos inorgânicos aqueles orgânicos, tais como C, H, N e O [15, 16].

A WDXRF e a LIBS apresentam uma característica primordial para as medidas em amostras como a de objeto desta tese de doutorado, possibilidade de análise direta da amostra, sem necessidade de reagentes ou procedimentos por via úmida. Tendo em vista que estes dados apresentam alta dimensionalidade, as ferramentas quimiométricas podem contribuir para uma melhor interpretação e extração de informações analíticas provenientes destes sinais [17, 18]. Assim, muitas questões relacionadas à caracterização do cabelo humano podem ser elucidadas por meio das duas técnicas analíticas. Logo, um estudo que possa avaliar a composição química de amostras de cabelo humano com técnicas não-destrutivas e que proporcione a proposição de modelos para a avaliação do cabelo humano se apresenta de grande relevância no contexto da Química Analítica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fluorescência de raios X por dispersão de comprimento de onda (WDXRF)

2.1.1 Histórico da Fluorescência de raios X (XRF)

Em 1895, foi observado por Roentgen, trabalhando com tubos de descarga de raios catódicos, a produção de um tipo de radiação a qual denominou de raios X. Os raios X são produzidos pela desaceleração de elétrons de alta energia e/ou transição de elétrons dos orbitais internos dos átomos. Assim, devido à sua descoberta, iniciaram-se os estudos das linhas de emissão e suas relações com os elementos químicos [19-21].

Em 1911, o cientista C. G. Barkla estudou as séries de linhas de emissão de raios X característicos quando um elemento é submetido à radiação X. Em 1912, M. Lanue, juntamente com M. Fiedrich e P. Knipping, observaram a interferência dos raios X na dispersão de radiação por um cristal. Em 1913, W. H. e W. L. Bragg usaram raios X para difração por cristais. Assim, Bragg interpretou a difração como uma reflexão de rede de planos selecionados em um cristal (Lei de Bragg). Neste mesmo ano, o cientista Henry Moseley, estabeleceu uma relação entre a frequência das linhas características dos raios X emitidos por um elemento químico e o número atômico. A partir dessa relação denominada lei de Moseley, iniciou a aplicação da espectroscopia de raios X em análises químicas. Ainda no ano de 1913, W. D. Coolidge introduziu a utilização do filamento incandescente no tubo de raios X de alto vácuo e o cientista J. Chadwick observou o espectro de raios X característico obtido com partículas α [19-21].

No ano de 1922, A. H. Compton explicou o efeito relacionado ao espalhamento incoerente (Efeito Compton), ou seja, o fóton de raios X incidente colide com um elétron fracamente ligado a um orbital externo de um átomo, que resulta em uma diminuição da energia do fóton espalhado. No ano seguinte, os cientistas D. Coster e G. von Hevesy identificaram o elemento químico 72 (Hf), que foi o primeiro identificado pelo espectro de raios X. Em 1928, Glocker e Schreiber foram os primeiros a aplicar a espectrometria de emissões secundárias de raios X, também conhecida como

fluorescência de raios X. No ano de 1938, Hilger e Watts noticiaram o primeiro espectrômetro de raios X comercial, que foi desenhado por T. H. Laby. Por conseguinte, em 1948, os cientistas H. Friedman e L. S. Birks construíram o primeiro protótipo de um espectrômetro comercial com tubo de raios X [19, 20].

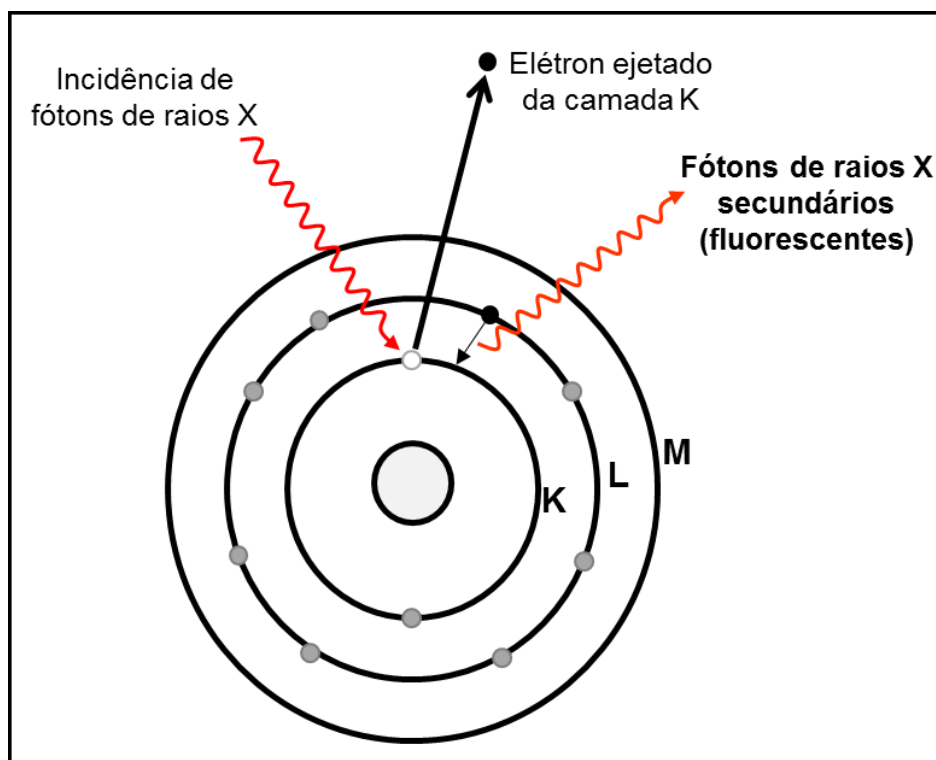
Atualmente, a Fluorescência de raios X (XRF) é uma ferramenta de destaque em análise química elementar, onde a utilização abrange desde a identificação quanto a quantificação dos elementos químicos constituintes de diferentes amostras, estejam estas nos estados sólido, líquido ou na forma de emulsão e pós. Além disso, pouco ou nenhum preparo de amostra é requerido para execução da análise [21, 22].

2.1.2 Fundamentos da Fluorescência de raios X (XRF)

A XRF é uma técnica multielementar bastante difundida e consolidada tanto na ciência quanto na indústria, que permite identificar e determinar a concentração de elementos presentes em amostras de diferentes origens [22].

O princípio baseia-se no fenômeno fotoelétrico, ou seja, é necessário que elétrons de camadas mais internas (camada K, por exemplo) sejam ejetados para que ocorra a produção de raios X. A energia do fóton deve ser maior que a energia com a qual o elétron está associado ao núcleo para que ocorra esse processo. Partindo deste princípio, em espectrômetros modernos, feixes de raios X primários contendo fótons de energia suficiente são incididos sobre a amostra para “retirar” elétrons das camadas mais próximas ao núcleo, como K ou L. Por conseguinte, o decaimento espontâneo dos elétrons mais energéticos ocorre para completar as vacâncias deixadas nas camadas mais internas, provocando a emissão de raios X secundários (ou fluorescentes), conforme pode ser observado na ilustração da Figura 1 [19-22].

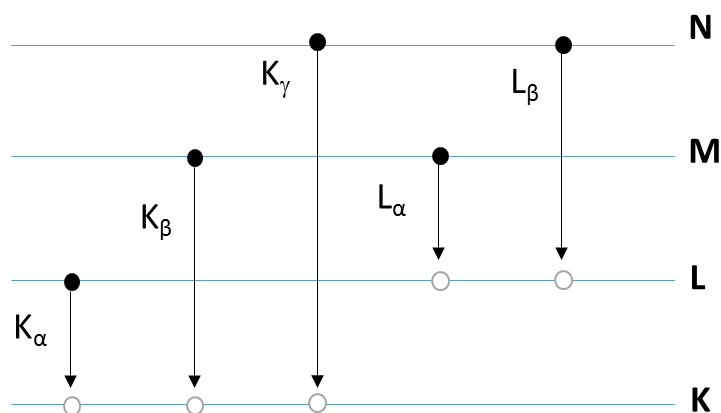
Figura 1 - Ilustração do processo de excitação por incidência de fonte de fótons de raios X, com ejeção eletrônica da camada K e emissão secundária (fluorescência) de fótons de raios X.



Fonte: elaborada pela autora.

As mudanças de níveis energéticos podem ser provocadas por elétrons de alta energia ou por fótons. As camadas são designadas pelas letras K, L, M, N, entre outras. As diferenças de energias entre os orbitais dos elétrons nos diferentes níveis dão origem às radiações α , β , γ , entre outras, conforme a Figura 2 [19, 20].

Figura 2 - Ilustração para o diagrama de transições eletrônicas de um átomo.



Fonte: elaborada pela autora.

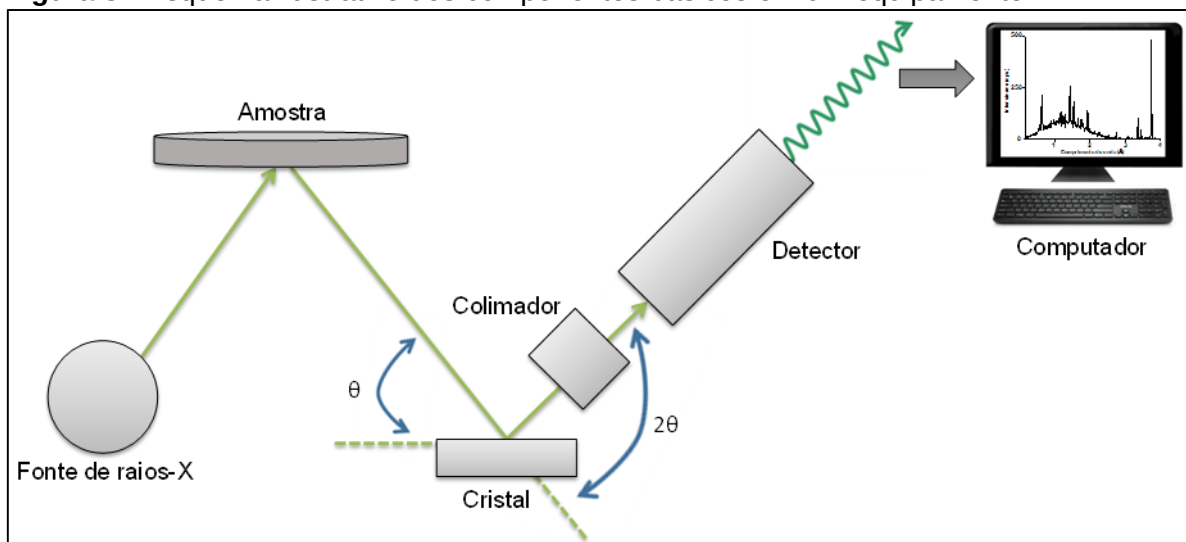
Assim, cada elemento tem linhas características, resultantes das transições eletrônicas no átomo. Tendo em vista que a diferença de energia entre duas camadas específicas é quantizada (ou seja, característica de um elemento químico em particular), o fóton emitido em uma dada relaxação sempre terá a mesma energia. Consequentemente, os raios X fluorescentes podem ser classificados tanto pela energia envolvida nestas transições, princípio da Fluorescência de raios X por dispersão de energia (EDXRF), quanto pela dispersão de comprimento de onda (WDXRF) [23].

2.1.3 Princípio da Fluorescência de raios X por dispersão de comprimento de onda (WDXRF)

A WDXRF é uma técnica em que a radiação fluorescente de cada elemento ocorre em um determinado comprimento de onda e, cristais especialmente projetados são empregados para separar os vários comprimentos de onda por difração [13].

Na Figura 3, podem ser observados os componentes básicos de um espectrômetro de raios X para técnica de WDXRF constituídos por uma fonte de raios X, o porta amostras, um cristal que separa os vários comprimentos de onda emitidos pela amostra, um colimador que direciona o feixe de raios X secundário ao detector.

Figura 3 - Esquema ilustrativo dos componentes básicos em um equipamento WDXRF.



Fonte: elaborada pela autora.

Geralmente, os elementos ródio (Rh) e tungstênio (W) são utilizados como fontes de raios X, por permitirem a análise desde os elementos leves até os pesados [14].

Existem diferentes cristais que podem ser utilizados na WDXRF, como AX03, Ge111, LiF200. Obedecendo a lei de Bragg (equação 1), pode-se variar o ângulo de incidência no cristal simultaneamente ao detector, em termos de 2θ . Dessa forma, o monocristal separa o feixe policromático de raios X em feixes monocromáticos individuais [14].

$$n \times \lambda = 2d \sin(\theta) \quad \text{Equação (1)}$$

Onde:

- n = número inteiro (1, 2, 3, ...), denominado ordem da difração;
- λ = comprimento de onda da linha espectral (Å);
- d = distância do plano utilizado (Å);
- θ = ângulo de Bragg formado entre a direção do feixe incidente e o plano de átomos do cristal difrator (°).

Segundo a lei de Bragg, quanto maior à distância (d) associada ao plano cristalográfico utilizado, menor será a distância angular dos picos e, por conseguinte, a resolução do espectro. Além disso, menor será o ângulo de Bragg para um dado comprimento de onda emitido pela amostra. Dentro desse contexto, quando se utiliza a WDXRF para explorar a composição elementar de uma amostra, devem-se escolher cristais com valores de d grandes para elementos leves ($Z \leq 14$) e cristais com valores de d pequenos para elementos pesados ($Z > 14$). Por exemplo, o cristal LiF(200), possui o menor valor de espaçamento interplanar $d = 2,014 \text{ Å}$, enquanto que o cristal sintético RX75 possui o maior, $d \approx 200 \text{ Å}$. Dessa forma, uma adequada e ampla janela de comprimentos de onda será utilizada para detecção da composição química elementar de uma determinada amostra. Em relação aos detectores, os principais tipos utilizados são: *Flow Proportional Counter* (FPC) e o *Scintillation Counters* (SC) [14, 19, 21].

Um mesmo átomo pode apresentar mais de uma linha de emissão de raios X. Logo, um espectro de WDXRF para uma amostra multielementar será a resultante da

sobreposição de tantos espectros quanto forem os elementos químicos presentes na amostra [13, 24].

2.1.4 Aplicações utilizando a Fluorescência de raios X por dispersão de comprimento de onda (WDXRF)

A utilização da técnica WDXRF tem ganhado expressivo destaque, pois as amostras podem ser analisadas diretamente, isto é, raramente necessitando de pré-tratamento. Nesse sentido, muitos métodos analíticos vêm sendo desenvolvidos para determinação química elementar em diferentes tipos de amostras [13, 22].

Singh *et al.*, quantificaram os elementos essenciais Na, Mg, P, S, Cl, K, Ca, Fe, Cu e Zn, em amostras de sangue de pacientes acometidos por câncer de mama e pessoas saudáveis através da técnica WDXRF. Sabe-se que o excesso ou a deficiência de elementos essenciais, dentro do contexto da fisiologia humana pode ser consequência de alguma doença, dentre elas o câncer. Neste estudo, observou-se que as concentrações para todos os elementos analisados foram superiores nas amostras de sangue não saudáveis, com nível de confiança de 95% [24].

O uso de amostras de cabelo para determinação da concentração de micronutrientes é de grande interesse por muitos pesquisadores. Algum componente presente no cabelo pode ser considerado um potencial biomarcador para diagnóstico, acompanhamento e prevenção de doenças. Dentro desse contexto, Maziar *et al.* [25], desenvolveram um método de detecção prévia de câncer de mama pela WDXRF em comparação ao método clássico de mamografia. Em outro estudo, Siritapetawee *et al.*, selecionaram 30 amostras de cabelo, divididas em dois grupos: 15 amostras de pacientes diagnosticados com algum quadro de demência e 15 de pessoas saudáveis). Todas as amostras eram de pessoas sexagenárias. Como resultado, O, S, Cl, Si, Ca, P, Mg, Al, Na, Fe e K foram encontrados em ambos os grupos. Porém, elevadas concentrações para os elementos Ca, Cl e P foram evidenciados em amostras de cabelo para o grupo de pacientes com algum quadro de demência [26].

Bielecka e colaboradores, determinaram a concentração dos elementos químicos em amostras de cabelo humano a partir dos perfis espectrais provenientes da técnica WDXRF. Nesse estudo, os valores percentuais da concentração (m/m) para os elementos químicos foram: O (13.0 ± 0.43), Na (0.051 ± 0.007), Mg ($0.022 \pm$

0.004), Al (0.012 ± 0.003), Si (0.029 ± 0.005), P (0.014 ± 0.004), S (3.70 ± 0.06), Cl (0.0082 ± 0.0030), K (0.0015 ± 0.0010) e Ca (0.138 ± 0.011). Logo, estes resultados evidenciaram a potencialidade da técnica WDXRF para o mapeamento da composição química elementar de amostras de cabelo humano, inclusive para os elementos O, Na, Mg e Al que possuem baixos números atômicos, isto é, $Z < 14$. Portanto, observa-se que a técnica WDXRF apresenta-se como ferramenta analítica sensível à avaliação elementar de amostras de cabelo [27].

2.2 Espectroscopia de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS)

2.2.1 Histórico da Espectroscopia de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS)

O laser é a fonte de radiação em um sistema LIBS. Dessa forma, a técnica LIBS está diretamente relacionada com o desenvolvimento da tecnologia dos lasers. Em 1958, foi apresentado o primeiro estudo sobre um laser operando na faixa do espectro visível por Shawlow e Townes [28]. Em 1960, o primeiro laser de rubi foi inventado por Theodore H. Maiman. Dois anos depois, Brech e Cross detectaram, pela primeira vez, o espectro de um plasma induzido em um material vaporizado por um laser de rubi. No entanto, para produzir o plasma e a emissão espectral subsequente foi empregado uma fonte auxiliar. Em 1963, Debras-Guédon e Liodec publicaram o primeiro uso analítico para análise espectroquímica de superfícies. Maker *et al.*, em 1964, relataram a primeira observação da quebra induzida opticamente em um gás. No mesmo ano, Runge *et al.*, relataram sobre o uso de laser de rubi pulsado para excitação direta de faíscas em metais. Em 1966, Evtushenko analisou o efeito de faíscas de dois lasers e, na mesma época, Young *et al.* descreveram as características das faíscas de ar induzidas por laser [15, 29].

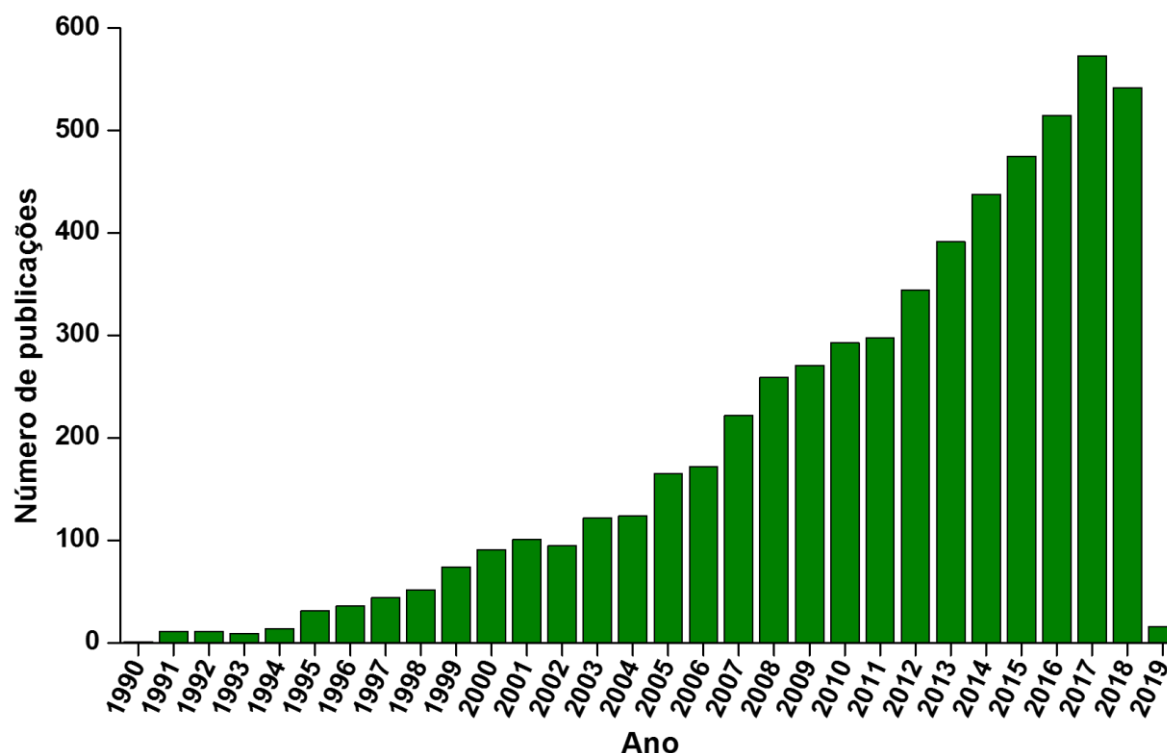
No período de 1964 a 1967, os primeiros instrumentos baseados nessa técnica foram desenvolvidos por Zeiss (Alemanha), Jarrell-Ash (EUA) e JEOL Ltd (Japão) [15]. Porém, deve-se mencionar que nesses instrumentos, a energia do pulso do laser foi empregada apenas para remover a amostra, seguido por excitação cruzada com uma centelha convencional. No início dos anos 1980, a técnica começou a ser difundida para fins analíticos e surgiram estudos relatando a detecção de Cl e F no ar, detecção

de Be em filtros de carvão, análise de aerossóis, detecção de metais em aço e detecção de U em solução [29, 30].

No entanto, somente em meados da década de 1990, a técnica começou a despertar um maior interesse com o desenvolvimento de lasers mais estáveis e robustos, sistemas ópticos de alta resolução em um amplo intervalo espectral e detectores mais sensíveis que permitiram uma melhor resolução temporal.

Dessa maneira, com o passar dos anos, foi possível observar um crescimento exponencial no número de trabalhos publicados utilizando a técnica LIBS. A Figura 4 demonstra esse crescimento através de uma busca realizada na base de dados *Web of Science*.

Figura 4 - Publicações anuais de artigos relacionados à técnica LIBS, desde 1990 até 2019, baseado na base de dados *Web of Science*.



Fonte: elaborada pela autora.

2.2.2 Princípio da espectroscopia de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS)

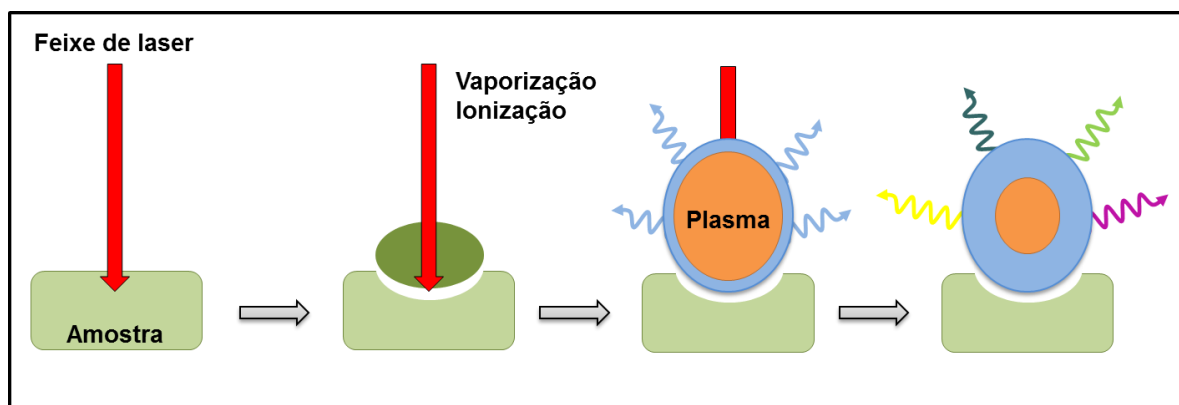
A técnica LIBS baseia-se na espectrometria de emissão óptica e emprega a microamostragem por ablação por laser e formação de um plasma para a determinação dos elementos químicos presentes em uma amostra (sólida, líquida ou

gasosa). O termo “*breakdown*” refere-se ao fenômeno relacionado a ruptura dielétrica das ligações químicas da amostra e à formação de um plasma [15, 31].

As medidas na LIBS podem ser influenciadas por alguns fatores: comprimento de onda do laser, taxa de repetição do laser, energia do laser, *spot size* (área do pulso), Outro fator importante é o *delay time*, que corresponde ao atraso do início do laser até a abertura da janela (onde o sinal será medido). Portanto, é o tempo necessário para reduzir a emissão do contínuo, onde em seguida, irá iniciar a emissão iônica e depois atômica. A emissão do contínuo se dá pelo processo *Bremsstrahlung* (colisões de elétrons com íons e átomos) e pela recombinação de elétrons com íons. Além disso, as propriedades mecânicas, físicas e químicas da amostra, por exemplo, condutividade térmica e coeficiente de absorção, são características importantes na realização das análises utilizando a técnica LIBS para o processo de ablação e, conseqüentemente, ignição do plasma [32, 33].

A técnica emprega um feixe de laser pulsado que apresenta alta irradiância, ordem de $W\text{ cm}^{-2}$ para pulsos com duração de nanosegundos (ns), que é focalizado sobre a superfície da amostra, formando um plasma de alta temperatura (8.000 a 20.000 K). Em seguida, ocorre o aquecimento da amostra e dá origem aos processos de ablação. A ablação a laser é definida como ejeção de material da superfície de um alvo devido aos processos de vaporização e ionização, os quais dependem da absorção de energia da luz do laser pela superfície da amostra. Com o aumento da quantidade de elétrons e íons na região do material vaporizado, ocorre a ignição do plasma, o qual é formado por uma mistura de átomos, íons e espécies químicas tanto provenientes da massa da amostra quanto da atmosfera ambiente, Figura 5 [32].

Figura 5 - Ilustração do processo de ablação por meio de uma fonte de laser.



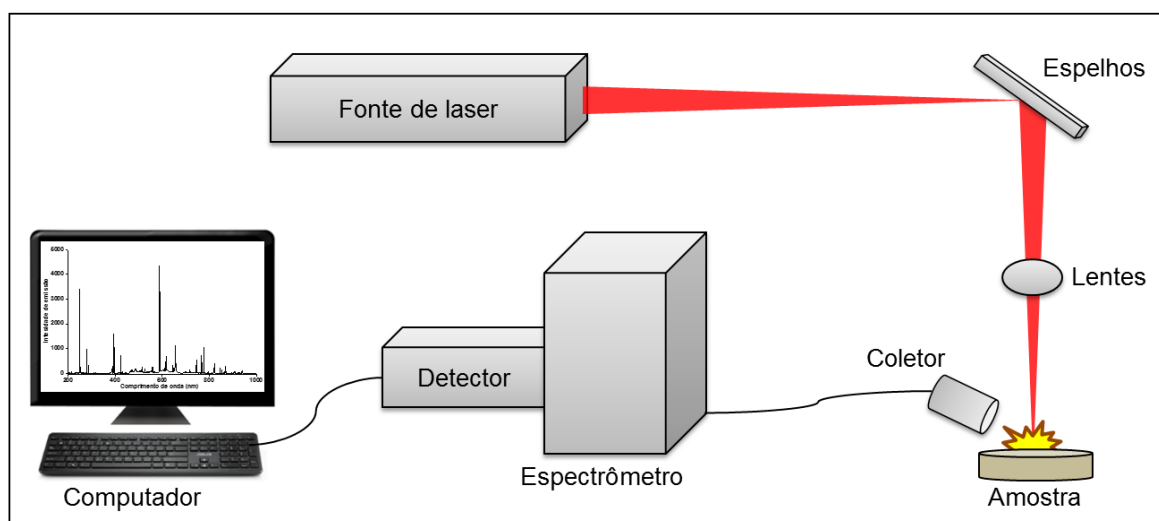
Fonte: elaborada pela autora.

A radiação emitida pelo plasma é coletada por um sistema óptico e, em seguida, transferida para um espectrômetro que dispersa as radiações emitidas pelas espécies atômicas e iônicas presentes no plasma, gerando linhas de emissão características para cada elemento [34].

Para análise espectral e detecção de sinal, podem ser utilizados uma grande variedade de lasers, por exemplo, N_2 , CO_2 , KrF, XeCl, sendo que o mais empregado é o de Nd:YAG (íon Nd^{3+} incorporado no cristal de YAG - granada de ítrio e alumínio), pois fornece pulsos de laser de alta densidade de potência focalizada. Em geral, os espectrômetros são equipados com detectores do tipo CCD e ICCD, que permitem uma rápida análise multielementar, com maior seletividade espectral [33].

Na Figura 6, pode ser observado os componentes básicos de um equipamento LIBS, constituído por uma fonte de laser, um conjunto óptico, uma unidade de detecção e um computador para controle e processamento dos dados.

Figura 6 - Esquema ilustrativo dos componentes básicos em um equipamento LIBS.



Fonte: elaborada pela autora.

Essa técnica oferece vantagens, tais como análises multielementares em tempo real, mínimo preparo da amostra, boa resolução espacial e de profundidade, eliminação de uso de gases para a formação de plasma, baixa produção de resíduos com menor destruição da amostra e a possibilidade de detectar elementos com baixos números atômicos como Li, Be, C, N e O [35]. No entanto, a LIBS apresenta algumas limitações como, dificuldades na realização de calibração devido à falta de materiais

certificados disponíveis para os diferentes tipos de amostras e elevados limites de detecção que dificultam a determinação quantitativa [36].

2.2.3 Aplicações em matrizes biológicas usando a espectroscopia de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS)

A análise da composição elementar em matrizes biológicas é, usualmente, realizada usando as técnicas analíticas, espectroscopia de absorção atômica (AAS), espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES) e espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS). Essas técnicas requerem etapas de decomposição das amostras. Comumente, as amostras são convertidas em soluções por meio de digestões após tratamento ácido ou básico e, em seguida, realizada a determinação da composição elementar. Dessa forma, a capacidade da técnica LIBS na realização de análises diretas sem preparo da amostra tem sido atraente em aplicações biológicas empregando diferentes amostras, como ossos, dentes, unhas, cabelos, entre outras [15, 16, 37].

Nesse contexto, visando avaliar a influência de processos físicos *post-mortem* em amostras de ossos, Tofanelli e colaboradores, compararam os dados obtidos pela aplicação das técnicas LIBS e ICP-OES para determinação de Ca, Zn, Ba, Mg e Sr. Para tal, foram utilizados 8 amostras de ossos, que foram fragmentadas em 3 secções: A (sem tratamento), B (aquecida) e C (carbonizada). Os resultados desse estudo mostraram que as concentrações para a LIBS foram comparáveis àquelas obtidas pela ICP-OES, com nível de confiança de 95%. Os autores concluíram que a LIBS consiste em uma atrativa alternativa para aplicações forenses [38]. Um trabalho realizado por Kasem *et al.* avaliaram o comportamento entre os comprimentos de onda de 1064 nm (IR) e 266 nm (UV) do laser nas flutuações elementares nos espectros LIBS de quatro ossos arqueológicos da dinastia egípcia. No presente estudo, os elementos Ca, Mg e Sr foram detectados. Os resultados mostraram que a UV-LIBS apresentou menores percentuais de valores relativos de desvio-padrão (m/m) em comparação ao IR-LIBS, baseado em material de referência [39].

Um exemplo de aplicação da LIBS em amostras de dentes, foi proposto por Hamzaoui *et al.* [40]. Os autores analisaram a composição elementar do esmalte e de partes com cáries de 13 amostras de dentes humanos. Nesse estudo, os resultados

mostraram que através da técnica LIBS foram detectados os Ba, C, Ca, K, Mg, Na, P, Sr e Zn nessas amostras. Além disso, foram comparadas as razões de intensidade da linha de emissão de Ca ao P e ao Zn no esmalte e superfícies cariadas. Essas comparações mostraram que a perda mineral provocadas por caries é maior para o Ca em relação aos elementos avaliados. Em estudo publicado por Thareja e colaboradores [41], também foram analisados amostras de dentes saudáveis e com caries. A avaliação dos resultados desse estudo para os espectros LIBS mostraram linhas de emissão para os elementos Na, Sr e Ca. Os autores afirmaram que utilizando a técnica LIBS foi possível distinguir entre as partes saudáveis e cariadas dos dentes.

Outro tipo de amostra que tem sido empregado na avaliação da composição elementar por meio da técnica LIBS é a de unha. Assim, utilizando essa abordagem, Harun *et al.* [42] determinaram a composição elementar em amostras de unhas normais e doentes (melanoníquia, leuconíquia e onicólise) de homens e mulheres com diferentes faixas etárias (adolescentes, jovens, adultos e idosos) por meio da técnica LIBS. Nesse estudo, os autores observaram linhas de emissão para os elementos Ca, Mg, K, P, Al, Ti, O e Na. Entre as diferentes faixas etárias, foi observado uma diminuição na intensidade para as linhas de emissão dos elementos Ca e K com o aumento da idade. As linhas de emissão para os elementos Ca, P, K e Al apresentaram maior intensidade para as mulheres em comparação aos homens. A respeito das doenças, os resultados para as unhas que apresentavam melanoníquia exibiram linhas de emissão com maior intensidade para o Ca e menor para o K. Enquanto que a intensidade de todos os elementos na unha com onicólise foi ligeiramente menor que para a unha normal. Unhas com leuconíquia mostraram maior intensidade para o elemento Mg em comparação com unhas normais. Os autores afirmaram que a análise da composição elementar de unhas normais e doentes pode ser realizado utilizando a técnica LIBS, analisando os espectros de emissão. Em estudos semelhantes, Hamzaoui *et al.* [43] e Hosseinimakarem e Tavassoli [44], também utilizaram a técnica LIBS para a avaliação de unhas patológicas e, Almessiere *et al.* [45] analisaram unhas de pessoas com deficiência em vitamina D.

No que concerne à utilização da técnica em análises de amostras de cabelos, Corsi *et al.* [46] utilizaram CF-LIBS para avaliar a composição mineral do cabelo de 11 indivíduos com diferentes idades, gêneros e cor do cabelo. Nesse estudo, os autores observaram linhas de emissão para C, Mg, Ca, Al, H, Na, N, K e O. Além

disso, os autores realizaram a determinação de concentrações relativas dos elementos Mg, K, Ca, Na e Al, que apresentaram os valores de 210, 100, 580, 150 e 14 ppm, respectivamente. Assim, os autores relatam a possibilidade de intoxicação por alumínio. Também foi realizado a relação Na/K e Na/Mg entre as amostras de cabelo estudadas dos 11 indivíduos. Para comparação, o indivíduo A apresentou o valor de 1,35 para a relação Na/Mg utilizando a CF-LIBS, enquanto que a técnica ICP-MS apresentou o valor de 1,5. Dessa forma, estes resultados demonstraram o uso da técnica CF-LIBS para a determinação da variação de elementos minerais em amostras de cabelo.

Emara e colaboradores [47] também avaliaram o potencial da LIBS para a determinação de elementos traços em amostras de pelos de cavalo em comparação com a técnica AAS. Utilizando a técnica LIBS, foram detectados os elementos Na, K, Ca, Mg, Si, Fe, Pb e Zn. Os autores também calcularam as concentrações de massa relativa para os elementos Fe e Zn baseado na concentração de C, empregado como elemento de referência. Os valores percentuais para as concentrações relativas de massa utilizando a técnica AAS foram de 2,1% para Fe e 0,23% para Zn, enquanto que empregando a técnica LIBS foram 1,78% e 0,26%, respectivamente. Assim, este estudo mostrou o uso da LIBS como uma alternativa rápida, apresentando resultados consistentes com os observados pela técnica AAS na determinação de elementos traços em amostras de pelos de cavalos.

Outra avaliação interessante usando a LIBS foi observada por Gondal e colaboradores [48] na detecção de cromo (Cr) em corantes capilares sintéticos. Nesse estudo foram avaliadas 3 amostras de tinturas de cabelo da Arábia Saudita. Os autores utilizaram um equipamento LIBS com feixe de laser pulsado de 266 nm como fonte de excitação e um espectrômetro equipado com uma câmara ICCD. Para a calibração e também quantificação dos níveis de Cr nas amostras de tinturas capilares foi utilizado a linha espectral de transição atômica correspondente a 427,5 nm. Nesse estudo, o limite de detecção para o cromo foi de 1,2 ppm. Os resultados desse estudo foram validados usando a técnica analítica ICP-MS. Dessa forma, os autores obtiveram resultados de concentração (ppm) para as amostras 1, 2 e 3, equivalente a 11, 9 e 5 para a técnica LIBS, e os valores 9,8, 8,1 e 4,6 para a ICP-MS, respectivamente. Assim, estes resultados demonstram que a técnica LIBS pode ser

aplicada para análise rápida do elemento Cr em produtos cosméticos utilizados para mudar a cor do cabelo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Este estudo de doutorado teve como objetivo geral a triagem da composição química de amostras de cabelo humano levando em consideração vários parâmetros de origem e característica das amostras, por meio das técnicas WDXRF e LIBS combinadas com ferramentas quimiométricas.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar o potencial das técnicas WDXRF e LIBS para diferenciar as amostras de cabelo humano;
- ✓ Utilizar os dados espectrais obtidos das técnicas espectroanalíticas combinados com ferramentas quimiométricas para propor modelos de classificação multivariada para as amostras de cabelo humano.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Amostras

Amostras de cabelo humano foram coletadas em salões de cabeleireiros da cidade de Araraquara/SP e também, fornecidas por doadores voluntários do IQ/CAR da UNESP. Neste estudo de doutorado, estas amostras foram denominadas de cabelo original. As amostras foram coletadas seguindo o protocolo da *Society of Hair Testing* (SoHT) que recomenda que o corte dos fios de cabelo seja efetuado a partir da região posterior do vértice da cabeça; o mais próximo possível do couro cabeludo [49]. Já, as amostras de cabelo sintético foram adquiridas em mercado local (Araraquara/SP). Após a coleta das amostras foi necessário efetuar um procedimento de limpeza e

descontaminação [50]. Assim, as amostras foram lavadas em três etapas com dois solventes diferentes: i) acetona (Neon comercial, Suzano/SP, grau analítico), ii) Água Milli Q™ e iii) acetona novamente.

4.2 Procedimento de modificação estética das amostras

Nas amostras de cabelo humano descritas anteriormente foi realizado um procedimento de descoloração seguindo um procedimento como aquele efetuado em salões de cabelereiro. Para tal procedimento foi utilizado um kit comercial da Ivel Indústria de Perfumes e Cosméticos Ltda (Nova Iguaçu, RJ, Brasil) que contém um pó descolorante e água oxigenada 30 volumes e, após a mistura dos produtos, cada amostra foi exposta durante 40 minutos. Após esta etapa, os fios de cabelo foram lavados com um sabão neutro e secos a temperatura ambiente durante 24 horas. Assim, após este procedimento de modificação estética, as amostras passaram a ser designadas de cabelo descolorido. Todas as amostras foram estocadas à temperatura ambiente em frascos plásticos inertes e descontaminados.

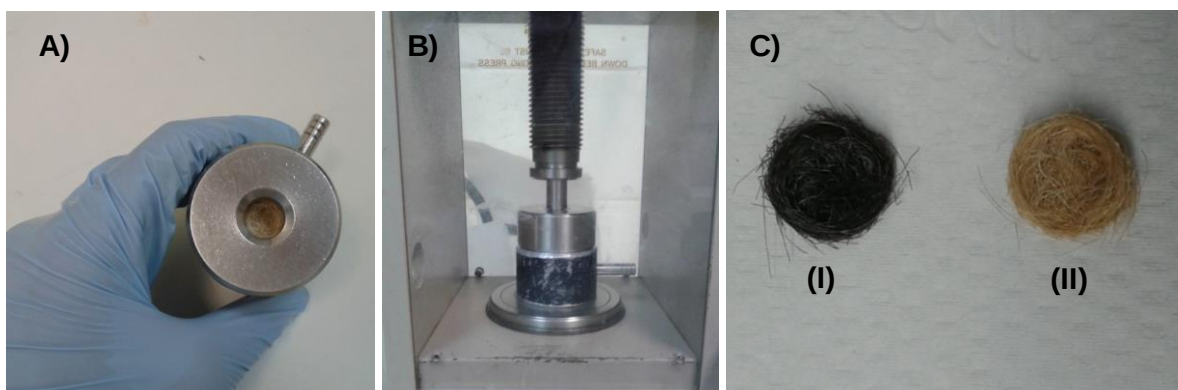
4.3 Conjunto amostral

O conjunto amostral foi constituído por 6 amostras de cabelo sintético, 64 amostras de cabelo original e 63 amostras de cabelo descolorido. As amostras F40H1 e F40H2 na Figura 8 foram representadas por uma única amostra de cabelo descolorido, visto que tratava-se do mesmo doador com tipo de textura, diferindo somente na cor do pigmento utilizado na tintura de hena. As 64 amostras de cabelo original foram provenientes de 32 mulheres e 32 homens. Entre as amostras do gênero feminino, 6 eram de indivíduos com idade entre 10 e 16 anos e as outras 26, entre 18 e 68 anos. Já aquelas do gênero masculino, 8 amostras eram de indivíduos com idade entre 1 e 15 anos e as demais representaram a faixa etária entre 22 e 69 anos.

4.4 Preparo das amostras para as medições espectrométricas

Cada amostra de cabelo foi representada por uma massa de 150 mg que foi colocada em um molde de 13 mmØ, e comprimida com a ajuda de uma prensa hidráulica manual (GS15011, Specac, Orpington, Kent, Inglaterra) por 60 segundos a 8 kN, como mostrado nas Figuras 7 (A) e 7 (B). A Figura 7 (C) mostra as pastilhas de cabelo após a prensagem.

Figura 7 - Procedimento experimental para preparação da amostra: A) molde utilizado para a conformação das amostras em forma de pastilha, B) prensa hidráulica manual e C) pastilhas de cabelo, sendo (I) original e (II) descolorido.

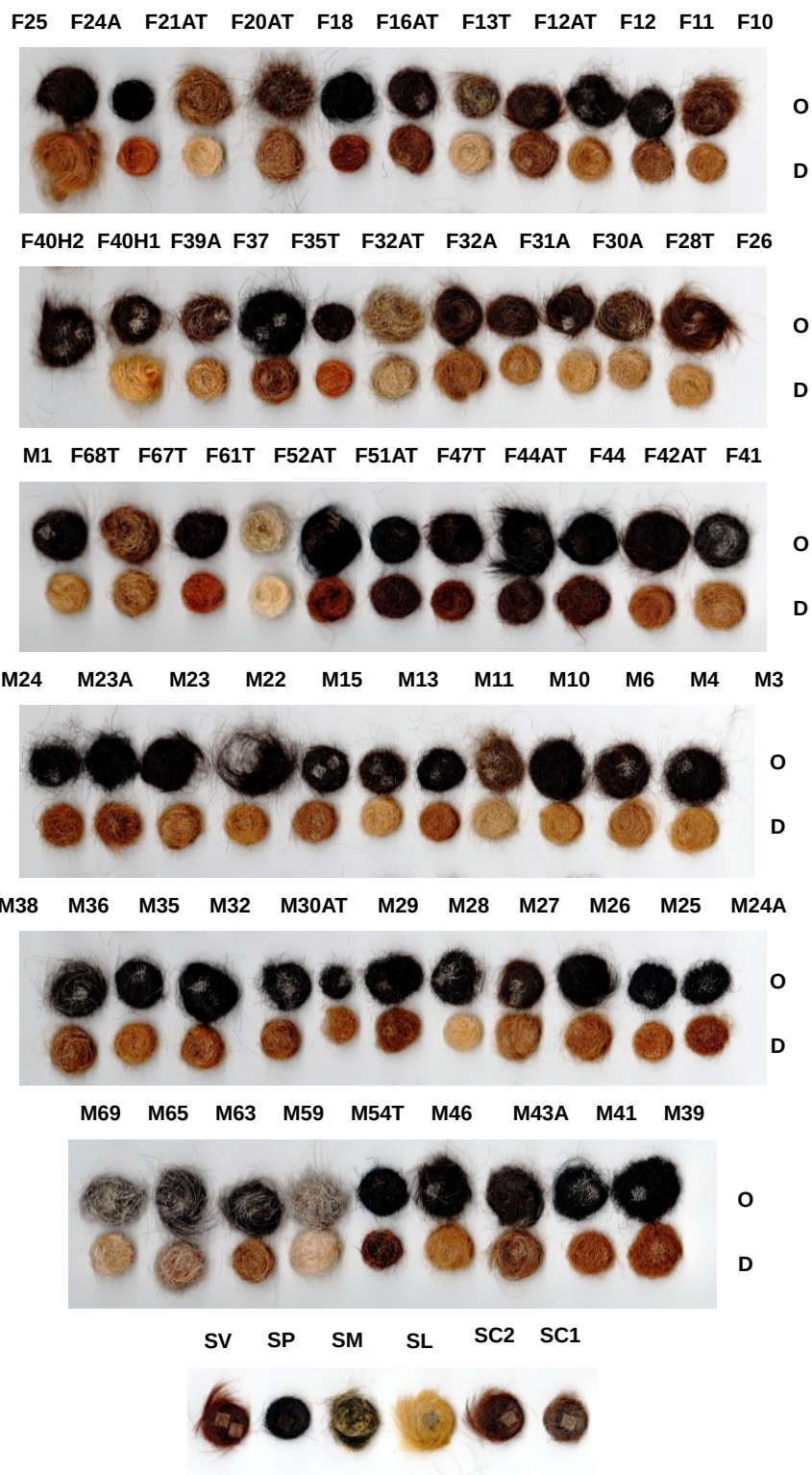


Fonte: adaptada de Santos, M. C; Speranca, M. A; Pereira, F. M. V. *X-Ray Spectrometry* (2018, 47, p. 254).

A Figura 8 mostra uma imagem de todas as amostras de cabelo humano original e descolorido, bem como as amostras de cabelo sintético após a conformação do material mostrada na Figura 7.

Na Figura 8, as legendas de cada amostra de cabelo humano são representadas pelas letras F e M para assinalar o gênero feminino e masculino, respectivamente. Os números se referem às idades das pessoas doadoras. As amostras de cabelo originais apresentavam diferentes naturezas quanto aos procedimentos cosméticos, alisamento, tingimento e hena, designados pelas letras A, T e H, respectivamente. Já as amostras de cabelo sintético foram assinaladas com a letra S conforme as cores loiro (L), preto com mechas loiras (M), preto (P) e vermelho (V). As amostras de cabelo sintético na cor castanho apresentavam duas tonalidades, assim, foram designadas como C1 e C2.

Figura 8 - Imagem das amostras de cabelo, onde os números correspondem a idade das pessoas doadoras, as letras F e M para o gênero feminino e masculino, respectivamente. A letra A representa cabelo com alisamento, letra T com tingimento e a letra H com hena. As amostras de cabelo sintético foram assinaladas com a letra S conforme as cores: castanho (C1 e C2), loiro (L), preto com mechas loiras (M), preto (P) e vermelho (V).



Fonte: elaborada pela autora.

4.5 Medições utilizando WDXRF

Os espectros gerados pela WDXRF foram registrados utilizando um instrumento ARL Perform'X WDXRF (Thermo Scientific, Madison, WI, EUA). Este equipamento possui uma fonte de Rh para geração dos raios X sendo possível ser operado na potência máxima de 4.200 W.

As medições foram realizadas diretamente nas pastilhas de cabelo (Figura 8) sob vácuo, utilizando uma corrente de 50 mA, uma tensão de 50 kV e um colimador de feixe com 10 mm de diâmetro. Para este estudo foram utilizados dois cristais analisadores. O cristal LiF 200 que apresenta uma faixa de comprimento de onda entre 0,17 - 3,88 Å, correspondente aos elementos K e U e o cristal AX03 com faixa entre 3,99 - 6,89 Å entre O e Si, ambos com resolução 0,01. Para as medidas com os dois cristais foi utilizado o detector do tipo *flow proportional counter* (FPC).

O tempo de medição foi de 15 minutos por amostra. Um total de 3 leituras foi realizado para cada amostra em dias diferentes. Dessa forma, o tamanho da matriz **X** composta pelos dados brutos foi constituída por 399 linhas que correspondem as amostras e 805 colunas correspondente aos comprimentos de onda. Para a caracterização das linhas de emissão WDXRF foi consultada a base de dados do *National Institute of Standards and Technology* (NIST).

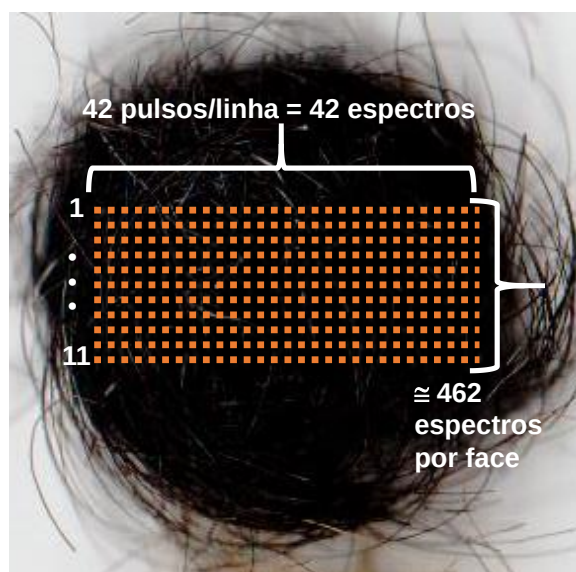
4.6 Medições utilizando LIBS

As medições LIBS foram realizadas utilizando um espectrômetro comercial J200 (Applied Spectra, Fremont, CA, EUA). Este instrumento está equipado com um laser Nd:YAG (1064 nm) e um espectrômetro CCD constituído de 6 canais, com faixa espectral entre 186 e 1042 nm e pode ser operado com energia máxima de 100 mJ.

As condições experimentais utilizadas foram energia de pulso do laser de 80 mJ, *delay time* de 0,5 µs, *spot size* de 125 µm, taxa de repetição do laser de 5,0 Hz com fluência do laser estimada em 652 J cm⁻². Para as medições foi efetuado um mapeamento de cada pastilha de cabelo que consistiu em 11 linhas com distância de 4 mm entre uma e outra. Para cada linha foi incidido um total de 42 pulsos de laser, gerando 42 espectros por linha e sendo gerado por cada face da pastilha, 462

espectros, conforme ilustrado na Figura 9. Um total de 924 espectros foi adquirido para cada amostra, sendo mapeadas ambas as faces da pastilha (superior e inferior). Assim, o tamanho da matriz **X** para os dados brutos foi 122.892 linhas que corresponde as amostras e 12.288 colunas correspondente aos comprimentos de onda. O programa computacional Aurora (Applied Spectra) e a base de dados do NIST foram utilizados para a identificação das linhas de emissão.

Figura 9 - Ilustração do mapeamento na pastilha de cabelo realizado com a LIBS.



Fonte: elaborada pela autora.

4.7 Avaliação dos dados com ferramentas quimiométricas

Após a aquisição dos espectros, os dados brutos foram organizados em uma matriz **X**, onde cada linha corresponde a uma amostra e as colunas correspondem às variáveis (comprimentos de onda). Os dados gerados por meio da técnica WDXRF foram representados em uma matriz de tamanho 399x805. Enquanto que para a LIBS, o tamanho da matriz de dados foi 122.892x12.288.

Durante as medições podem ocorrer questões relacionadas com a razão sinal/ruído influenciadas pela heterogeneidade da amostra e/ou flutuações do sinal. Assim, o uso de estratégias de normalização dos sinais espectrais pode minimizar estes efeitos. Neste estudo de doutorado foi utilizada uma rotina computacional “libs_treat” que calcula 12 modos de normalização nos dados brutos [51]. Esta rotina foi calculada com o programa computacional Matlab R2015b (The MathWorks, Natick,

MA, EUA). Com esta mesma rotina também é possível identificar espectros *outlier*, ou seja, espectros que apresentavam comportamento anômalo comparado aos outros espectros. Dessa forma, para cada amostra foram calculados o desvio padrão, área, máximo e norma euclidiana. Assim, caso fosse detectado um espectro *outlier* (por exemplo, desvio padrão igual a zero), este seria excluído do conjunto de dados e os 12 modos de normalização seriam recalculados. A avaliação destes modos de normalização exige pelo menos dois sinais por amostra para calcular a média e a soma. Os modos de normalização da média e da soma são descritos a seguir e podem ser visualizados conforme mostra a Figura 10:

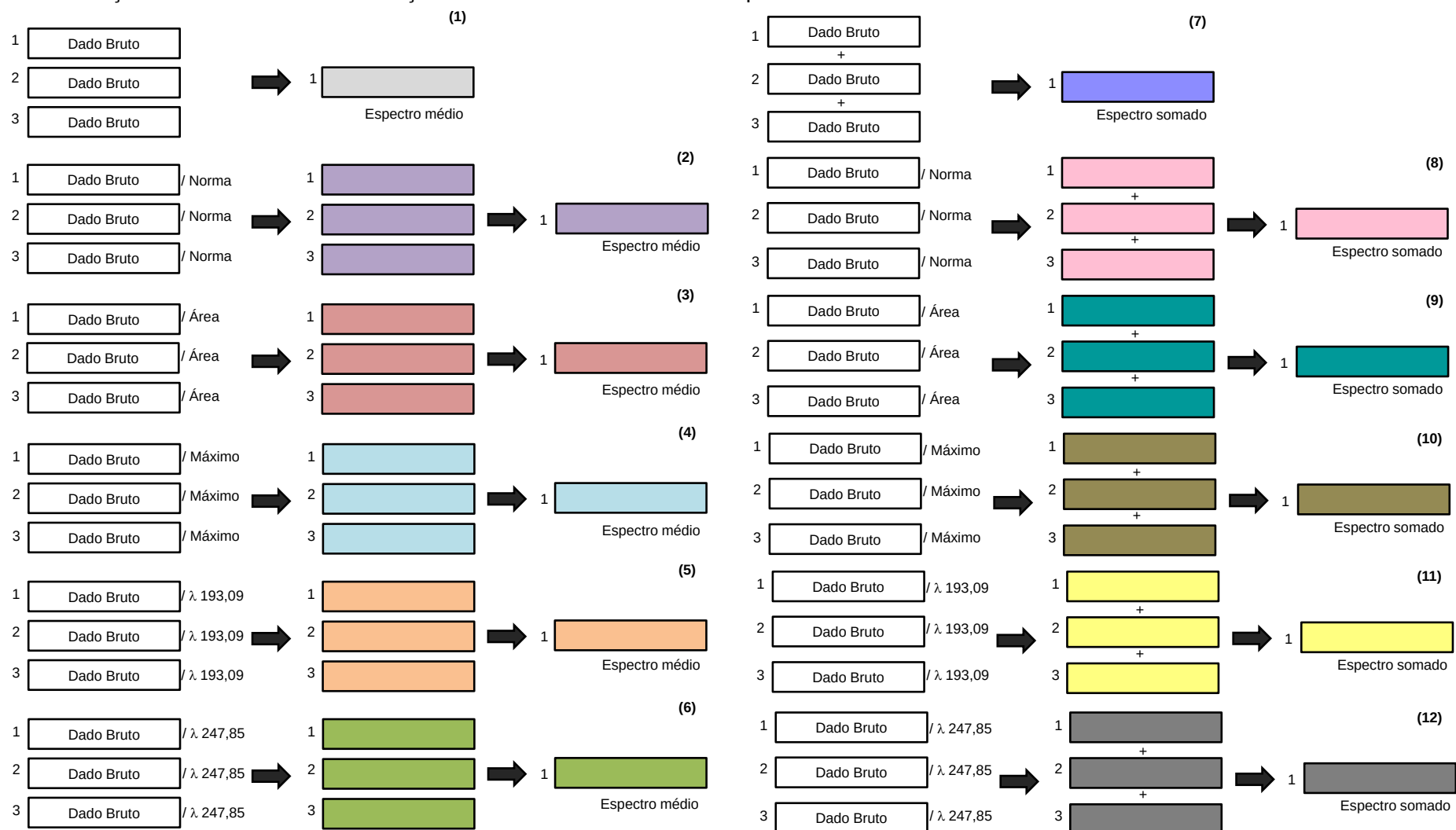
- (1) os espectros são calculados pela média do número de sinais espectrais;
- (2) a norma euclidiana individual (o comprimento do vetor) é calculada para cada espectro bruto e cada um é dividido por este valor. Em seguida, a média dos espectros normalizados pela norma euclidiana individual é calculada;
- (3) a área espectral individual (a soma de todos os sinais) é calculada e os dados brutos são divididos por este valor. Posteriormente, a média dos espectros normalizados pela área espectral individual é calculada;
- (4) o máximo espectral individual (o sinal mais intenso) é identificado para cada espectro e os dados brutos são divididos por este valor. Em seguida, a média dos espectros normalizados pelo máximo espectral individual é calculada;
- (5) a intensidade do sinal da linha C I 193,09 nm é identificada para cada espectro e, em seguida, os dados brutos são divididos por este valor. Posteriormente, a média dos espectros normalizados pela linha C I 193,09 nm é calculada;
- (6) a intensidade do sinal da linha C I 247,86 nm é identificada para cada espectro e, em seguida, os dados brutos são divididos por esse valor. Posteriormente, a soma dos espectros normalizados pela linha C I 247,86 nm é calculada;
- (7) os espectros são calculados pela soma do número de sinais espectrais;
- (8) a norma euclidiana individual é calculada para cada espectro bruto e cada um é dividido por este valor. Posteriormente, a soma dos espectros normalizados pela norma euclidiana individual é calculada;
- (9) a área espectral individual é calculada para cada espectro bruto e os dados brutos são divididos por este valor. Posteriormente, a soma dos espectros normalizados pela área espectral individual é calculada

(10) o máximo espectral individual é identificado para cada espectro bruto e os dados brutos são divididos por este valor. Posteriormente, a soma dos espectros normalizados pelo máximo espectral individual é calculada.

(11) a intensidade do sinal da linha C I 193,09 nm é identificada para cada espectro bruto e, em seguida, os dados brutos são divididos por este valor. Posteriormente, a soma dos espectros normalizados pela linha C I 193,09 nm é calculada;

(12) a intensidade do sinal da linha C I 247,86 nm é identificada para cada espectro e, em seguida os dados brutos são divididos por esse valor. Posteriormente, a soma dos espectros normalizados pela linha C I 247,86 nm é calculada.

Figura 10 - Ilustração dos modos de normalização utilizados nos dados obtidos pelas técnicas WDXRF e LIBS.



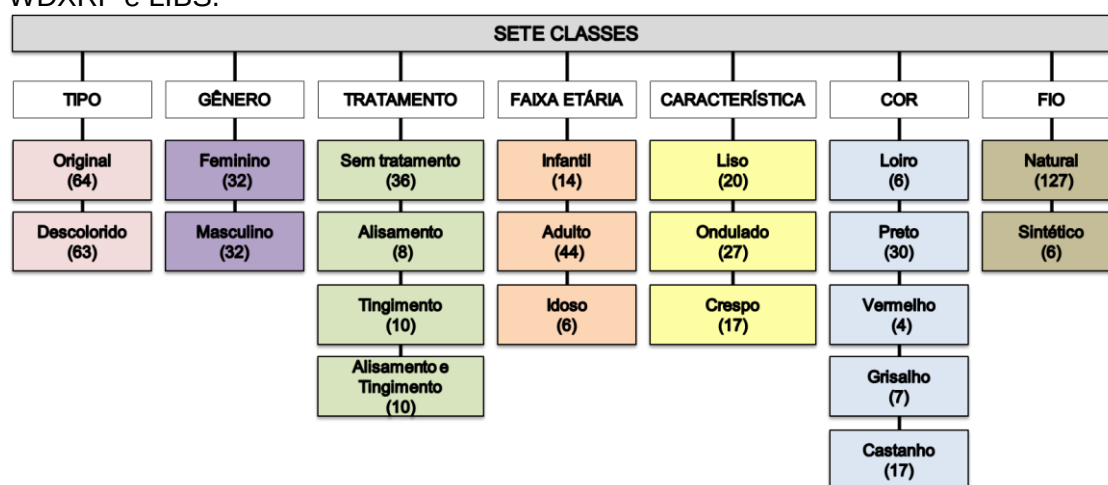
Fonte: elaborada pela autora.

Para os dados WDXRF foi utilizada uma adaptação dos modos de normalização, no caso não foi possível calcular aquelas relacionadas com as linhas atômicas (I) de C 193,09 e 247,86, fornecidas somente pela técnica LIBS.

As análises exploratórias foram realizadas com a técnica *Principal Component Analysis* (PCA) utilizando o programa computacional Pirouette 4.5 rev. 1 (Infometrix, Bothel, WA, EUA). O pré-processamento empregado para ambos os tipos de espectros foi a centragem na média.

Para a construção dos modelos de classificação foram utilizadas as ferramentas quimiométricas *k-Nearest Neighbor* (kNN), *Soft Independent Modeling of Class Analogy* (SIMCA) e *Partial Least Squares Discriminant Analysis* (PLS-DA). Para isto, o conjunto de amostras foi dividido em 7 classes com as seguintes denominações: tipo, gênero, tratamento, faixa etária, característica, cor e fio. Cada classe foi subdividida em níveis conforme mostra a Figura 11.

Figura 11 - Representação para as sete classes utilizadas na avaliação dos dados WDXRF e LIBS.



Fonte: elaborada pela autora.

O algoritmo *Kennard-Stone* [52] foi utilizado para selecionar as amostras que compuseram os conjuntos de treinamento e de validação.

O desempenho dos modelos de classificação foi avaliado com as seguintes figuras de mérito: exatidão, sensibilidade, especificidade e taxa de falso alarme [53]. Estes parâmetros são expressos em porcentagem e estão definidos nas Equações de (2) a (5) a seguir:

$$\text{Exatidão: } \frac{VP+VN}{VP+FN+VN+FP} \quad \text{Equação (2)}$$

$$\text{Sensibilidade: } \frac{VP}{VP+FN} \quad \text{Equação (3)}$$

$$\text{Especificidade: } \frac{VN}{VN+FP} \quad \text{Equação (4)}$$

$$\text{Taxa de falso alarme: } \frac{FP}{FP+VN} \quad \text{Equação (5)}$$

Onde:

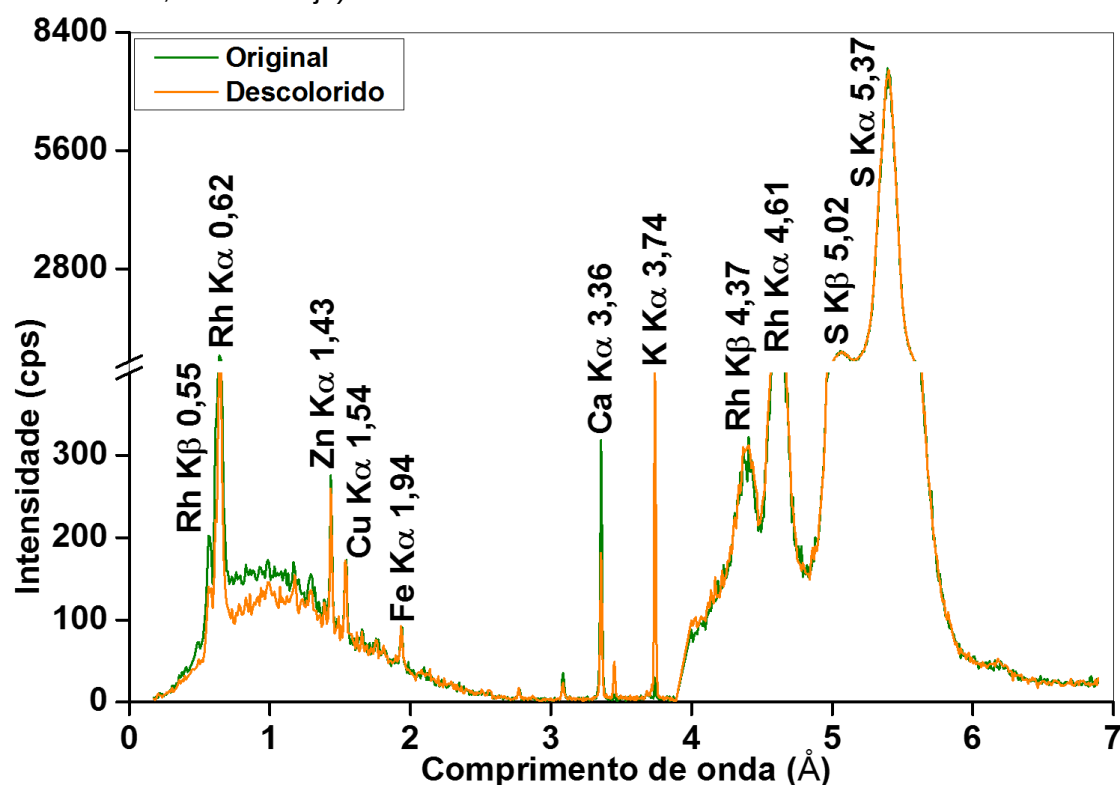
- Verdadeiro Positivo (VP): a amostra que pertence à uma classe e que foi classificada corretamente como pertencente à esta classe;
- Falso Negativo (FN): a amostra que pertence à uma classe e que foi classificada como pertencente à outra classe que não é a verdadeira, ou ainda, como se não pertencesse a nenhuma classe.
- Falso Positivo (FP): a amostra que não pertence à uma determinada classe é classificada como se pertencesse à esta classe;
- Verdadeiro Negativo (VN): a amostra que não pertence à uma classe é classificada como pertencente à outra classe que não é a verdadeira, ou ainda, como se não pertencesse a nenhuma classe.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Informações analíticas geradas com a WDXRF

A Figura 12 mostra os espectros registrados para amostras de um mesmo cabelo humano com cor castanho antes (cabelo original, linha verde) e após a modificação estética (cabelo descolorido, linha laranja). As linhas de emissão detectadas foram para os seguintes elementos químicos: Zn (1,43 Å), Cu (1,54 Å), Fe (1,94 Å), Ca (3,36 Å) e K (3,74 Å). Além disso, também foi observada a presença de uma linha de fluorescência $K\alpha$ de alta intensidade para o S (5,37 Å) para todas as amostras de cabelo humano. Duas linhas $K\alpha$ e $K\beta$ para o Rh são verificadas devido à varredura XRF ter sido efetuada de forma sequencial em dois cristais diferentes. Os espectros da Figura 12 estão unidos, entretanto foram gerados separadamente.

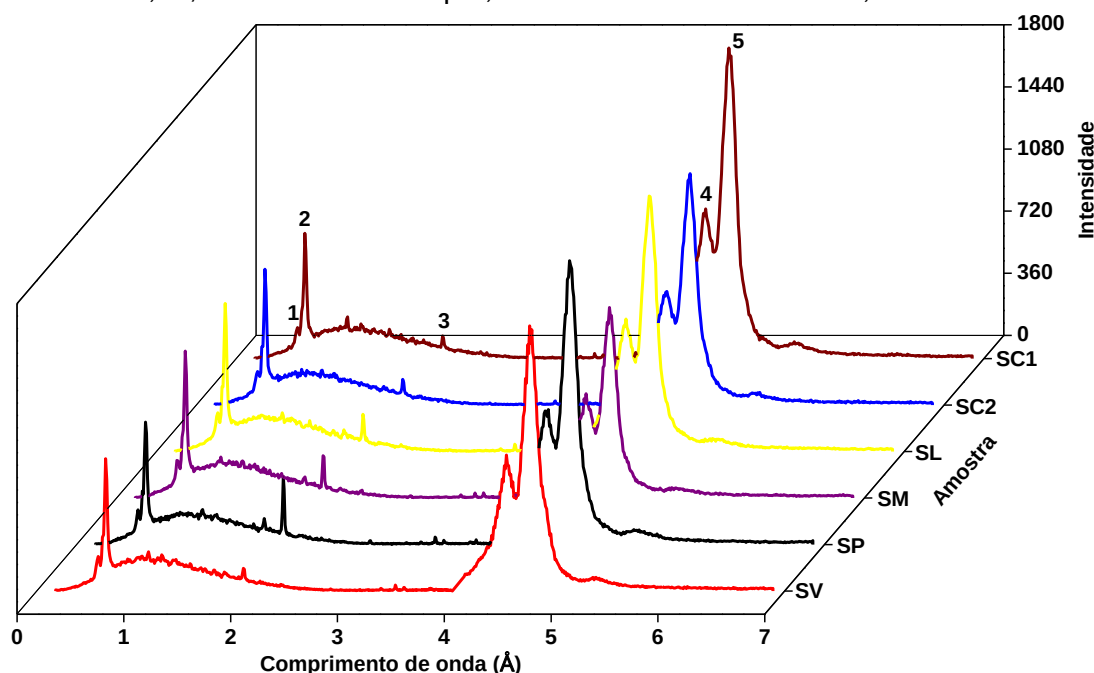
Figura 12 - Perfil de espectros WDXRF para uma amostra de cabelo humano com cor castanho antes (cabelo original, linha verde) e após a modificação estética (cabelo descolorido, linha laranja).



Fonte: adaptada de Santos, M. C; Speranca, M. A; Pereira, F. M. V. *X-Ray Spectrometry* (2018, 47, p. 254).

Na avaliação dos espectros para as amostras de cabelo sintético foi observado o mesmo perfil espectral independentemente da cor, conforme mostrado na Figura 13. No espectro destas amostras foi observado linhas K α (0,62 Å) e K β (0,55 Å) para o elemento Rh com o cristal LiF200 que abrange a região espectral de K a U (0,17 - 3,88 Å) designado pelos números 2 e 1, respectivamente (Figura 13). Com outro cristal AX03 que engloba entre O e Si (3,99 - 6,89 Å) foi observado para este mesmo elemento as linhas K α e K β nos comprimentos de onda de 4,61 Å (número 5) e de 4,37 Å (número 4), conforme pode ser observado na Figura 13. Além disso, também foi possível observar a presença do Fe, representando pelo número 3, que pode estar relacionado a composição das tinturas comerciais utilizadas no processo de tingimento dos cabelos.

Figura 13 - Perfil de espectros WDRXF para as amostras SC1 (linha marrom), SC2 (linha azul), SL (linha amarela), SM (linha violeta), SP (linha preta) e SV (linha vermelha). O número 1 corresponde ao Rh K β 0,55, número 2 ao Rh K α 0,62, número 3 ao Fe K α 1,94, número 4 ao Rh K β 4,37 e o número 5 ao Rh K α 4,61.



Fonte: elaborada pela autora.

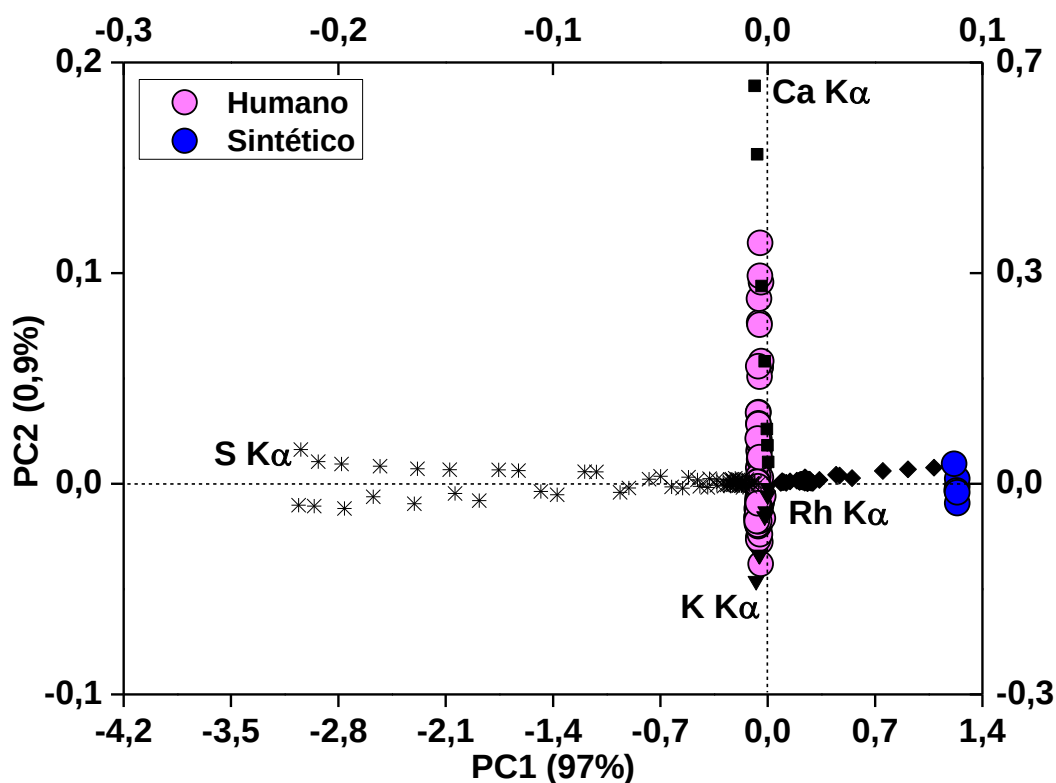
Em consequência da ampla informação proveniente dos espectros gerados pela WDXRF e LIBS, a utilização de técnicas quimiométricas tais como a PCA se torna de grande valia para uma melhor visualização e interpretação dos dados [54]. A PCA amplifica as informações; visto que com a redução da dimensionalidade dos dados originais pela construção de um novo conjunto de dados (vetores de base) sendo, simultaneamente, originado um conjunto de novas variáveis linearmente independentes, a visualização dos dados se torna de interpretação mais fácil. O vetor base corresponde a novos eixos que são representados pelas *Principal Components* (PCs). Os novos eixos gerados são ortogonais entre si e ordenados de acordo com a variância explicada em ordem decrescente [54, 55].

Após os cálculos das 8 normalizações foram calculadas PCA's para observar a melhor discriminação das amostras. Assim, com o auxílio da PCA notou-se que as amostras foram melhor discriminadas com a utilização da normalização pela norma euclidiana. O critério utilizado foi a visualização dos scores pela PC1 que é a componente de maior variância explicada. Logo, todos os dados

apresentados a seguir serão aqueles normalizados pela norma euclidiana. Após a normalização, a dimensão da matriz **X** foi 133 amostras e 805 variáveis.

Neste contexto, foi realizada também uma PCA para avaliação da classe fio composta pelos níveis natural e sintético. A representação gráfica deste conjunto foi definida por duas componentes principais, PC1 e PC2, apresentando uma variância explicada total de 98% (Figura 14). Além disso, com os *loadings* verificou-se a influência do espalhamento da radiação X visualizado na região espectral do Rh (losangos pretos) nas amostras de cabelo sintético. As linhas de emissão K α para Ca (quadrados pretos), K (triângulos invertidos pretos) e S (estrelas pretas) estão correlacionadas com aquelas de cabelo humano.

Figura 14 - Gráficos de *scores* e *loadings* para as amostras de cabelo humano e sintético usando a média do perfil completo dos espectros WDXRF normalizados com a norma euclidiana; 133 amostras e 805 variáveis.

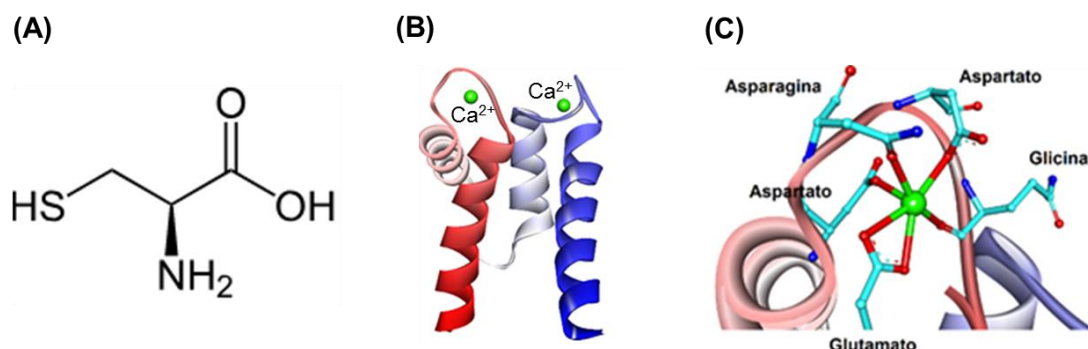


Fonte: adaptada de Santos, M. C; Sperança, M. A; Pereira, F. M. V. *X-Ray Spectrometry* (2018, 47, p. 255).

A α -queratina é o principal componente das fibras de cabelo humano que, apresenta o aminoácido cisteína como fonte básica para formação e desenvolvimento do cabelo, enquanto que o Ca desempenha um papel importante no crescimento [56]. Dessa maneira, a presença de S e Ca podem

ser associadas tanto às presenças de α -queratina, rica em cisteína [57] quanto ao cálcio ligado às proteínas (denominadas S100A3), que proporcionam integridade estrutural às fibras do cabelo [58], conforme pode ser observado na Figura 15.

Figura 15 - Representação da fórmula estrutural para o aminoácido cisteína (A) e a ligação da proteína S100A3 com íons Ca^{2+} (B), bem como o sítio de ligação do íon Ca^{2+} no interior da proteína S100A3 (C).

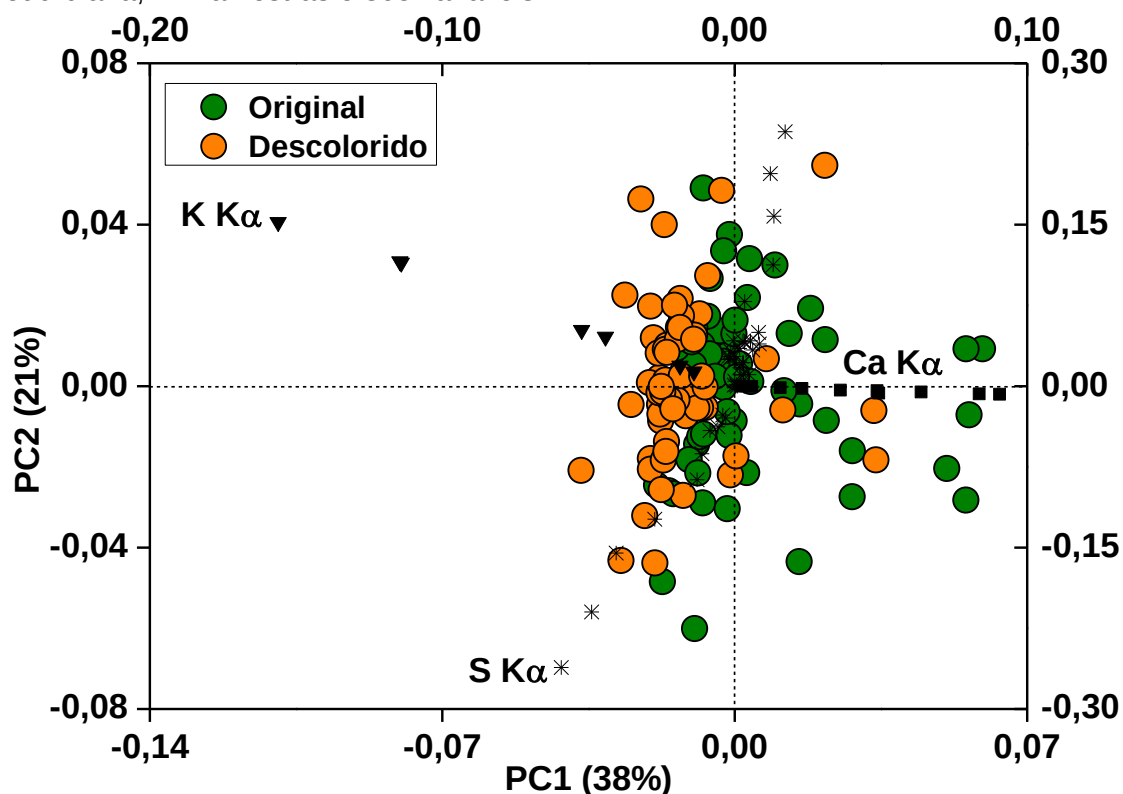


Fonte: elaborada pela autora.

Elementos leves, tais como C, H e O, não são passíveis de serem medidos neste tipo de instrumento, visto que estes elementos apresentam baixos coeficientes de absorção para a radiação X. Em outras palavras, como estes elementos não absorvem a radiação X, o que ocorre é o espalhamento desta que é visualizada nas linhas de emissão do Rh constituinte da fonte de excitação correspondente a $\text{K}\alpha$ (0,62 Å), $\text{K}\beta$ (0,55 Å), bem como, $\text{K}\alpha$ (4,61 Å) e $\text{K}\beta$ (4,37 Å), conforme foi detalhado na Figura 12 [59, 60].

Nessa parte do estudo, as amostras de cabelo sintético não foram incluídas no conjunto de dados para observar o comportamento entre as amostras de cabelo humano e as demais classes investigadas. Além disso, permitir uma melhor visualização dos elementos químicos importantes para essas amostras. A Figura 16 mostra uma PCA calculada a partir do conjunto de dados composto por 127 amostras (excluídas as amostras de cabelo sintético) e 805 variáveis, com este gráfico foi possível verificar que ocorreu uma tendência de separação entre as amostras conforme o tipo de cabelo, original e descolorido dentre as 7 classes sob investigação.

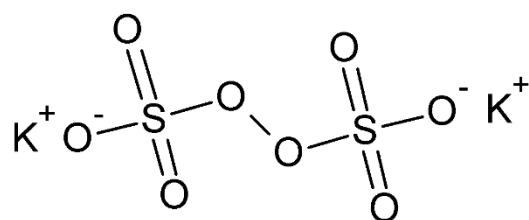
Figura 16 - Gráficos de *scores* e *loadings* para as amostras de cabelo (O) e (D) usando a média do perfil completo dos espectros WDXRF normalizados com a norma euclidiana; 127 amostras e 805 variáveis.



Fonte: adaptada de Santos, M. C; Sperança, M. A; Pereira, F. M. V. *X-Ray Spectrometry* (2018, 47, p. 255).

A região de espalhamento da fonte de raios X não influenciou a diferenciação das amostras, confirmando que esta região do espectro estava relacionada somente com a composição química dos fios sintéticos. Uma descoberta interessante foi a importância do K para as amostras de cabelo descolorido. Este fato foi correlacionado ao composto persulfato de potássio, um dos compostos químicos oxidantes do kit comercial utilizado no procedimento de descoloração realizado nas amostras. A Figura 17 apresenta a fórmula estrutural do composto persulfato de potássio.

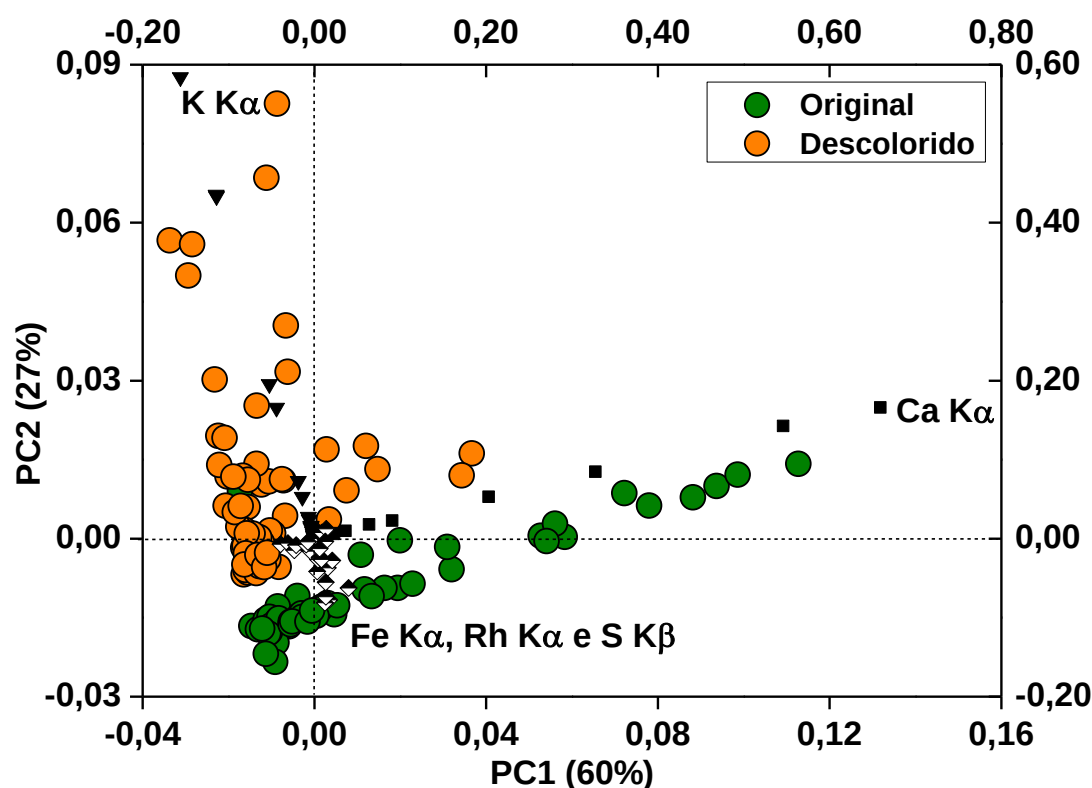
Figura 17 - Fórmula estrutural para o composto persulfato de potássio.



Fonte: elaborada pela autora.

Para verificar a possibilidade de uma separação mais evidente entre as amostras foi realizada uma seleção de variáveis utilizando aquelas com valores de *loadings* acima de zero. A dimensão da matriz **X** passou a ser de 127 linhas x 183 colunas. Os elementos químicos mais importantes para a discriminação deste conjunto de dados, como mostrado na Figura 18, foram K para as amostras de cabelo descolorido, as linhas K α de Ca (quadrados pretos), Fe e Rh, e também a linha K β do S influenciaram as amostras originais, estes três últimos elementos foram denotados como losangos.

Figura 18 - Gráficos de *scores* e *loadings* para as amostras de cabelo (O) e (D) usando a média do perfil completo dos espectros WDXRF normalizados com a norma euclidiana e as linhas K α selecionadas de Ca, Fe, K e Rh e K β de S; 127 amostras e 183 variáveis.



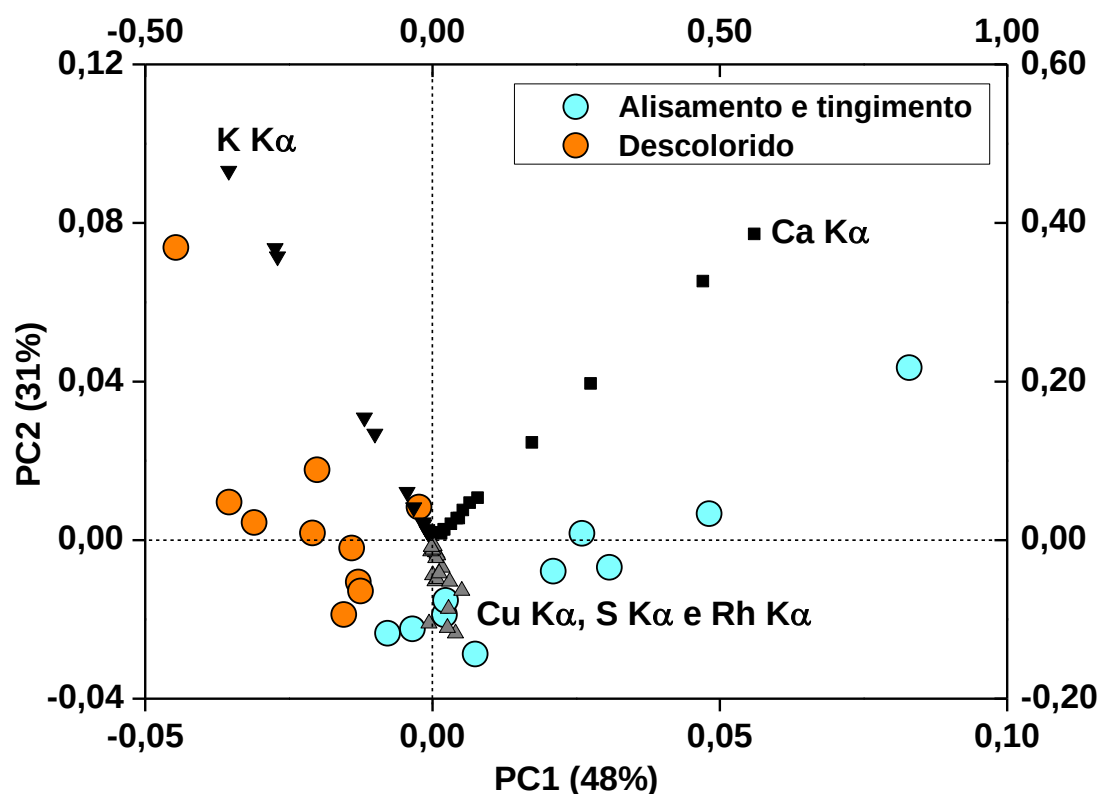
Fonte: adaptada de Santos, M. C; Sperança, M. A; Pereira, F. M. V. *X-Ray Spectrometry* (2018, 47, p. 255).

Neste conjunto de dados apenas uma amostra (M41) marcada como original não foi discriminada, e a explicação pode estar relacionada ao fato da mesma conter fios grisalhos que apresentam consistência densa e ausência de pigmentos que originam a cor na estrutura do fio [61]. Para este conjunto de amostras, um total de 42 amostras apresentaram alta correlação para o Fe, sendo 5 amostras de cabelo com tingimento, 4 com alisamento, 5 com alisamento e tingimento e, as 28 restantes foram aquelas designadas como virgem (sem tratamento cosmético). A cor do cabelo dessas amostras era preto (21), loiro (4) castanho (11) e grisalho (6). A presença do Fe na discriminação das amostras de cabelo original pode ser associada ao fato deste elemento existir principalmente em formas coordenadas em diferentes proteínas, como hemoglobina ou mioglobina, que estão presentes no sangue [62]. No estudo desenvolvido por Wei *et al.*, confirmaram que procedimentos cosméticos, tais

como tingimento, podem elevar os níveis de concentração dos seguintes metais, Fe, Cu, Mg, Ni e Cd na cutícula do cabelo [63].

Tendo em vista que o cabelo humano possui uma estrutura complexa e procedimentos cosméticos podem promover alterações na conformação e nos pigmentos naturais [64, 65], realizou-se uma PCA com o conjunto de dados composto por amostras com dois procedimentos cosméticos (alisamento e tingimento) no mesmo fio, representado pelos círculos na cor ciano, e as amostras de cabelo descolorido representado pelos círculos laranjas, Figura 19. A variância total observada na PCA para as PCs 1 e 2 foi de 79%, usando 805 variáveis independentes. Por meio do gráfico de *loadings*, as variáveis importantes foram aquelas relacionadas com o espalhamento da fonte de Rh K α (0,62 Å), bem como, aos elementos Cu e S. A detecção de Cu pode ser associada a presença desse elemento na composição de diferentes tinturas e tratamentos cosméticos [64].

Figura 19 - Gráficos de scores e *loadings* para as amostras de cabelo (A) e (T) e para as mesmas amostras de cabelo (D) usando a média do perfil completo dos espectros WDXRF normalizados com a norma euclidiana; 20 amostras e 805 variáveis.



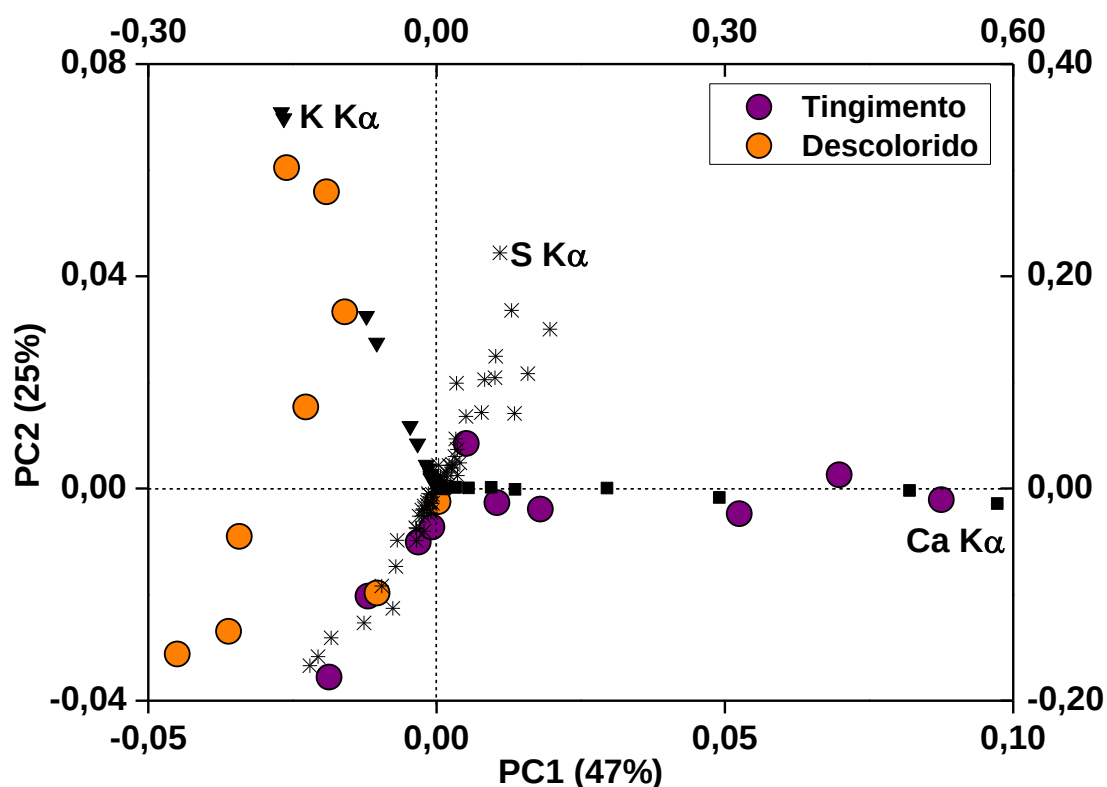
Fonte: adaptada de Santos, M. C; Speranca, M. A; Pereira, F. M. V. *X-Ray Spectrometry* (2018, 47, p. 256).

O procedimento cosmético que envolve a mudança na cor do cabelo com tinturas merece destaque, uma vez que é uma importante área da indústria mundial de cosméticos. De modo geral, as tinturas de cabelo são classificadas em naturais e sintéticas. As naturais são, em geral, a base de hena sendo extraídas das folhas da planta *Lawsonia inermis* [65, 66]. As tinturas sintéticas podem ser classificadas de acordo com o tempo de fixação no cabelo em temporária, semipermanente e permanente [65 - 67].

Deste modo, também foi avaliado o conjunto de dados constituído por 19 amostras com amostras de cabelo com tingimento (círculos roxos) e as mesmas amostras após o procedimento de descoloração (círculos laranjas), conforme pode ser observado na Figura 20. O resultado da PCA mostrou uma variância explicada de 72% utilizando toda a faixa espectral (805 variáveis). Os dados de *loadings* evidenciaram que o Ca contribuiu para a discriminação dos cabelos tingidos com valores positivos para PC1. A linha de emissão do S foi importante

para ambas as amostras e o K também contribuiu para a discriminação das amostras de cabelo descolorido.

Figura 20 - Gráficos de *scores* e *loadings* para as amostras de cabelo (T) e (D) usando a média do perfil completo dos espectros WDXRF normalizados com a norma euclidiana; 19 amostras e 805 variáveis.



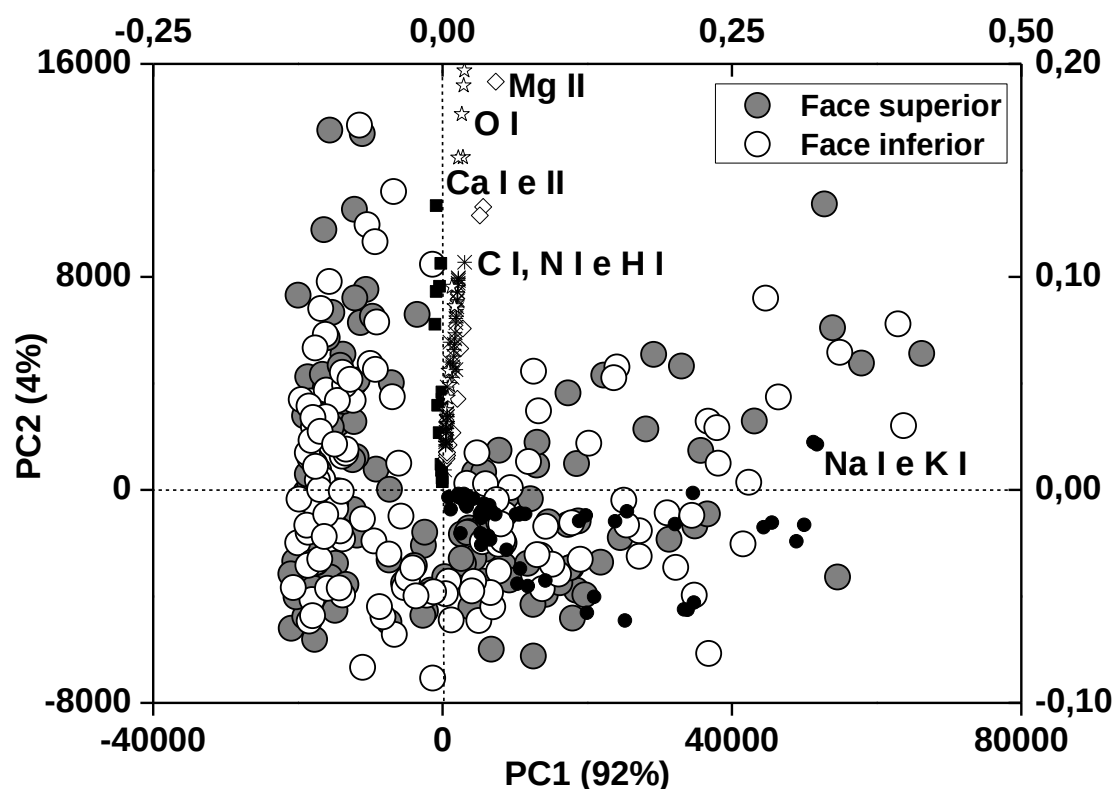
Fonte: adaptada de Santos, M. C; Speranca, M. A; Pereira, F. M. V. *X-Ray Spectrometry* (2018, 47, p. 256).

Os dados da WDXRF juntamente com a PCA foram capazes de verificar tendências entre diferentes procedimentos cosméticos para estas amostras de cabelo.

5.2 Informações analíticas geradas com a LIBS

O primeiro ponto importante é avaliar a homogeneidade das amostras a partir dos espectros adquiridos após o mapeamento das pastilhas de cabelo. Uma vez que estes espectros foram medidos em ambas as faces das pastilhas (superior e inferior). Para esta avaliação foi realizado uma análise exploratória com a PCA, como pode ser verificado na Figura 21.

Figura 21 - Gráficos de *scores* e *loadings* para cada face das amostras de cabelo (O) e (D) usando a média do perfil espectral LIBS; 266 amostras e 12.288 variáveis.



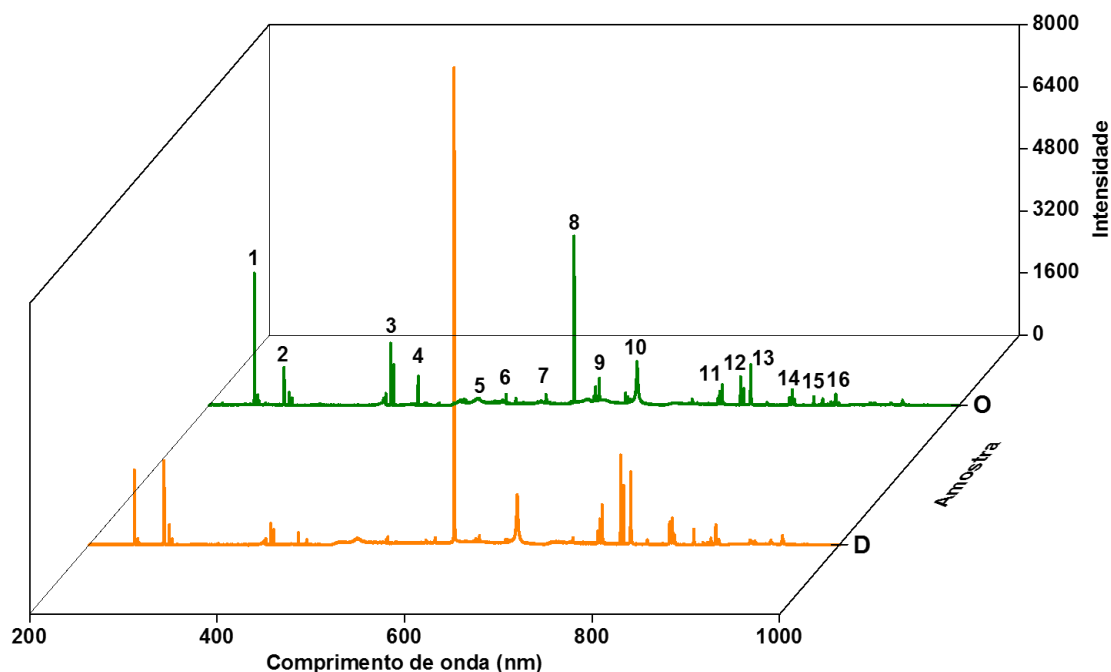
Fonte: elaborada pela autora.

A partir desta análise foi possível inferir com o auxílio do gráfico de *scores* que não há distinção entre os espectros da face superior (círculos cinzas) e da face inferior (círculos brancos). Dessa maneira, foi confirmada a homogeneidade das amostras e, assim, foram utilizados todos os espectros registrados durante o mapeamento das duas faces de cada pastilha de cabelo para a avaliação das normalizações e das 7 classes quanto a discriminação mais evidente entre as amostras com maior variância explicada. Desta forma, a melhor normalização para os espectros LIBS foi a média e a classe mais promissora foi também aquela representada pelo tipo de cabelo, original e descolorido, conforme verificada com a WDXRF.

Na Figura 22 podem ser verificadas as linhas de emissão LIBS para uma amostra de cabelo humano na cor preta (cabelo original, linha verde) e a mesma amostra após o procedimento de modificação estética (cabelo descolorido, linha laranja). A identificação numérica apresentada corresponde: número 1 ao elemento químico C I 247,85, número 2 ao Mg II 279,55 e 280,27, número 3 ao

Ca II 393,36 e 396,84, número 4 ao Ca I 422,67, número 5 ao H I 486,13, número 6 ao Ca I 526,90, número 7 ao Ca I 559,20, número 8 ao Na I 588,99 e 589,59, número 9 ao Ca I 616,21, número 10 ao H I 656,30, número 11 ao N I 742,36, 744,23 e 746,83, número 12 ao K I 766,49 e 769,89, número 13 ao O I 777,19 e 777,42, número 14 ao N I 821,63, número 15 ao O I 844,63 e o número 16 ao N I 868,02. Os símbolos (I) e (II) representam linhas atômicas e iônicas, respectivamente.

Figura 22 - Perfil de espectros LIBS para uma amostra de cabelo (O) preto e a mesma amostra de cabelo (D). Para as linhas atômicas, número 1 corresponde ao elemento químico C; 4, 6, 7 e 9 ao Ca; 5 e 10 ao H; 8 ao Na; 11, 14 e 16 ao N; 12 ao K, 13 e 15 ao O. Para as linhas iônicas, o número 2 corresponde ao Mg e o 3 ao Ca.



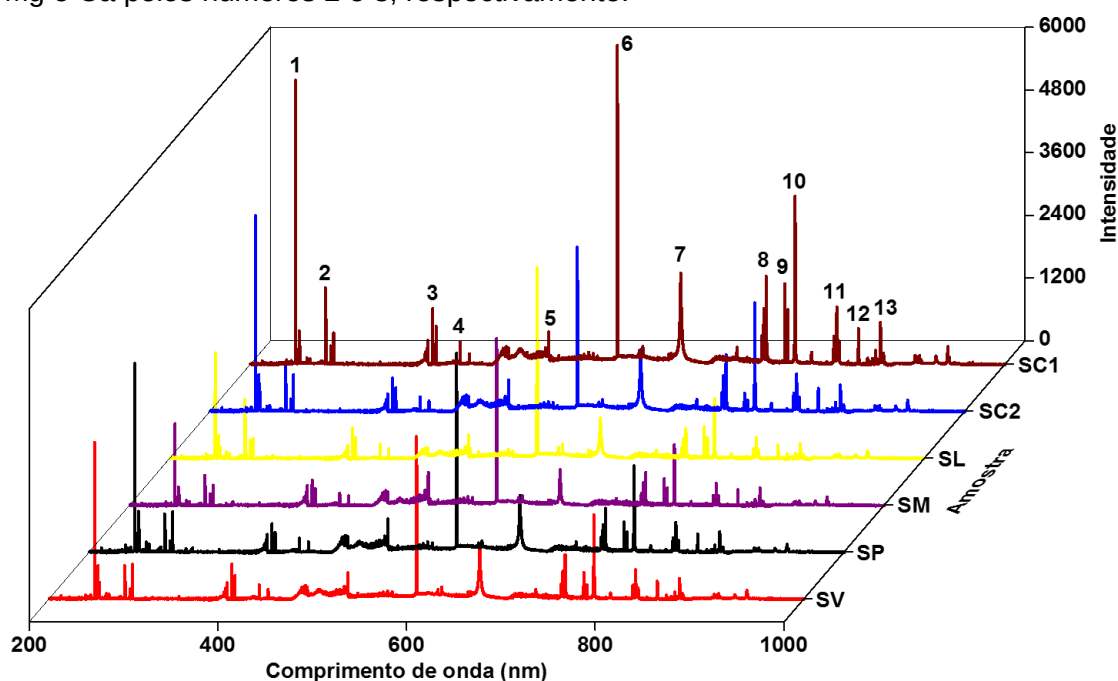
Fonte: elaborada pela autora.

A presença de C, N, H e O pode estar associada às proteínas presentes no cabelo que são formadas principalmente por aminoácidos, como arginina, cisteína, lisina. [68, 69]. Magnésio e cálcio, em geral estão ligados às moléculas de proteínas presentes no cabelo, auxiliando no fortalecimento e crescimento das fibras capilares [58].

A Figura 23 apresenta os espectros LIBS para as amostras de cabelo sintético nas cores castanho 1 (SC1, linha marrom), castanho 2 (SC2, linha azul), loiro (SL, linha amarela), preto com mechas loiras (SM, linha violeta), preto (SP, linha preta) e vermelho (SV, linha vermelha). A numeração de 1 a 13 equivale as

linhas atômicas e iônicas dos elementos, sendo representadas pelos símbolos (I) e (II), respectivamente. Assim, o número 1 corresponde ao C I 247,85, número 2 ao Mg II 279,55 e 280,27, número 3 ao Ca II 393,36 e 396,84, número 4 ao Ca I 422,67, número 5 ao Ca I 526,90, número 6 ao Na I 588,99 e 589,59, número 7 ao H I 656,30, número 8 ao N I 742,36, 744,23 e 746,83, número 9 ao K I 766,49 e 769,89, número 10 ao O I 777,19 e 777,42, número 11 ao N I 821,63, número 12 ao O I 844,63 e o número 13 ao N I 868,02.

Figura 23 - Perfil de espectros LIBS para as amostras SC1 (linha marrom), SC2 (linha azul), SL (linha amarela), SM (linha violeta), SP (linha preta) e SV (linha vermelha). O número 1 corresponde ao elemento químico C; 4 e 5 ao Ca; 6 ao Na; 7 ao H; 8, 11 e 13 ao N; 9 ao K; 10 e 12 ao O, referente às linhas atômicas. Para as linhas iônicas, Mg e Ca pelos números 2 e 3, respectivamente.



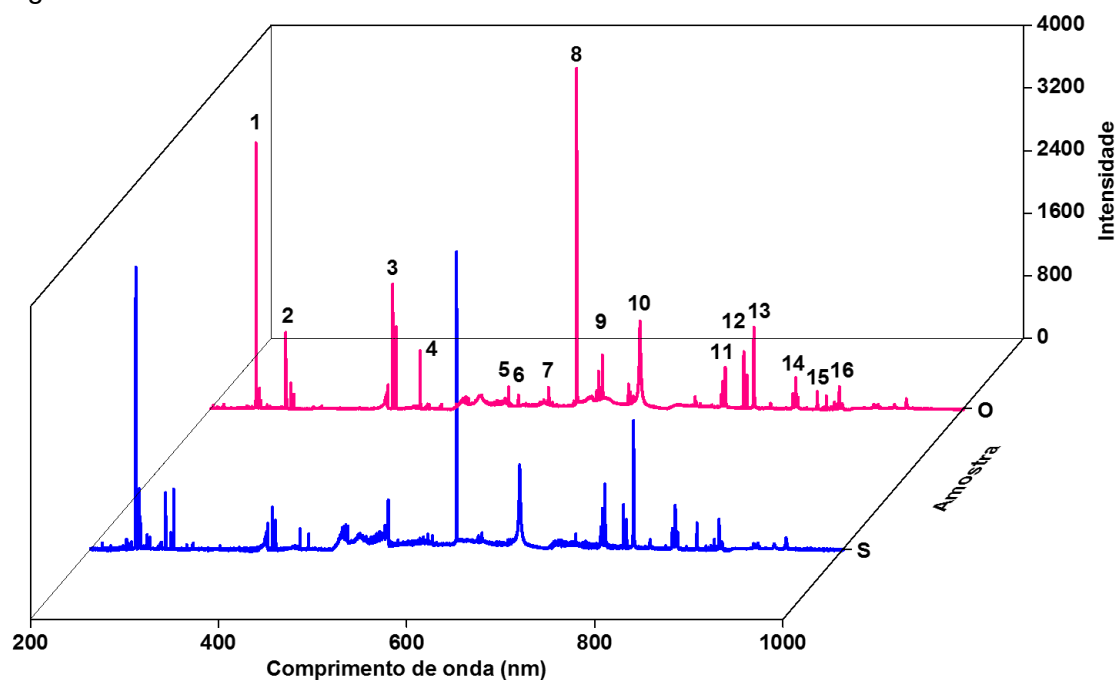
Fonte: elaborada pela autora.

A partir da avaliação dos espectros LIBS para as amostras de cabelo sintético, Figura 23, pode ser verificado um perfil espectral similar entre estas amostras, independentemente da cor, com diferenças entre as intensidades de alguns elementos, como exemplos as linhas atômicas (I) para C, Na e O, representados pelos números 1, 6 e 10, respectivamente.

Na Figura 24 pode ser observada as linhas de emissão para uma amostra de cabelo humano na cor preta (cabelo original, linha rosa) e uma amostra de cabelo sintético também na cor preta (linha azul), em que foi possível perceber

um perfil semelhante entre essas amostras. A identificação numérica apresentada corresponde: número 1 ao C I 247,85, número 2 ao Mg II 279,55 e 280,27, número 3 ao Ca II 393,36 e 396,84, número 4 ao Ca I 422,67, número 5 ao H I 486,13, número 6 ao Ca I 526,90, número 7 ao Ca I 559,20, número 8 ao Na I 588,99 e 589,59, número 9 ao Ca I 616,21, número 10 ao H I 656,30, número 11 ao N I 742,36, 744,23 e 746,83, número 12 ao K I 766,49 e 769,89, número 13 ao O I 777,19 e 777,42, número 14 ao N I 821,63, número 15 ao O I 844,63 e o número 16 ao N I 868,02. Os símbolos (I) e (II) representam linhas atômicas e iônicas, respectivamente.

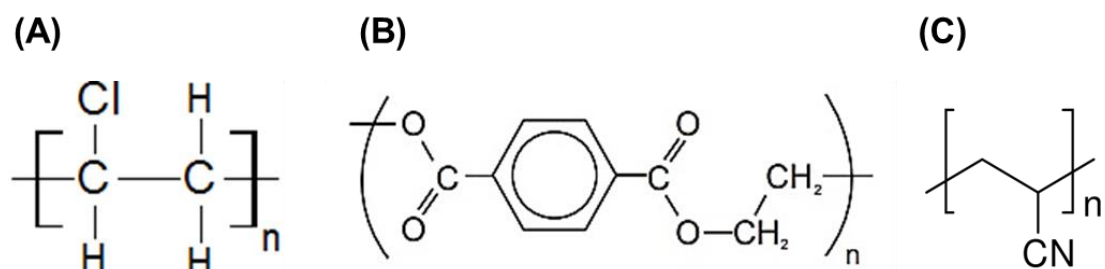
Figura 24 - Perfil de espectros LIBS para uma amostra de cabelo (O) preto e uma amostra de cabelo (S), também na mesma cor. Para as linhas atômicas, o número 1 corresponde ao elemento químico C; 4, 6, 7 e 9 ao Ca; 5 e 10 ao H; 8 ao Na; 11, 14 e 16 ao N; 12 ao K; 13 e 15 ao O. Para as linhas iônicas, o número 2 corresponde ao Mg e o 3 ao Ca.



Fonte: elaborada pela autora.

A presença de C, H, N e O, na amostra de cabelo sintético em similaridade com a amostra de cabelo original pode estar pertinente com os polímeros utilizados para a produção destas fibras sintéticas, tais como cloreto de polivinila (PVC) [70], tereftalato de polietileno (PET) [71, 72] e poliácrlonitrila (PAN) [73, 74]. A Figura 25 apresenta as fórmulas estruturais do PVC, PET e PAN.

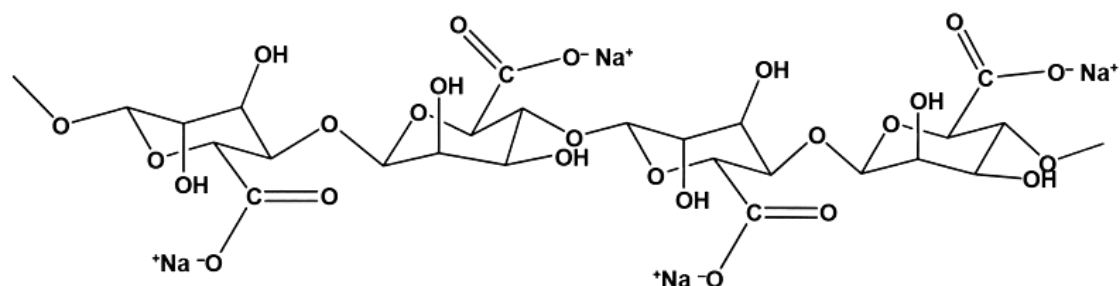
Figura 25 - Fórmulas estruturais dos polímeros cloreto de polivinila (A), tereftalato de polietileno (B) e poliácridonitrila (C).



Fonte: elaborada pela autora.

Além disso, outro material biocompatível que vem sendo incorporado ao processo de fabricação de fibras de cabelo sintético é o polímero alginato. Esse polímero pode ser encontrado na forma de sais de sódio e potássio, bem como, magnésio e cálcio [75]. Fato que corrobora com a detecção das linhas de emissão desses elementos nas amostras de cabelo sintético. Na Figura 26 está representada a fórmula estrutural do alginato de sódio.

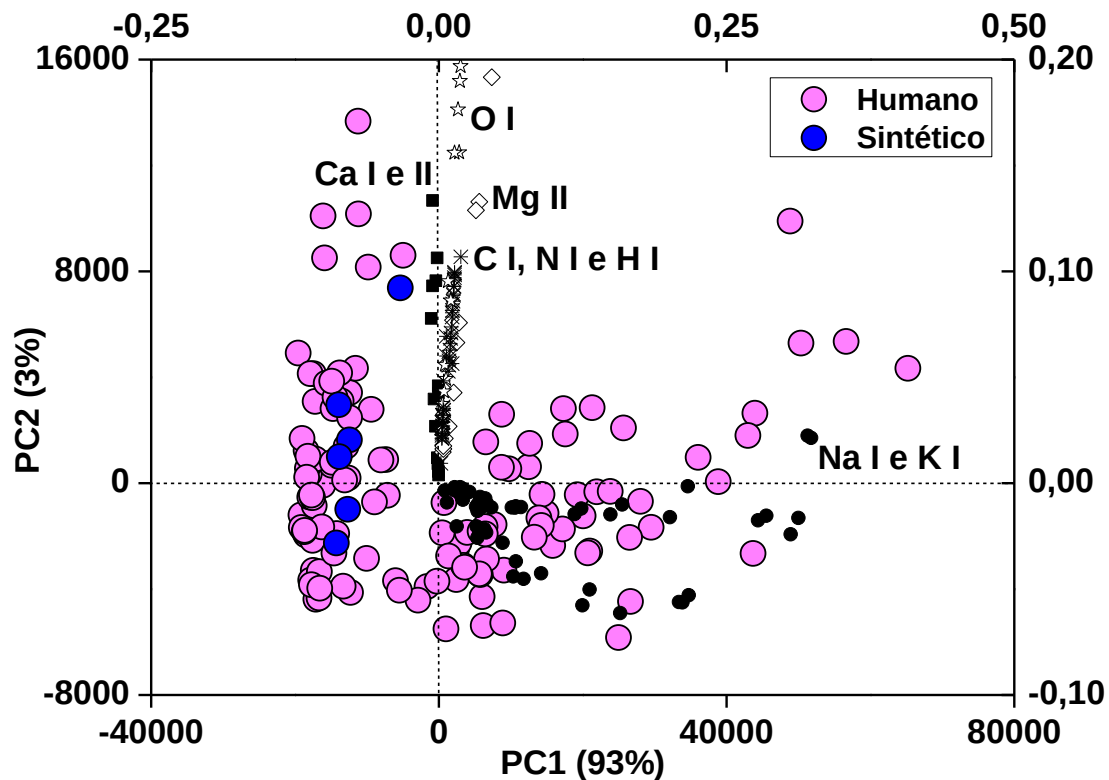
Figura 26 - Fórmula estrutural do polímero alginato de sódio.



Fonte: elaborada pela autora.

Nessa parte do estudo foi realizada uma análise exploratória por PCA para avaliação da matriz de dados, após a normalização, composta por 133 amostras e 12.288 linhas de emissão (variáveis). Os resultados evidenciaram uma variância explicada total de 96% para as PCs 1 e 2. No entanto, foi possível verificar com o gráfico de scores que não houve uma discriminação entre as amostras de cabelo humano (círculos rosas) e sintético (círculos azuis), conforme mostrado na Figura 27.

Figura 27 - Gráficos de *scores* e *loadings* para as amostras de cabelo humano e sintético usando a média do perfil espectral LIBS; 133 amostras e 12.288 variáveis.



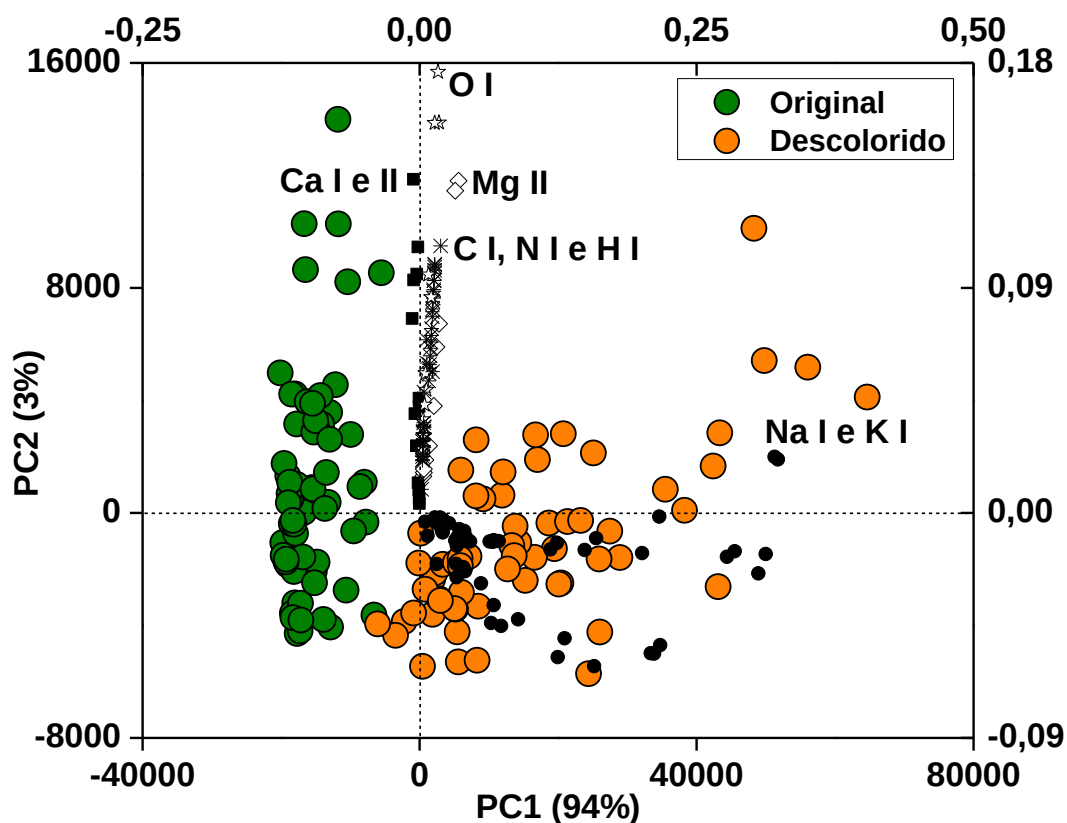
Fonte: elaborada pela autora.

Na próxima avaliação dos dados, as amostras de cabelo sintético foram retiradas do conjunto para verificar o comportamento apenas entre as amostras de cabelo humano. Assim, para um melhor desempenho quanto à rapidez foi realizada uma seleção das variáveis mais importantes por meio de uma PCA. O critério para a exclusão das variáveis com pouca ou nenhuma influência foi os valores de *loadings* igual ou aproximadamente igual a zero. Com esta seleção, a nova matriz de dados passou a ter 422 variáveis.

Os resultados da PCA para a nova matriz de dados composta por 127 amostras e 422 variáveis mostraram uma separação entre as amostras de cabelo original e descolorido, representados pelos círculos verdes e laranjas, respectivamente. Os resultados desta PCA apresentaram uma variância explicada de 97% (Figura 28). O gráfico de *loadings* mostrou que o Ca foi discriminante para as amostras de cabelo original. Esta discriminação corrobora com os resultados também obtidos pela WDXRF. Assim, esta correlação pode

estar pertinente ao fato deste elemento auxiliar conjuntamente com as proteínas no processo de fortalecimento do cabelo [45].

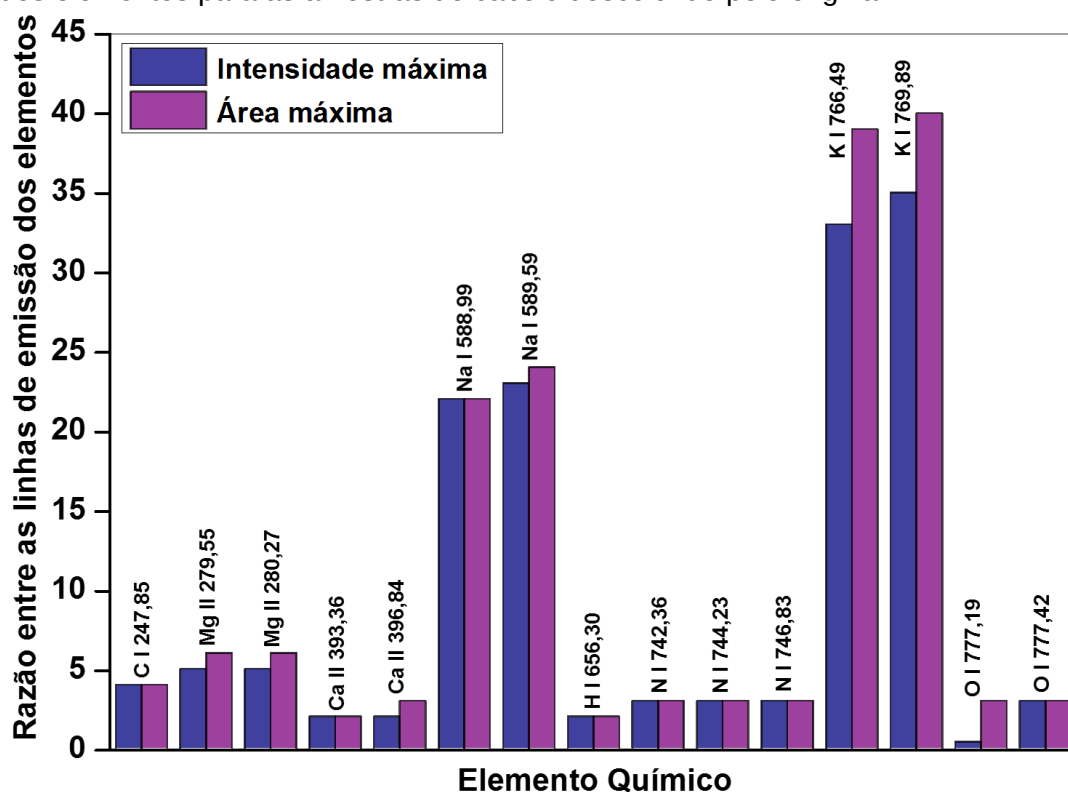
Figura 28 - Gráficos de *scores* e *loadings* para as amostras de cabelo (O) e (D) usando a seleção das variáveis importantes; 127 amostras e 422 variáveis.



Fonte: elaborada pela autora.

Uma importante avaliação observada a partir dos espectros LIBS foi um aumento perceptível nas intensidades das linhas de emissão para alguns elementos da amostra de cabelo descolorido em relação ao original no caso das amostras de cabelo humano. As razões das intensidades máximas e das áreas das linhas de emissão para cada elemento detectado foram calculadas entre as amostras de cabelo descolorido e original, conforme mostra a Figura 29.

Figura 29 - Representação gráfica para o valor da razão entre as linhas de emissão dos elementos para as amostras de cabelo descolorido pelo original.



Fonte: elaborada pela autora.

Os valores das razões demonstram que ocorreu um aumento entre 22 e 24 vezes para o Na nos comprimentos de onda de 588,99 e 589,59 nm e entre 33 e 40 para o K nos comprimentos de onda de 766,49 e 769,89 nm nas amostras de cabelo do tipo descolorido. Logo, estes dois elementos foram associados aos resíduos provenientes do produto utilizado no procedimento de descoloração. O pó descolorante apresenta como composição no rótulo do produto: persulfato de potássio, sulfato de sódio, silicato de sódio e etilenodiaminotetracético dissódico.

A LIBS combinada com a PCA foi passível de detectar variações na composição química em amostras de cabelo humano que passaram por modificação estética estabelecendo uma impressão digital para este tipo de amostra.

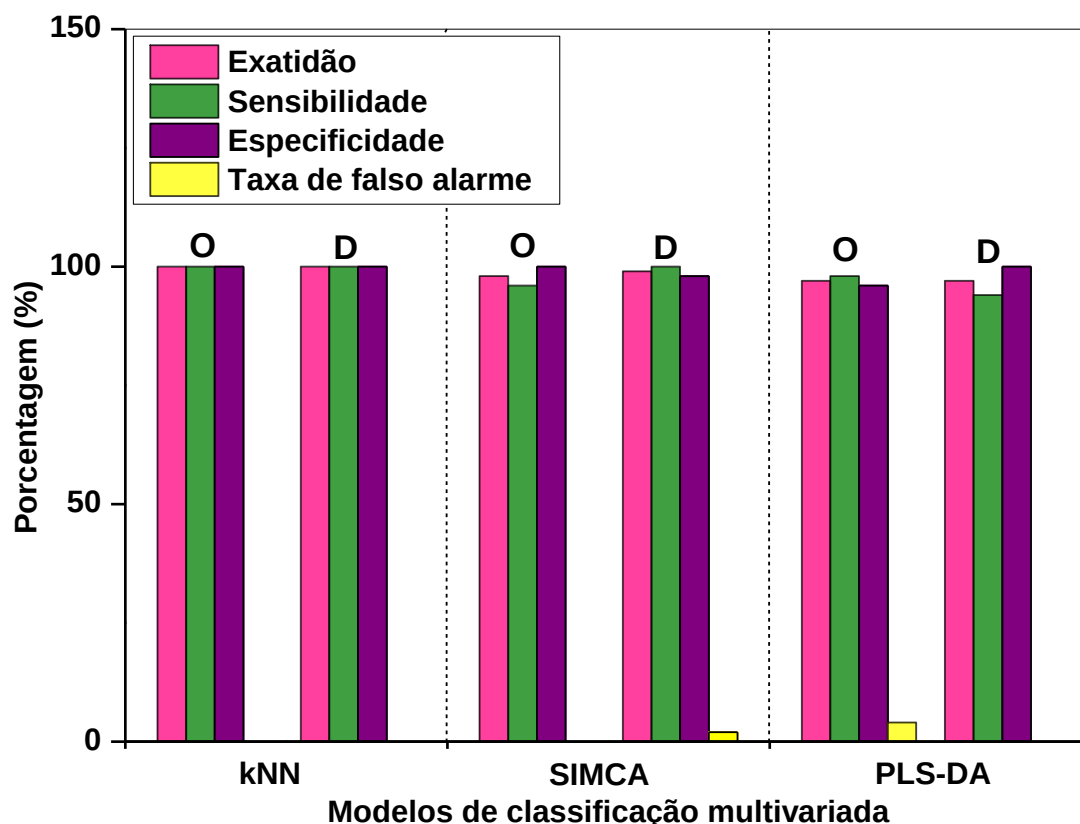
5.3 Modelos de classificação multivariada

De acordo com a tendência de agrupamento observada tanto para a WDXRF quanto para a LIBS através da PCA após a seleção das variáveis foram propostos modelos de classificação com as ferramentas quimiométricas kNN, SIMCA e PLS-DA. Para estes modelos foi utilizado a classe tipo de cabelo, considerando dois níveis denominados de cabelo original e descolorido.

Na criação dos modelos de classificação WDXRF e LIBS foram utilizados um total de 127 amostras, sendo 101 incluídas no conjunto de treinamento (51 de cabelo original e 50 de cabelo descolorido) e as 26 restantes utilizadas no conjunto de validação, composto por 13 amostras em cada nível.

Para o WDXRF, os modelos de classificação apresentaram resultados considerados promissores com exatidão entre 97 - 100% para ambos os níveis (Figura 30). Contudo, o modelo de classificação kNN se apresentou como o mais apropriado, uma vez que, 100% das amostras foram classificadas corretamente, ou seja, não sendo detectados taxas de falsos alarmes. Adicionalmente, o kNN exibiu alta sensibilidade e especificidade, o que sugere significativa capacidade de diferenciar as amostras de cabelo original e descolorido. Já, SIMCA e PLS-DA mostraram valores comparáveis de variância explicada entre 96 - 98%. Entretanto, para o modelo SIMCA foi detectado menores taxas percentuais de falsos alarmes em relação ao PLS-DA. Este fato pode ser relacionado ao modelo PLS-DA classificar de forma errada duas amostras (F10D e F31AD, Figura 8) como pertencente ao nível original. Além disso, um fato importante que deve ser ressaltado é que a amostra M41 foi classificada como não pertencente a nenhuma classe para ambos os modelos. Este resultado havia sido verificado na PCA da Figura 30. Sendo assim, conforme atestado pelas figuras de mérito para os dados WDXRF, pode ser inferido que os três modelos foram muito promissores.

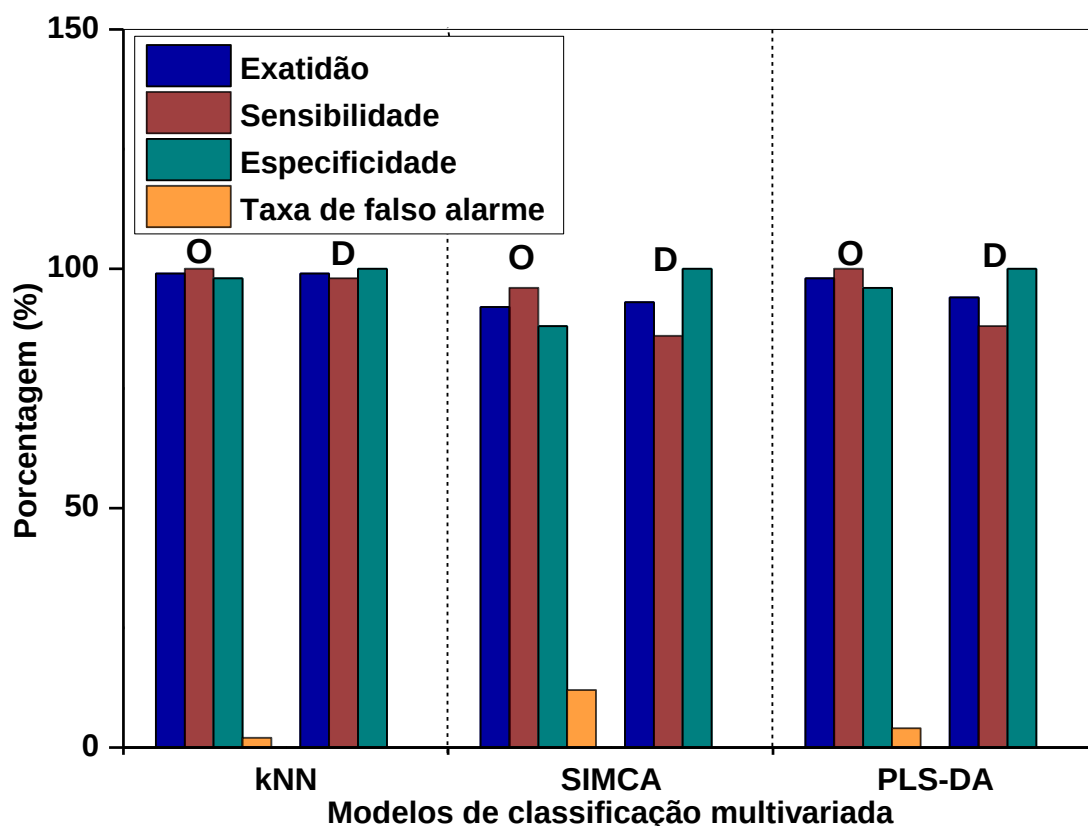
Figura 30 - Valores percentuais das figuras de mérito para os modelos de classificação multivariada utilizando os dados WDXRF da matriz composta por 127 amostras e 183 variáveis para a classe tipo de amostra, composta por dois níveis: (O) e (D).



Fonte: elaborada pela autora.

Ao que concerne à LIBS, os modelos de classificação apresentaram resultados similares de exatidão entre 92 - 99% para o nível cabelo original e 93 - 99% para cabelo descolorido, conforme pode ser observado na Figura 31. Com o modelo kNN, 99% das amostras foram classificadas corretamente para ambos os níveis. Além disso, houve um baixo percentual da taxa de falso alarme. Com relação aos modelos SIMCA e PLS-DA, diferente ao que foi observado para a WDXRF, o PLS-DA apresentou menor percentual de taxa de falso alarme, maior sensibilidade e especificidade comparado ao SIMCA. Isto ocorreu devido ao modelo SIMCA classificar erroneamente 6 amostras de cabelo descolorido (F32AD, F40H1D, M4D, M24D, M24AD e M41D, Figura 8) como pertencente ao nível do cabelo original.

Figura 31 - Valores percentuais das figuras de mérito para os modelos de classificação multivariada utilizando os dados LIBS da matriz composta por 127 amostras x 422 variáveis para a classe tipo de amostra, considerando dois níveis: (O) e (D).



Fonte: elaborada pela autora.

6 CONCLUSÕES

Os dados provenientes das técnicas espectroanalíticas WDXRF e LIBS combinados com ferramentas quimiométricas são promissores para a identificação da composição química das amostras de cabelo, sem a necessidade de empregar procedimentos destrutivos de preparo de amostra. Os resultados mostraram a complementaridade entre as técnicas, permitindo estabelecer uma impressão digital para os diferentes tipos de cabelos. Para ambas as técnicas, os modelos de classificação apresentaram resultados promissores no que concerne a classificação de amostras de cabelo do tipo original e descolorido.

7 REFERÊNCIAS

- [1] Pragst, F., Balikova, M. A. ***Clinica Chimica Acta***, 370, 17-49, 2006.
- [2] Kucera, J., Kameník, J., Havránek, V. ***Forensic Chemistry***, 7, 65-74, 2018.
- [3] Yu, Y., Yang, W., Wang, B., Meyers, M. A. ***Materials Science and Engineering C***, 73, 152-163, 2017.
- [4] Barroso, M., Gallardo, E., Vieira, D. N., López-Rivadulla, M., Queiroz, J. A. ***Bioanalysis***, 3 (1), 67-79, 2011.
- [5] Pozebon, D., Dressler, V. L. Curtius, A. J. ***Química Nova***, 22 (6), 838-846, 1999.
- [6] Cruz, C. F., Martins, M., Egipto, J., Osório, H., Ribeiro, A., Cavaco-Paulo, A. ***RSC Advances***, 7, 51581-51592, 2017.
- [7] Cuypers, E., Flinders, B., Boone, C. M., Bosman, I. J., Lusthof, K. J., Asten, A. C., Tytgat, J., Heeren, R. M. A. ***Analytical Chemistry***, 88(6), 3091-3097, 2016.
- [8] Font, L., Peijl, G., Wetten, I., Vroon, P. Wagt, B., Davies, G. ***Journal Analytical Atomic Spectrometry***, 27, 719-732, 2012.
- [9] Król, S., Zabiegała, B., Namiesnik, J. ***Trends in Analytical Chemistry***, 47, 84-98, 2013.
- [10] Kempson, I. M., Lombi, E. ***Chemical Society Reviews***, 40, 3915-3940, 2011.
- [11] Emara, E. M., Imama, H., Hassan, M. A., Elnaby, S. ***Talanta***, 117, 176-183, 2013.
- [12] Zheng, J., Yu, L., Chen, S., Hu, G., Chen, K., Yan, X., Luo, X., Zhang, S., Yu, Y., Yang, Z., Mai, B. X. ***Environmental Science & Technology***, 50(3), 1579-1586, 2016.
- [13] Babos, D. V., Costa, V. C., Sperança, M. A., Pereira-Filho, E. R. ***Microchemical Journal***, 137, 272-276, 2018.
- [14] Willis, J. P., Duncan, A. R. ***Understanding XRF Spectrometry: Basic concepts and instrumentation***, vol. 1, PANalytical, 2008.
- [15] Pasquini C., Cortez J., Silva L. M. C., Gonzaga F. B. ***Journal of the Brazilian Chemical Society***, 18(3), 463-512, 2007.

- [16] Andrade, D. F., Guedes, W. N., Pereira, F. M. V. **Microchemical Journal**, 137, 443-448, 2018.
- [17] Neto, B. B., Scarminio, I. S., Bruns, R. E. **Química Nova**, 29(6), 1401-1406, 2006.
- [18] Kumar, N., Bansal, A., Sarma, G. S., Ravindra K. Rawal, R. K. **Talanta**, 123, 186-199, 2014.
- [19] Cienfuegos, F., Vaitsman, D. **Análise Instrumental**, Ed. Interciência: Rio de Janeiro, 2000.
- [20] Jenkins, R. **X-Ray Fluorescence Spectrometry**, 2^a ed., Ed. John Wiley & Sons: Nova York, 1999.
- [21] Rodrigues, J. A. **Raios X: Difração e espectroscopia**, Ed. UFSCar, São Carlos, 2016.
- [22] Uo, M., Wada, T., Sugiyama, T. **Japanese Dental Science Review**, 51, 2-9, 2015.
- [23] Pashkova, G. V., Smagunova, A. N., Finkelshtein, A. L. **Trends in Analytical Chemistry**, 106, 183-189, 2018.
- [24] Singh, R., Kainth, H. S., Prasher, P., Singh, T. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms**, 419, 44-48, 2018.
- [25] Maziar, A., Shahbazi-Gahrouei, D., Tavakoli, M. B., Changizi, V. **Iranian Journal of Cancer Prevention**, 8(6), e3983, 2015.
- [26] Siritapetawee, J., Pattanasiriwisawa, W., Sirithethawee, U. **Journal of Synchrotron Radiation**, 17, 268-272, 2010.
- [27] Bielecka, K., Kurtek, W., Banas, D., Kubala-Kukus, A., Braziewicz, J. **Acta Physica Polonica A**, 125(4), 911-918, 2014.
- [28] Shawlow, A. L., Townes, C. H., **Physical Review Journals Archive**, 112, 1940, 1958.
- [29] Cremers, D. A., Radziemski, L. J. **Handbook of Laser-Induced Breakdown Spectroscopy**, Ed. John Wiley & Sons: England, 2006.
- [30] Radziemski, L. J., Cremers, D. A., Loree, T. R. **Spectrochimica Acta B**, 38, 349-353, 1983.

- [31] Júnior, D. S., Nunes, L. C., Carvalho, G. G. A., Gomes, M. S., Souza, P. F., Leme, F. O., Santos, L. G. C., Krug, F. J. ***Spectrochimica Acta Part B***, 71, 3-13, 2012.
- [32] Noll, R. ***"Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. Fundamentos e Aplicações"***, 1ª ed., Editora Springer: Alemanha, 2012.
- [33] Santos Jr, D., Nunes, L. C., Carvalho, G. G. A., Gomes, M. S., Souza, P. F., Leme, F. O., Santos, L. G. C., Krug, F. J. ***Spectrochimica Acta Part B***, 71-72, 3-13, 2012.
- [34] Pouzar, M., Průšová, M., Prokopčáková, P., Černohorský, T., Wienerb, J., Krejčová, A. ***Journal Analytical Atomic Spectrometry***, 24, 685-688, 2009.
- [35] Aquino, F. W. B., Santos, J. M., Carvalho, R. R. V., Coelho, J. A. O., Pereira-Filho, E. R. ***RSC Advances***, 5, 67001-67010, 2015.
- [36] Gonzaga, F. B., Pasquini, C. ***Spectrochimica Acta - Part B***, 63, 56, 2008.
- [37] Galbács, G. ***Analytical and Bioanalytical Chemistry***, 407, 7537-7562, 2015.
- [38] Tofanelli, M., Pardini, L., Borrini, M., Bartoli, F., Bacci, A., D'Ulivo, A., Pitzalis, E., Mascherpa, M. C., Legnaioli, S., Lorenzetti, G., Pagnotta, S., Cavalcanti, G. H., Lezzerini, M., Palleschi, V. ***Spectrochimica Acta Part B***, 99, 70-75, 2014.
- [39] Kasem, M. A., Gonzalez, J. J., Russo, R. E., Harith, M. A. ***Spectrochimica Acta Part B***, 101, 26-31, 2014.
- [40] Hamzaoui, S., Khleifia, R., Jaïdane, Lakhdar, Z. B. ***Lasers in Medical Science***, 26, 79-83, 2011.
- [41] Thareja, R. K., Sharma, A. K., Shukla, S. ***Medical Engineering & Physics***, 30, 1143-1148, 2008.
- [42] Harun, H. A., Zainal, R., Daud, Y. M. ***Sains Malaysiana***, 46(1), 75-82, 2017.
- [43] Hamzaoui, S., Nouir, R., Jaidene, N. ***Journal of Applied Spectroscopy***, 84, (1), 2017.
- [44] Hosseinimakarem, Z., Tavassoli, S. H. ***Journal of Biomedical Optics***, 16(5), 057002, 2011.
- [45] Almessiere, M. A., Altuwiriqi, R., Gondal, M. A., AlDakheel, R. K., Alotaibi, H. F. ***Talanta***, 185, 61-70, 2018.
- [46] Corsi, M., Cristoforetti, G., Hidalgo, M., Legnaioli, S., Palleschi, V., Salvetti, A., Tognoni, E., Vallebona, C. ***Applied Optics***, 42 (30), 6133-6137, 2003.

- [47] Emara, E. M., Imam, H., Hassan, M. A., Elnaby, S. H. **Talanta**, 117, 176-183, 2013.
- [48] Gondal, M. A., Maganda, Y. W., Dastageer, M. A., Al Adel, F. F., Naqvi, A. A., Qahtan, T. F. **Applied Optics**, 53 (8), 1636-1643, 2014.
- [49] Testing, S. H. **Forensic Science International**, 145, 83-84, 2004.
- [50] Cooper, G. A. A., Kronstrand, R., Kintz, P. **Forensic Science International**, 218, 20, 2012.
- [51] Castro, J. P., Pereira-Filho, E. R. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 31, 2005-2014, 2016.
- [52] Brown, C. D., Davis, H. T. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, 80, 24-38, 2006.
- [53] Ferreira, M. M. C. **Quimiometria - conceitos, métodos e aplicações**, 1a ed., Campinas: UNICAMP, 2015.
- [54] Geladi, P. **Spectrochimica Acta Part B**, 58, 767-782, 2003.
- [55] Wold, S., Esbensen, K., Geladi, P. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, 2, 37-52, 1987.
- [56] Mady, L. J., Ajibade, D. V., Hsaio, C., Teichert, A., Fong, C., Wang, Y., Christakos, S., Bikle, D. D. **Journal of Investigative Dermatology**, 136, 1337-1345, 2016.
- [57] Parker, G. J., Leppert, T., Anex, D. S., Hilmer, J. K., Matsunami, N., Baird, L., Stevens, J., Parsawar, K., Durbin-Johnson, B. P., Rocke, D. M., Nelson, C., Fairbanks, D. J., Wilson, A. S., Rice, R. H., Woodward, S. R., Bothner, B., Hart, B. R., Leppet, M. **PLoS One**, 11, e0160653, 2016.
- [58] Richena, M., Rezende, C. A. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, 161, 430, 2016.
- [59] Pereira, F. M. V., Milori, D. M. B. P. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 25, 351, 2010.
- [60] Sussulini, A., Lima, A. G., Figueiredo, E. C., Fernandes, H. L., Pinheiro, S. C. L., Bueno, M. I. M. S., Pereira, F. M. V. **X-Ray Spectrometry**, 38, 254, 2009.
- [61] Robbins, C. R. **Chemical and physical behavior of human hair**, 5a ed., Springer, 445, 2012.
- [62] Donnici, C. L., Souza, C. C., Beinnerc, M. A., Silva, J. B. B. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 27, 119, 2016.

- [63] Wei, Z., Rui, Y., Shen, L. ***Spectroscopy and Spectral Analysis***, 28, 2187, 2008.
- [64] Ettlinger, J., Yegles, M. ***Forensic Science International***, 265, 13, 2016.
- [65] De Oliveira, R. A. G., Zandoni, T. B., Bessegato, G. G., Oliveira, D. P., Umbuzeiro, G. A., Zandoni, M. V. B. ***Química Nova***, 37 (6), 1037-1046, 2014.
- [66] Gerace, E., Veronesi, A., Martra, G., Salomone, A., Vincenti, M. ***Forensic Chemistry***, 3, 69, 2017.
- [67] Guerra-Tapia, A., Gonzalez-Guerra, E. ***Actas Dermo-sifiliográficas***, 105 (9), 833-839, 2014.
- [68] Rashid, A. H. B., Harrington, P. B., Jackson, G. P. ***Analytical Methods***, 7, 1707-1718, 2015.
- [69] Delgado-Povedano, M. M., Calderón-Santiago, M., Priego-Capote, F., Luque de Castro, M. D. ***Talanta***, 146, 310 - 317, 2016.
- [70] Kim, I. S., Cho, H. M., Koh, J., Kim, J. P. ***Journal of Applied Polymer Science***, 90, 3896-3904, 2003.
- [71] Kim, H. C., Kim, D. H., Park, J., Lim, J. Ch., Park, Y. W. ***Fibers and Polymers***, 10, 594-600, 2009.
- [72] Tao, Y. J., Pan, Y. X., Zhang, Z. Sh., Mai, K. Ch., ***European Polymer Journal***, 44, 1165-1174, 2008.
- [73] Zeng, X. M., Hu, J., Zhao, J. X., Zhang, Y. W., Pan, D., ***Journal of Applied Polymer Science***, 106, 2267-2273, 2007.
- [74] Ko, T. H., Lin, Ch. H., Ting, H. Y. ***Journal of Applied Polymer Science***, 37, 553-566, 1989.
- [75] Zhang, X., Huang, C., Jin, X. ***Journal of Applied Polymer Science***, 134, 44396-44404, 2016.

Anexo 1

JOHN WILEY AND SONS LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Jan 28, 2019

This Agreement between Unesp -- Fabiola Pereira ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	4517650263156
License date	Jan 28, 2019
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	X-Ray Spectrometry
Licensed Content Title	Wavelength dispersive X-ray fluorescence (WDXRF) and chemometric investigation of human hair after cosmetic treatment
Licensed Content Author	Mônica Cardoso Santos, Marco Aurelio Sperança, Fabíola Manhas Verbi Pereira
Licensed Content Date	Mar 4, 2018
Licensed Content Pages	6
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	Author of this Wiley article
Format	Print and electronic
Portion	Full article
Will you be translating?	No
Title of your thesis / dissertation	Triagem da composição química de amostras de cabelo humano antes e após modificação estética utilizando técnicas espectroanalíticas e quimiometria
Expected completion date	Mar 2019
Expected size (number of pages)	51
Requestor Location	Unesp Rua Professor Francisco Degni 55 Araraquara, São Paulo 14800060 Brazil Attn: Unesp
Publisher Tax ID	EU826007151
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	

TERMS AND CONDITIONS

This copyrighted material is owned by or exclusively licensed to John Wiley & Sons, Inc. or one of its group companies (each a "Wiley Company") or handled on behalf of a society with which a Wiley Company has exclusive publishing rights in relation to a particular work (collectively "WILEY"). By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the billing and payment terms and conditions established by the Copyright Clearance Center Inc., ("CCC's Billing and Payment terms and conditions"), at the time that you opened your RightsLink account (these are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

Terms and Conditions

- The materials you have requested permission to reproduce or reuse (the "Wiley Materials") are protected by copyright.
- You are hereby granted a personal, non-exclusive, non-sub licensable (on a stand-alone basis), non-transferable, worldwide, limited license to reproduce the Wiley Materials for the purpose specified in the licensing process. This license, **and any CONTENT (PDF or image file) purchased as part of your order**, is for a one-time use only and limited to any maximum distribution number specified in the license. The first instance of republication or reuse granted by this license must be completed within two years of the date of the grant of this license (although copies prepared before the end date may be distributed thereafter). The Wiley Materials shall not be used in any other manner or for any other purpose, beyond what is granted in the license. Permission is granted subject to an appropriate acknowledgement given to the author, title of the material/book/journal and the publisher. You shall also duplicate the copyright notice that appears in the Wiley publication in your use of the Wiley Material. Permission is also granted on the understanding that nowhere in the text is a previously published source acknowledged for all or part of this Wiley Material. Any third party content is expressly excluded from this permission.
- With respect to the Wiley Materials, all rights are reserved. Except as expressly granted by the terms of the license, no part of the Wiley Materials may be copied, modified, adapted (except for minor reformatting required by the new Publication), translated, reproduced, transferred or distributed, in any form or by any means, and no derivative works may be made based on the Wiley Materials without the prior permission of the respective copyright owner. **For STM Signatory Publishers clearing permission under the terms of the [STM Permissions Guidelines](#) only, the terms of the license are extended to include subsequent editions and for editions in other languages, provided such editions are for the work as a whole in situ and does not involve the separate exploitation of the permitted figures or extracts,** You may not alter, remove or suppress in any manner any copyright, trademark or other notices displayed by the Wiley Materials. You may not license, rent, sell, loan, lease, pledge, offer as security, transfer or assign the Wiley Materials on a stand-alone basis, or any of the rights granted to you hereunder to any other person.
- The Wiley Materials and all of the intellectual property rights therein shall at all times remain the exclusive property of John Wiley & Sons Inc, the Wiley Companies, or their respective licensors, and your interest therein is only that of having possession of and the right to reproduce the Wiley Materials pursuant to Section 2 herein during the continuance of this Agreement. You agree that you own no right, title or interest in or to the Wiley Materials or any of the intellectual property rights therein. You shall have no rights hereunder other than the license as provided for above in Section 2. No right, license or interest to any trademark, trade name, service mark or other branding ("Marks") of WILEY or its licensors is granted hereunder, and you agree that you shall not assert any such right, license or interest with respect thereto
- NEITHER WILEY NOR ITS LICENSORS MAKES ANY WARRANTY OR REPRESENTATION OF ANY KIND TO YOU OR ANY THIRD PARTY, EXPRESS, IMPLIED OR STATUTORY, WITH RESPECT TO THE MATERIALS OR THE ACCURACY OF ANY INFORMATION CONTAINED IN THE MATERIALS, INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, ANY IMPLIED WARRANTY OF MERCHANTABILITY, ACCURACY, SATISFACTORY QUALITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, USABILITY, INTEGRATION OR NON-INFRINGEMENT AND ALL SUCH WARRANTIES ARE HEREBY EXCLUDED BY WILEY AND ITS LICENSORS AND WAIVED BY YOU.
- WILEY shall have the right to terminate this Agreement immediately upon breach of this Agreement by you.

- You shall indemnify, defend and hold harmless WILEY, its Licensors and their respective directors, officers, agents and employees, from and against any actual or threatened claims, demands, causes of action or proceedings arising from any breach of this Agreement by you.
- IN NO EVENT SHALL WILEY OR ITS LICENSORS BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON OR ENTITY FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, EXEMPLARY OR PUNITIVE DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, PROVISIONING, VIEWING OR USE OF THE MATERIALS REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION SHALL APPLY NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.
- Should any provision of this Agreement be held by a court of competent jurisdiction to be illegal, invalid, or unenforceable, that provision shall be deemed amended to achieve as nearly as possible the same economic effect as the original provision, and the legality, validity and enforceability of the remaining provisions of this Agreement shall not be affected or impaired thereby.
- The failure of either party to enforce any term or condition of this Agreement shall not constitute a waiver of either party's right to enforce each and every term and condition of this Agreement. No breach under this agreement shall be deemed waived or excused by either party unless such waiver or consent is in writing signed by the party granting such waiver or consent. The waiver by or consent of a party to a breach of any provision of this Agreement shall not operate or be construed as a waiver of or consent to any other or subsequent breach by such other party.
- This Agreement may not be assigned (including by operation of law or otherwise) by you without WILEY's prior written consent.
- Any fee required for this permission shall be non-refundable after thirty (30) days from receipt by the CCC.
- These terms and conditions together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein) form the entire agreement between you and WILEY concerning this licensing transaction and (in the absence of fraud) supersedes all prior agreements and representations of the parties, oral or written. This Agreement may not be amended except in writing signed by both parties. This Agreement shall be binding upon and inure to the benefit of the parties' successors, legal representatives, and authorized assigns.
- In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall prevail.
- WILEY expressly reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

- This Agreement will be void if the Type of Use, Format, Circulation, or Requestor Type was misrepresented during the licensing process.
- This Agreement shall be governed by and construed in accordance with the laws of the State of New York, USA, without regards to such state's conflict of law rules. Any legal action, suit or proceeding arising out of or relating to these Terms and Conditions or the breach thereof shall be instituted in a court of competent jurisdiction in New York County in the State of New York in the United States of America and each party hereby consents and submits to the personal jurisdiction of such court, waives any objection to venue in such court and consents to service of process by registered or certified mail, return receipt requested, at the last known address of such party.

WILEY OPEN ACCESS TERMS AND CONDITIONS

Wiley Publishes Open Access Articles in fully Open Access Journals and in Subscription journals offering Online Open. Although most of the fully Open Access journals publish open access articles under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY) License only, the subscription journals and a few of the Open Access Journals offer a choice of Creative Commons Licenses. The license type is clearly identified on the article.

The Creative Commons Attribution License

The [Creative Commons Attribution License \(CC-BY\)](#) allows users to copy, distribute and transmit an article, adapt the article and make commercial use of the article. The CC-BY license permits commercial and non-

Creative Commons Attribution Non-Commercial License

The [Creative Commons Attribution Non-Commercial \(CC-BY-NC\) License](#) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.(see below)

Creative Commons Attribution-Non-Commercial-NoDerivs License

The [Creative Commons Attribution Non-Commercial-NoDerivs License](#) (CC-BY-NC-ND) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, is not used for commercial purposes and no modifications or adaptations are made. (see below)

Use by commercial "for-profit" organizations

Use of Wiley Open Access articles for commercial, promotional, or marketing purposes requires further explicit permission from Wiley and will be subject to a fee.

Further details can be found on Wiley Online Library

<http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-410895.html>

Other Terms and Conditions:

v1.10 Last updated September 2015

Questions? customer@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

RESEARCH ARTICLE

Wavelength dispersive X-ray fluorescence (WDXRF) and chemometric investigation of human hair after cosmetic treatment

Mônica Cardoso Santos¹ | Marco Aurelio Sperança² | Fabíola Manhas Verbi Pereira¹ 

¹Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Rua Professor Francisco Degni, 55, Araraquara, SP 14800-060, Brazil

²Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Rodovia Washington Luís, Km 235, São Carlos, SP 13565-905, Brazil

Correspondence

Fabíola Manhas Verbi Pereira, Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Rua Professor Francisco Degni, 55, Araraquara, SP 14800-060, Brazil.
Email: fabiola@iq.unesp.br

Funding information

Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES); National Council for Scientific and Technological Development, Grant/Award Numbers: 160152/2015-1 and 445729/2014-7; São Paulo Research Foundation, Grant/Award Number: 2016/00779-6

Variations in the chemical composition of 63 different human and 6 different synthetic hair samples were investigated using wavelength dispersive X-ray fluorescence (WDXRF) spectra profiles. To evaluate the effect of cosmetic treatment on the strands, the human hair samples were bleached, but the synthetic ones were not. To better investigate the data, exploratory analyses were calculated using principal component analysis for the WDXRF spectra. Eight normalizations/standardizations were applied in the WDXRF to verify the clustering tendency. Bleaching was tested, because it is one way in which people mask their real hair color. After the data were standardized, an enhancement of the data discrimination was verified. Furthermore, the explained variance was higher in the first principal components. The WDXRF spectra were able to distinguish samples with distinct features, including synthetic, dyed, and straightened hair. The findings of this study hold promise for forensics due to desirable aspects such as nondestructivity and the possibility of a large hair sample database.

1 | INTRODUCTION

Hair is an excretory system of the human body that can be easily accessed, targeting forensic analysis. Scientific investigations in this field have been increasingly applied to using an analytical matrix as a biomarker, specifically with respect to the assessment of environmental exposure to metals^[1] and the determination of trace elements and/or abused drugs.^[2,3]

An attractive aspect of hair sampling over conventional excretory human body systems, such as blood, sweat, and urine, is that hair is easier to store, transport, and handle. Hair is relatively stable, possessing a reduced risk of deterioration over time, making this characteristic relevant to forensic analysis.^[4,5]

In the literature, numerous studies about hair analysis have been increased over time, especially in the toxicological, clinical, and doping control area. However, there are other applications that use hair for the investigation of illegal drugs.^[6,7] For instance, according to Jurado et al., hair bleaching and/or dyeing can mask drug concentrations.^[8]

Cosmetic hair modifications may also lead to misleading evidence. At a crime scene, a strand of hair cannot match the person that committed the crime if the hair was modified by some procedure, such as straightening or dyeing. DNA tests may be able to solve this, but they may be expensive, inconclusive, and/or unavailable in some places.

An interesting study was conducted by Barret et al. to examine hair to differentiate colors using an ultraviolet-

visible microspectrophotometry instrument.^[9] Spectra of 25 natural hair samples from dark, medium, light, and lightest brown to dark, medium, and light blonde were analyzed. The hair strands were colored using 55 different red hair dyes. The method led to the ability to distinguish between the hair substrate and the dye peak, with wavelengths to ultraviolet–visible radiation ranging from 300 to 400 nm and 425 to 550 nm, respectively. They also performed a multivariate model using discriminant analysis in which 89% of samples were accurately classified according to the dye set. However, they only tested different shades of red using broad absorption spectra. In addition, hair samples with previous cosmetic treatments, such as straightening, were not considered in this method.^[10]

The literature reports the application of several analytical techniques, such as spectroscopic^[11,12] and chromatographic,^[13,14] for many purposes using human hair as sample. However, these techniques require laborious procedures for sample preparation. In this context, wavelength dispersive X-ray fluorescence (WDXRF) offers noninvasive, faster, and multielement measurements being an attractive analytical technique.^[15,16]

In this study, direct measurements using WDXRF were combined with exploratory analysis to evaluate different hair samples based on their cosmetic modification. One of the novelty of this study is the easy and fast sample preparation procedure employed, that is discussed in the subsequent sections of the text.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Samples and decontamination procedure

Hair samples were collected locally (Araraquara, São Paulo State, Brazil) from hairdressing salons and provided by voluntary donors. Synthetic strands were purchased at the local market. All samples were stored at room temperature in inert and decontaminated plastic containers.

The sample set was composed of 32 male hair samples from donors aged from 1 to 69 years and 32 female hair samples from donors aged from 10 to 68 years. The characteristics of this set were as follows: 36 hair samples that had no treatment (virgin), 8 that were straightened, 10 that were dyed, and 10 that were both straightening and dyed with different colors of pigmentation. With respect to hair color, 6 samples were blond, 30 black, 4 red, 7 gray, and 17 brown. The types of hair were 27 wavy, 17 curly, and 20 straight. The six samples of synthetic straight hair were composed of 1 blonde sample, 1 black, 1 red, 1 blonde mixed with black, and 2 brown.

Before the analysis, a decontamination procedure^[17] was performed to avoid any external contaminants, such as dust, smoke, sweat, sebum, shampoo, or cosmetic residues, because these may interfere with the WDXRF analysis results. Thus, the samples were washed in three stages with two different solvents: (a) acetone (Commercial Neon, Suzano/SP, analytical grade), (b) Milli-Q™ water, and (c) acetone again.

The same samples were bleached according to the procedure performed in beauty salons to simulate actual conditions. Therefore, these samples were exposed to a commercially manufactured solution containing ammonia, hydrogen peroxide, and persulfates of potassium and ammonium, for approximately 40 min to decolor the hair. The strands were washed with a neutral soap and allowed to dry at room temperature for 24 hr. After drying, they were stored for further analysis.

2.2 | Composition of dataset

The final dataset included 133 samples, of which 64 were labeled untreated from 63 different people, 6 were synthetic ones, and the 63 remaining samples were bleached. One bleached sample was not missing. The explanation was that two samples were from the same person, where the difference between them was the color of the same dye. Thus, decolorization was necessary only for one sample. This same procedure of bleaching was not able to decolorize the synthetic hairs.

A 150-mg mass of each hair was pressed with the help of a manual hydraulic press (GS15011, Specac, England) for 60 s in 13 mm Ø device, at 8 kN, as shown in Figure 1a,b. Figure 1c shows a natural (I) and a bleached hair samples (II).

2.3 | WDXRF measurements

The WDXRF experiments were performed using an ARL Perform'X WDXRF spectrometer (Thermo Scientific, Madison, WI, USA). This instrument includes a rhodium X-ray tube that can be operated at a maximum power of 4,200 W. The measurements were performed directly on the hair pellets (Figure 1) under a vacuum environment, with a 10-mm collimator beam using two analyzer crystals: LiF 200 (K to U, 0.17–3.88 Å, 0.01 resolution) and AX03 (O to Si, 3.99–6.89 Å, 0.01 resolution). The measurement time per sample was 15 min. The National Institute of Standards and Technology database was the reference for the WDXRF emission line characterization of each element. Three inter-day readings were performed for each sample.

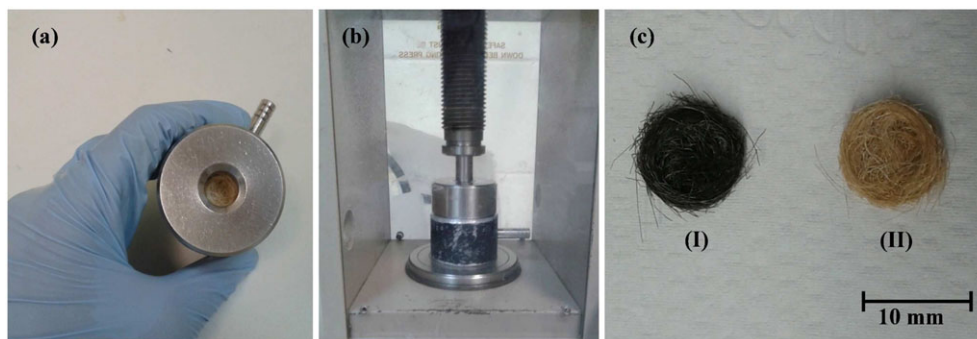


FIGURE 1 Procedure for sample preparation: (a) device for sample conformation, (b) manual hydraulic press applied to shape the hair in pellets, and (c) pellets of hair strands being (I) untreated and (II) bleached

2.4 | Data evaluation

The spectra were evaluated using an adaptation of MATLAB code^[18] fitted to calculate the following standardizations in WDXRF spectra: (a) the mean; (b) each spectrum was divided by its individual Euclidean norm (vector length), and then, the mean and the sum were calculated apart; (c) the individual spectral area (sum of all the signals) was calculated and then, the raw data divided by this value. After that, mean and sum of all spectrum are also calculated; and (d) the individual spectral maximum (the highest signal) for each spectrum, with the raw data divided by this value. At least two replicates are required for carrying out the standardizations and to calculate the mean and sum.

3 | RESULTS AND DISCUSSION

The main chemical constituent of the hair is keratin, which corresponds up to 65 wt% to 95 wt% of the fiber of hair. However, its composition includes water, lipids, and amino acids. The hair is still composed of carbon, oxygen, nitrogen, hydrogen, and sulfur. Elements such as calcium, iron, lead, and silicon can be detected, among others.^[19]

In addition, characteristics related to the stability and alterations to the chemical composition of the hair after cutting or pulling are necessary in order to compose a reliable database.^[20,21] To perform forensic taxonomy, the collected samples with different features were categorized based on pigment (untreated and bleached), gender, treatment (dyed and straightening), and donor age.

Figure 2 shows a typical spectrum for untreated brown human hair strands (black line), the same sample bleached (gray line), and one synthetic hair sample (light gray line). The K α emission lines detected were Zn (1.43 Å), Cu (1.54 Å), Fe (1.94 Å), Ca (3.36 Å), and K (3.74 Å). Furthermore, we also observed the presence of a high-intensity K α fluorescence line for S (5.37 Å) for all analyzed human

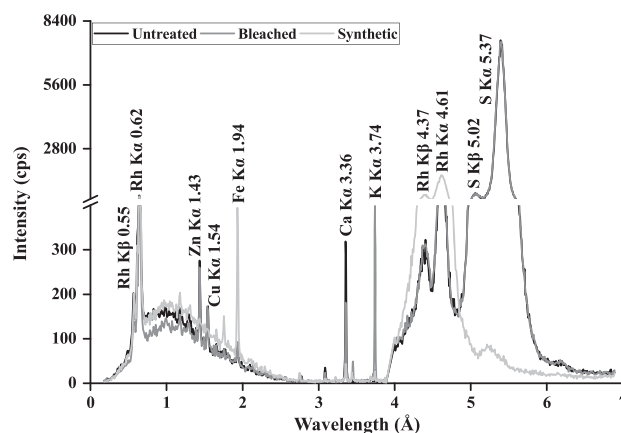


FIGURE 2 Wavelength dispersive X-ray fluorescence spectra profiles for untreated (brown color) and bleached from same hair sample, and one synthetic (black color)

hair samples. According to the literature, the mineral content of dry hair can range from 0.25% to 0.95%.^[21]

Special attention should be paid to the high intensity of the region where the scattering of the Rh source occurs for the sample of black color synthetic hair spectrum. In the spectrum, we observed a Rh K α of 0.62 Å and K β of 0.55 Å with the crystal that covers K to U, 0.17–3.88 Å, 0.01 resolution. We also observed a Rh K α of 4.61 Å and K β of 4.37 Å for the crystal that measures from O to Si, 3.99–6.89 Å, 0.01 resolution. In addition, the same spectral profile repeats for the remaining synthetic strands, independent of their color.

After the evaluation of eight standardizations for the data, the best one was performed by the Euclidian norm, in which the criteria were better discriminated among the clusters using fewer principal components (PCs) with more explained variance by means of principal component analysis (PCA) calculations. Therefore, for all calculations, the Euclidian norm was applied.

Afterwards, with the help of PCA, the tendency of separation of human and synthetic hair samples was, as expected, clear, as shown in the scores plot of Figure 3,

along PC1 with 97% of explained variance, using the entire spectra profiles and mean-centered preprocessing for independent variables. The dimensions of matrix **X** were 133×805 for the samples and variables, respectively. The loading plots in Figure 3 shows the influence of Rh scattering (dark black diamonds) for synthetic samples and the $K\alpha$ emission lines for Ca (black squares), K (black inverted triangles), and S (black stars) for human hairs.

The presence of S and Ca can be associated to both cysteine-rich α -keratin^[22] and calcium-binding proteins (called S100A3).^[23] S100A3 is attached to hair keratin via disulfide bonds, which affords structural integrity to the hair fibers.^[23] The α -keratin is the main component of human hair fibers, whereas Ca plays an important role in human hair growth.^[24] The scattering from the Rh source was able to measure information from the light elements, such as C, H, and O, for the organic chemical composition of these samples.^[25,26] Then, the WDXRF profile is able to differentiate human from synthetic hair, which can be applied to evidence when the source of the sample is unknown. However, the variation of texture samples can influence the interaction between the X-ray and matter, meaning the X-ray absorption was attenuated. A PCA performed using only the Rh scattering regions (data not shown) confirmed distinct clusters for untreated and synthetic samples, with 89% of explained variance for PC1.

A PCA was also calculated using a data matrix with 127 samples consisting of 805 variables, but synthetic hair samples were not included to verify the human strands (Figure 4). The total number of PCs was six with 93% of explained variance. This number was high, and there was no improved visual separation between the clusters,

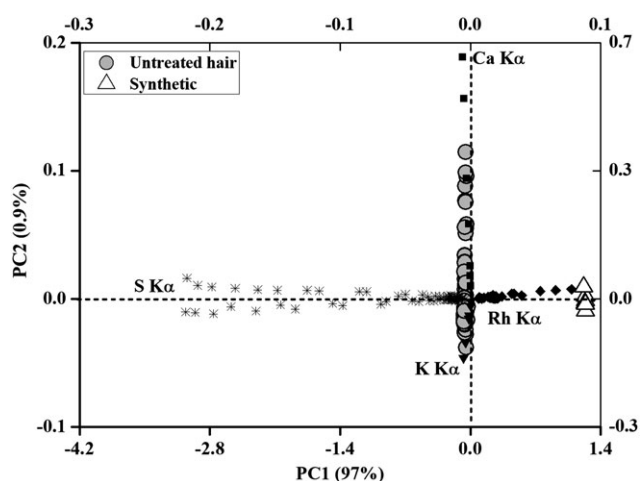


FIGURE 3 Score and loading plots for untreated and synthetic hair samples using the mean of entire profile of wavelength dispersive X-ray fluorescence spectra standardized with Euclidian norm; 133 samples and 805 variables. PC = principal component

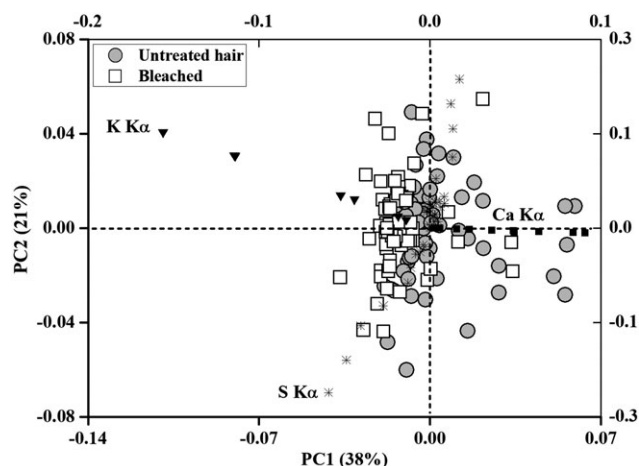


FIGURE 4 Score and loading plots for untreated hair and for the same samples after bleaching procedure using the mean of entire profile of wavelength dispersive X-ray fluorescence spectra standardized with the Euclidian norm; 127 samples and 805 variables. PC = principal component

as shown in Figure 4. The Rh-scattering region has not influenced the variables responsible for score visualization, confirming the relationship with only synthetic strands. An interesting finding is that K was relevant for bleached samples. This chemical element was related to potassium persulfate, an oxidant component of the commercial product used for procedure of bleaching carried out in this study.

A selection of variables was performed based on the most important values of loadings revealed by the previous results of PCA showed above. The score plots of Figure 5 show a better tendency of clustering among samples, in which the dimension of matrix **X** was 127×183 .

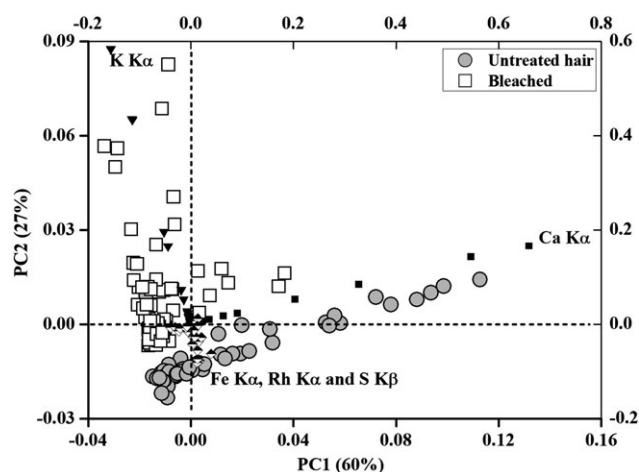


FIGURE 5 Score and loading plots for untreated hair and for the same samples after bleaching procedure using the mean wavelength dispersive X-ray fluorescence spectra standardized with the Euclidian norm and selected $K\alpha$ lines of Ca, Fe, K, and Rh and $K\beta$ of S; 127 samples and 183 variables. PC = principal component

Still in Figure 5, the loading plots confirm that bleached hair samples were related to K element. The $K\alpha$ lines of Ca (black squares), Fe, and Rh, also S $K\beta$ influenced untreated samples, and these three last elements were denoted as half black diamonds. Only one sample labeled untreated was not discriminated, and the explanation could be related to the strand being gray and having a thicker texture. Forty-two samples in the untreated set showed high correlation for the chemical element Fe. Among them, five were dyed, four straightened, and five straightened and dyed. The remaining samples had no treatment, denoted as virgin. The hair color of these samples was black (21), blond (4), brown (11), and gray (6). In the human body, Fe mainly exists in coordinated forms into heme proteins, such as hemoglobin or myoglobin present in the blood. Blood vessels nourish the cells in the hair bulb with micronutrients; then, hair strands can be considered an interesting biomarker for iron levels in human body.^[27] According to Wei et al.,^[28] the cosmetic procedure, as dyeing, can raise the content levels of the following metals: Fe, Cu, Mg, Ni, and Cd at hair cuticle.

Human hair is an analytical matrix that has a complex structure. In addition, people apply different chemical processes that modify its structure, such as straightening.^[29,30] Thus, to evaluate these differences in this matrix, a PCA was performed with a dataset composed of only samples with two cosmetic modifications (straightening and dyeing) in same strand using 805 independent variables, as shown in Figure 6. The total variance observed in the PCA for the first two PCs was 79%. The loading plots indicated that the elements Cu and S were relevant for this clustering of samples, as well as the scattering of Rh $K\alpha$ (0.62 Å). The detection of Cu

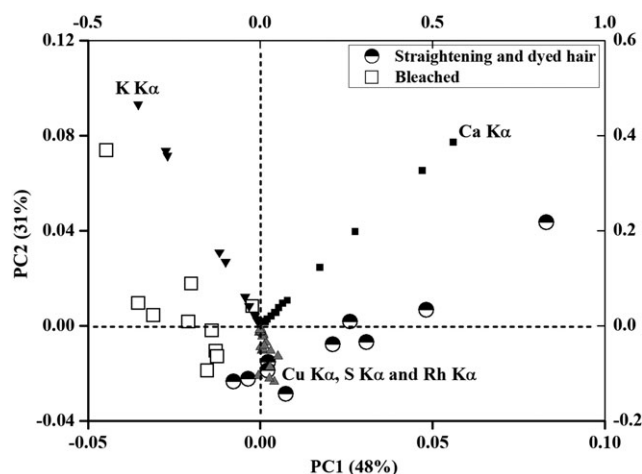


FIGURE 6 Score and loading plots for straightening and dyeing hair and the same samples after bleaching procedure using the mean wavelength dispersive X-ray fluorescence spectra standardized with the Euclidian norm; 20 samples and 805 variables. PC = principal component

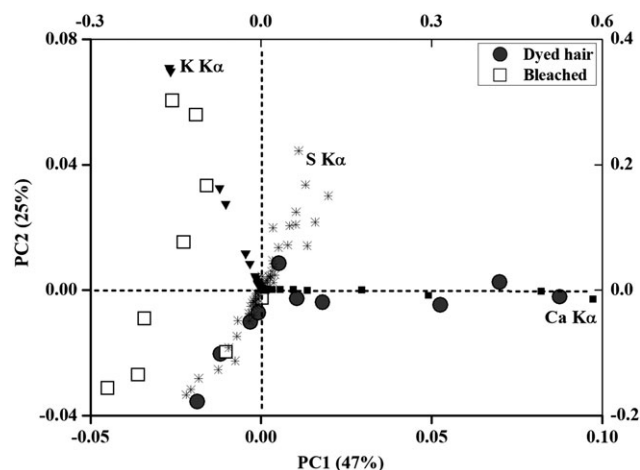


FIGURE 7 Score and loading plots for dyed hair and the same samples after bleaching procedure using the mean wavelength dispersive X-ray fluorescence spectra standardized with the Euclidian norm; 19 samples and 805 variables. PC = principal component

can be also associated to the oxidative alteration in hair treated, which increases the content of ions Cu (II), independent of the hair color.^[31]

Another important point with this matrix is the procedures performed for changing their coloration using semi-permanent, long-lasting semipermanent, and permanent dyes.^[30] In this context, an evaluation of the dataset with these samples is shown in Figure 7, with 72% of the explained variance for PC1 and PC2 with the entire data spectra (805 variables). Calcium with positive values for PC1 contributed to the discrimination of dyed hair. The sulfur emission line was important for both samples. The element K also contributed for discrimination of the bleached samples.

WDXRF data were able to verify clustering between the cosmetic modifications for the same samples after bleaching. Further classes under investigation, such as age and gender, unfortunately did not show any clustering tendency.

4 | CONCLUSIONS

In this study, a method combining WDXRF and chemometric tools for the analysis of distinct hair samples after bleaching opened forensic possibilities. The direct measurements performed by WDXRF could be applied to real cases when cosmetic modifications of strands (such as bleaching) exist. The scattering from the X-ray source of Rh was important to evaluate synthetic hair strands. Chemical elements, such as Ca, Cu, Fe, K, and S, were decisive to clustering the samples in PCA analysis.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the São Paulo Research Foundation (FAPESP, Process 2016/00779-6), the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Processes 445729/2014-7 and 160152/2015-1), and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES). The authors are grateful to Thermo Scientific for the loan of the WDXRF instrument.

ORCID

Fabiola Manhas Verbi Pereira  <http://orcid.org/0000-0002-8117-2108>

REFERENCES

- [1] I. M. Kempson, E. Lombib, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 3915.
- [2] L. Font, G. Peijl, I. Wetten, P. Vroon, B. Wagta, G. Davies, *J. Anal. At. Spectrom.* **2012**, *27*, 719.
- [3] E. Cuypers, B. Flinders, C. M. Boone, I. J. Bosman, K. J. Lusthof, A. C. Astén, J. Tytgat, R. M. A. Heeren, *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 3091.
- [4] A. H. B. Rashaid, P. B. Harrington, G. P. Jackson, *Anal. Methods* **2015**, *7*, 1707.
- [5] S. Król, B. Zabiegała, J. Namieśnik, *TrAC Trends Anal. Chem.* **2013**, *47*, 84.
- [6] S. Pichini, E. Marchei, S. Martello, M. Gottardi, M. Pellegrini, F. Svaizer, A. Lotti, M. Chiarotti, *Forensic Sci. Int.* **2015**, *249*, 47.
- [7] S. Odoardi, V. Valentini, N. De Giovanni, V. L. Pascali, S. Strano-Rossi, *Microchem. J.* **2017**, *133*, 302.
- [8] C. Jurado, P. Kinz, M. Menéndez, M. Repetto, *Int. J. Legal Med.* **1997**, *110*, 159.
- [9] J. A. Barrett, J. A. Siegel, J. V. Goodpaster, *J. Forensic Sci.* **2010**, *55*, 323.
- [10] J. A. Barrett, J. A. Siegel, J. V. Goodpaster, *J. Forensic Sci.* **2011**, *56*, 95.
- [11] O. O. Petter, I. S. Eneji, R. S. Sha'Ato, *Am. J. Anal. Chem.* **2012**, *3*, 770.
- [12] H. Kumakli, A. V. Duncan, K. McDaniel, T. F. Mehari, J. Stephenson, L. Maple, Z. Crawford, C. L. Macemore, C. M. Babyak, S. O. Fakayode, *Chemosphere* **2017**, *174*, 708.
- [13] A. Orfanidis, O. Mastrogianni, A. Koukou, G. Psarros, H. Gika, G. Theodoridis, N. Raikos, *J. Chromatogr. B* **2017**, *1047*, 141.
- [14] D. Favretto, S. Vogliardi, G. Stocchero, A. Nalesso, M. Tucci, C. Terranova, S. D. Ferrara, *Forensic Sci. Int.* **2013**, *226*, 88.
- [15] J. Q. McComb, C. Rogers, F. X. Han, P. B. Tchounwou, *Water Air Soil Pollut.* **2014**, *225*, 2169.
- [16] D. V. Babos, V. C. Costa, M. A. Sperança, E. R. Pereira-Filho, *Microchem. J.* **2018**, *137*, 272.
- [17] G. A. A. Cooper, R. Kronstrand, P. Kintz, *Forensic Sci. Int.* **2012**, *218*, 20.
- [18] J. P. Castro, E. R. Pereira-Filho, *J. Anal. At. Spectrom.* **2016**, *31*, 2005.
- [19] F. Yang, Y. Zhang, M. C. Rheinstädter, *PeerJ.* **2014**, *2*, e619.
- [20] G. Lubec, G. Nauer, K. Seifert, E. Strouhal, H. Porteder, J. Szilvass, M. Teschler, *J. Archaeol. Sci.* **1987**, *14*, 113.
- [21] M. R. Harkey, *Forensic Chem.* **1993**, *63*, 9.
- [22] G. J. Parker, T. Leppert, D. S. Anex, J. K. Hilmer, N. Matsunami, L. Baird, J. Stevens, K. Parsawar, B. P. Durbin-Johnson, D. M. Rocke, C. Nelson, D. J. Fairbanks, A. S. Wilson, R. H. Rice, S. R. Woodward, B. Bothner, B. R. Hart, M. Leppet, *PLoS One* **2016**, *11*, e0160653.
- [23] M. Richena, C. A. Rezende, *J. Photochem. Photobiol. B* **2016**, *161*, 430.
- [24] L. J. Mady, D. V. Ajibade, C. Hsaio, A. Teichert, C. Fong, Y. Wang, S. Christakos, D. D. Bikle, *J. Invest. Dermatol.* **2016**, *136*, 1337.
- [25] F. M. V. Pereira, D. M. B. P. Milori, *J. Anal. At. Spectrom.* **2010**, *25*, 351.
- [26] A. Sussulini, A. G. Lima, E. C. Figueiredo, H. L. Fernandes, S. C. L. Pinheiro, M. I. M. S. Bueno, F. M. V. Pereira, *X-Ray Spectrom.* **2009**, *38*, 254.
- [27] C. L. Donnici, C. C. Souza, M. A. Beinner, J. B. B. da Silva, *J. Braz. Chem. Soc.* **2016**, *27*, 119.
- [28] Z. Wei, Y. Rui, L. Shen, *Spectrosc. Spectr. Anal.* **2008**, *28*, 2187.
- [29] J. Ettlinger, M. Yegles, *Forensic Sci. Int.* **2016**, *265*, 13.
- [30] E. Gerace, A. Veronesi, G. Martra, A. Salomone, M. Vincenti, *Forensic Chem.* **2017**, *3*, 69.
- [31] A. J. Grosvenor, J. Marsh, A. Thomas, J. A. Vernon, D. P. Harland, S. Clerens, J. M. Dyer, *Photochem. Photobiol.* **2016**, *92*, 144.

How to cite this article: Santos MC, Sperança MA, Pereira FMV. Wavelength dispersive X-ray fluorescence (WDXRF) and chemometric investigation of human hair after cosmetic treatment. *X-Ray Spectrometry*. 2018;47:252–257. <https://doi.org/10.1002/xrs.2836>

Anexo 2

SPRINGER NATURE LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Jan 28, 2019

This Agreement between Unesp -- Fabiola Pereira ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

License Number	4517650664078
License date	Jan 28, 2019
Licensed Content Publisher	Springer Nature
Licensed Content Publication	Journal of Applied Spectroscopy
Licensed Content Title	Chemical Element Profiles in Commercial Woven Fabric Combining Laser-Induced Breakdown Spectroscopy and Chemometrics
Licensed Content Author	M. Cardoso Santos, C. Dai, F. Manhas Verbi Pereira
Licensed Content Date	Jan 1, 2018
Licensed Content Volume	85
Licensed Content Issue	3
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	academic/university or research institute
Format	print and electronic
Portion	full article/chapter
Will you be translating?	no
Circulation/distribution	<501
Author of this Springer Nature content	yes
Title	Triagem da composição química de amostras de cabelo humano antes e após modificação estética utilizando técnicas espectroanalíticas e quimiometria
Institution name	Unesp
Expected presentation date	Mar 2019
Requestor Location	Unesp Rua Professor Francisco Degni 55 Araraquara, São Paulo 14800060 Brazil Attn: Unesp
Billing Type	Invoice
Billing Address	Unesp Rua Professor Francisco Degni 55 Araraquara, Brazil 14800060 Attn: Unesp
Total	0.00 USD

[Terms and Conditions](#)

Springer Nature Terms and Conditions for RightsLink Permissions

Springer Nature Customer Service Centre GmbH (the Licensor) hereby grants you a non-exclusive, world-wide licence to reproduce the material and for the purpose and requirements specified in the attached copy of your order form, and for no other use, subject to the conditions below:

1. The Licensor warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of this material. However, you should ensure that the material you are requesting is original to the Licensor and does not carry the copyright of another

entity (as credited in the published version).

If the credit line on any part of the material you have requested indicates that it was reprinted or adapted with permission from another source, then you should also seek permission from that source to reuse the material.

2. Where **print only** permission has been granted for a fee, separate permission must be obtained for any additional electronic re-use.
3. Permission granted **free of charge** for material in print is also usually granted for any electronic version of that work, provided that the material is incidental to your work as a whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes for, the print version.
4. A licence for 'post on a website' is valid for 12 months from the licence date. This licence does not cover use of full text articles on websites.
5. Where '**reuse in a dissertation/thesis**' has been selected the following terms apply: Print rights of the final author's accepted manuscript (for clarity, NOT the published version) for up to 100 copies, electronic rights for use only on a personal website or institutional repository as defined by the Sherpa guideline (www.sherpa.ac.uk/romeo/).
6. Permission granted for books and journals is granted for the lifetime of the first edition and does not apply to second and subsequent editions (except where the first edition permission was granted free of charge or for signatories to the STM Permissions Guidelines <http://www.stm-assoc.org/copyright-legal-affairs/permissions/permissions-guidelines/>), and does not apply for editions in other languages unless additional translation rights have been granted separately in the licence.
7. Rights for additional components such as custom editions and derivatives require additional permission and may be subject to an additional fee. Please apply to Journalpermissions@springernature.com/bookpermissions@springernature.com for these rights.
8. The Licensor's permission must be acknowledged next to the licensed material in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figures/tables/illustrations or abstract, and must be hyperlinked to the journal/book's homepage. Our required acknowledgement format is in the Appendix below.
9. Use of the material for incidental promotional use, minor editing privileges (this does not include cropping, adapting, omitting material or any other changes that affect the meaning, intention or moral rights of the author) and copies for the disabled are permitted under this licence.
10. Minor adaptations of single figures (changes of format, colour and style) do not require the Licensor's approval. However, the adaptation should be credited as shown in Appendix below.

Appendix — Acknowledgements:

For Journal Content:

Reprinted by permission from [the Licensor]: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)]

For Advance Online Publication papers:

Reprinted by permission from [the Licensor]: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication), advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].)]

For Adaptations/Translations:

Adapted/Translated by permission from [the Licensor]: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)]

Note: For any republication from the British Journal of Cancer, the following credit line style applies:

Reprinted/adapted/translated by permission from [the Licensor]: on behalf of Cancer Research UK: : [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)]

For Advance Online Publication papers:

Reprinted by permission from The [the Licensor]: on behalf of Cancer Research UK: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication), advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].)]

For Book content:

Reprinted/adapted by permission from [the Licensor]: [Book Publisher (e.g. Palgrave Macmillan, Springer etc) [Book Title] by [Book author(s)] [COPYRIGHT] (year of publication)

Other Conditions:

Version 1.1

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

CHEMICAL ELEMENT PROFILES IN COMMERCIAL WOVEN FABRIC COMBINING LASER-INDUCED BREAKDOWN SPECTROSCOPY AND CHEMOMETRICS

M. Cardoso Santos, C. Dai,
and F. Manhas Verbi Pereira*

UDC 543.42

High-heterogeneity solid woven fabric samples were investigated using laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) and chemometrics. Many emission lines were relevant to characterize this material at the surface and in deeper layers of fibers. Differences among dyes and fibers were clearly observed. The scores maps showed the possibility of comparing the chemical compositions of the dye and fiber independent of the print of fabric. Variations in the composition were verified by carrying out a pattern for mapping using a sophisticated LIBS system. This screening can provide a fast evaluation of samples and may associate this information with classification, authenticity or even for forensic analysis of fabric materials.

Keywords: woven fabric, laser-induced breakdown spectroscopy, chemometrics.

Introduction. In recent decades, the globalization of markets has imposed significant changes in the Brazilian textile industry. In the past, national production supplied almost exclusively to the domestic market. This framework has continuously changed, and due to economic openness, low-cost products from Asia account for almost 90% of the volume of our domestic market [1].

In this context, studies have been conducted to evaluate the presence of possible toxic elements in imported textile goods and clothing. Since clothing has the function of protecting the body, woven fabric promotes direct contact of textile dyes with human skin. Some studies suggest the possibility of migration of metals or other chemical species through the sweat of the body system [2, 3]. Regarding textile dyes, there is not enough information about their potential risks to the health of consumers; available toxicological data have shown effects ranging from allergies to possible genetic changes [4]. Current studies related to possible effects of textile dye contact with the skin have focused on allergies and dermatitis, as previously mentioned. However, toxic dyes in the human body can induce harmful effects in cells, including DNA damage, which is related to various diseases, including certain types of cancer [5].

Toxic elements can easily be found in various sectors of the textile industry because they are often used in different textile processes, such as complexing agents in dyes, stripping agents, oxidizing materials, antifungal agent mordants, and compounds to prevent odor. In addition, they are applied to increase the durability of dye [6]. Considering the toxic aspects, several substances in textile products are relevant for chemical analysis. These analyses are vital to verify compliance with regulations of the presence and levels of prohibited or restricted substances and to characterize and manage them as well as to broader issues, such as classification, traceability, forensic analysis, and authenticity. Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) [7, 8] combined with chemometrics is an analytical technique that can be used to evaluate solid samples and compose maps of the chemical element distribution for analytical purposes [9, 10].

The importance of the study of these elements is not restricted to the safety of consumers of these materials but also to the safety of workers in the textile industry, as well as environmental concerns regarding the disposal of these materials. The threshold limit values have not been defined yet for legislations in several countries. This topic is new and slightly exploited and this work can be a beginning to think about the environmental impact from the fabric goods.

*To whom correspondence should be addressed.

Experimental. Eight samples from commercial woven fabrics purchased at local markets were investigated. The patterns of the samples were colorful prints, which was the criteria to represent a very wide variation of textile dyes. According to the manufacturers, the composition of this set of samples was as follows: 4 viscolycra (V) samples (viscose and elastane, denoted as V01, V02, V03, and V04), two liganete (L) samples (polyester, denoted as L01 and L02), and two neoprene (N) samples (polychloroprene, denoted as N01 and N02).

Procedures of mineral extraction. Before direct solid sample analysis, textile samples were submitted to preliminary chemical analysis for the determination of their metal contents. In this case, two different procedures were also tested considering the possibility of the textile contacting the skin and the toxicity of the dyes. For these analyses, samples of approximately 0.5 g were cut with the help of a ceramic knife; then, they were dried for 48 h at 60°C to avoid any possibility of contamination and all samples were manipulated without skin contact of the chemical analyst [11].

Therefore, raw samples were kept in an artificial sweat solution that was prepared as recommended by International Standard ISO/FDIS 3160/2 [12]. Another procedure was the mineralization of the samples performed with the help of a microwave oven (Speedwave 4, Berghof, Eningen, Germany) equipped with DAK 100 high-pressure vessels made of TFMTM-PTFE. Mineralization was performed with a mixture of 5 mL of 14 mol/L sub-boiling nitric acid and 5 mL of 30% (m/v) hydrogen peroxide. The microwave oven program was executed in two steps: (1) from room temperature up to 160°C in 5 min with a holding time of 5 min; (2) from 160 to 220°C in 2 min with a holding time of 15 min. The maximum allowed pressure was 80 bar. The final volumes were adjusted with 1% HNO₃ to 50 mL in volumetric flasks.

After the extraction, for both methods, the following eight elements were determined: Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb, and Ti. For sweat extraction, the analytical curve for the first seven elements was from 0.05 to 2.00 mg/kg, and the analytical curve ranged from 0.05 to 10.0 mg/kg for Fe. In the case of the mineralization procedure, the concentration values ranged from 0.50 to 5.0 mg/kg, with Fe being the exception, where the values were between 5.0 and 80.0 mg/kg. The determinations were carried out using an inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES) instrument (iCAP 6000, Thermo Scientific, Waltham, USA).

LIBS mapping. The LIBS instrument used was a commercial J200 LIBS system from Applied Spectra (Fremont, California, USA) with a Nd:YAG (1064 nm) laser source. For the spectral line information of each element, the Aurora software package (Applied Spectra) and database from the National Institute of Standards and Technology (NIST) were consulted. The laser energy applied for the experiments was 80 mJ, with a delay time of 0.5 μs and a spot size of 125 μm. The duration of laser pulse and the laser fluence were 10 ns and 650 J/cm², respectively.

In each sample, an area of 400 mm² was analyzed. In this area, 20 lines and 20 columns (400 points) were analyzed, and five laser pulses were performed per point. The distance between the lines and columns was 1 mm. A total of 2000 spectra were obtained for each sample. A single spectrum had 12,288 variables comprising emission lines from 186 to 1042 nm. The spectral information was recorded using a 6-channel charge-coupled device (CCD) spectrometer: channel 1 goes 186-nm, channel 2 from 309 to 460 nm, channel 3 from 460 to 588 nm, channel 4 from 588 to 692 nm, channel 5 from 692 to 884 nm, and channel 6 from 884–1042 nm. The spectral resolution is <0.1 nm for UV to VIS and <0.12 nm for VIS to NIR. Our system does not allow one to perform measurements with inert atmosphere. However, all experimental conditions were constant, which reinforces that the variations of the elements are relative only to the sample, without interference of the atmosphere. A lab-made computer function for Matlab R2015b (MathWorks, Natick, MA, USA) was applied to generate scores maps. Before the calculation, the data set was normalized and mean-centered. Then, the maps were represented by a four-dimensional (4D) tensor composed of the number of mapped points × principal components × number of pulses in the horizontal position × number of pulses in the vertical position. After the calculations, the output data were as follows: (i) scores represented by 5 pulses × 400 mapped points (20 horizontal × 20 vertical) × 10 principal components; (ii) loadings with 5 pulses × 12,288 × 10 principal components, where 12,288 is related to the number of variables of the spectral range of the LIBS instrument from 186 to 1042 nm; and (iii) explained variance for the principal components.

WD XRF measurements. The WDXRF experiments were performed using an ARL Perform'X WDXRF spectrometer (Thermo Scientific, Madison, WI, USA). This equipment is provided with a rhodium X-ray tube that can be operated at a maximum power of 4200 W. The measurements were performed under vacuum environment, with a beam collimation of 29 mm and analyzer LiF 200 crystal (from 0.176 to 3.889 Å, 0.01 Å resolution).

Results and Discussion. The textile fabrics were difficult to analyze by means of a digestion procedure. Commercial fabrics are mostly composed of synthetic fibers, such as long chain polymers, including cellulose, polyester, acrylic, nylon, and polythenes [13]. They are mainly composed of complex structures with covalent bonds between C, H, O, N, and S [14].

A woven fabric is industrially manufactured by means of interlacing threads. The chemical composition and interlacing process are related to the mechanical and end-use purposes of the product [15].

In textile fibers, the dyeing process is relevant to the appearance of the end-product. Final consumers are not interested in having discoloration issues caused by washing or sweat, for example. The contents of dyes are diversified and include diazo, triazo, or metallic complex chemical groups [16]. In this context, the determinations carried out with ICP OES, independent of the range of the analytical curve, did not have good performance because the concentration values were below the limits of detection. The final acidities of the solutions were very high; consequently, the samples had to be diluted 10-fold for adjustment of the acidity to 10%, which fatefully caused losses for the initial composition. For the sweat procedure, the total solid content of the samples was high, and thus, the samples were diluted 2-fold to obtain 2% of solids content maximum. These facts show the advantage of the LIBS in comparison of ICP OES since the interaction of the laser with the solid sample did not promote any losses for this case.

To overcome these issues, analytical techniques that allow high spatial resolution are used to screen the surface and depth of solid samples, such as woven fabric. LIBS has been shown to have good agreement between the mapping and sensitivity to detect atomic and ionic emission lines for a wide number of inorganic elements as well as some organic ones [7–10].

The information from LIBS spectra is very rich, with several emission lines in a wide range from the ultra-violet region to the beginning of the near infrared. Each spectrum generated by LIBS shows a fingerprint, as well as a certain degree of complexity, which confers, in most cases, a challenge that univariate analysis, as a unique method of data evaluation, cannot circumvent [17].

Another important point is that in the case of solid matrices, the construction of an analytical calibration curve is a difficult task. It is not always feasible to use a certified reference material that is compatible with the analytical matrix under investigation. In addition, reference material related to woven fabric is not commercially available. Moreover, it is important to note that the vast majority of certified reference materials have certified values for masses of the order of 100 mg. This fact constitutes a limitation for LIBS because the ablated masses are in micrograms [18].

Thus, a feasible alternative with a good success rate for the treatment of LIBS signals is the use of multivariate methods, such as scores maps [10, 19]. Evaluation of LIBS spectra by means of scores maps was useful to study the interaction of the laser with the surface and deep layers of the fabric. The information from the chemical maps generated by the scores provided a single 2D plot for surface (first laser pulse) and deep layers of the samples (up to second to fifth laser pulse) in a specific mapped area, which is proportional to a qualitative evaluation of the chemical variations in the sample content. The selection of the mapped area in the sample should be representative taking into account the heterogeneity of the sample analytical matrix.

The possibilities of mapping for a piece of woven fabric are many. The instrument was able to map the surface, including the number of lines and points with distances, according to the type of requested information. Each pulse provided different information. The first pulse provided details about the area visualized by the naked eye, which is the surface of the woven fabric sample. According to how the laser is pulsed on samples, deeper information regarding the composition was detected from the second through fifth pulses. This premise was verified for most of the samples according to Fig. 1. As shown in Fig. 1, the scores maps furnished the distribution of the values related to the chemical information of the emission lines from LIBS and the combinations between them, including the loadings, relative to the presence of chemical elements in these solid samples. Atomic lines are represented in black color with the symbol (I) and ionic lines denoted as (II) were highlighted in orange color. The loadings value represents the most influence variables (elements) from the LIBS spectra to chemical distribution in the scores maps.

The positive values of scores are correlated with positive values of loadings and vice versa for negative values. The emission lines of the elements assigned in the loading plots of Fig. 1c,f,i,l showed more relevant chemical information for the scores maps.

The loading plots showed inorganic and organic emission lines, indicating the presence of many elements in the woven fabric samples. The combination of information between the scores and loadings showed negative values for scores related to inorganic elements for samples denoted as V03, L01, and N01 (Fig. 1c,f,i), respectively. As an example, sample V03 (Fig. 1a) is composed by two different structures. The golden part presented negative scores values (Fig. 1b) and was related to negative loadings values (Fig. 1c) with the presence of the following elements: Al, Ca, Co, Cu, Fe, K, and Na. In all cases, special attention should be paid to the inorganic emission lines for Si, Fe, Co, Ti, Cu, Ca, and Mg, which are the constituents of dyes responsible for color patterns. The only exception was sample N02 (Fig. 1j), where the organic emission lines represented by negative loading values (Fig. 1l) were associated with a white color. Further information regarding the scores maps for the three remaining samples is shown in Fig. S1.

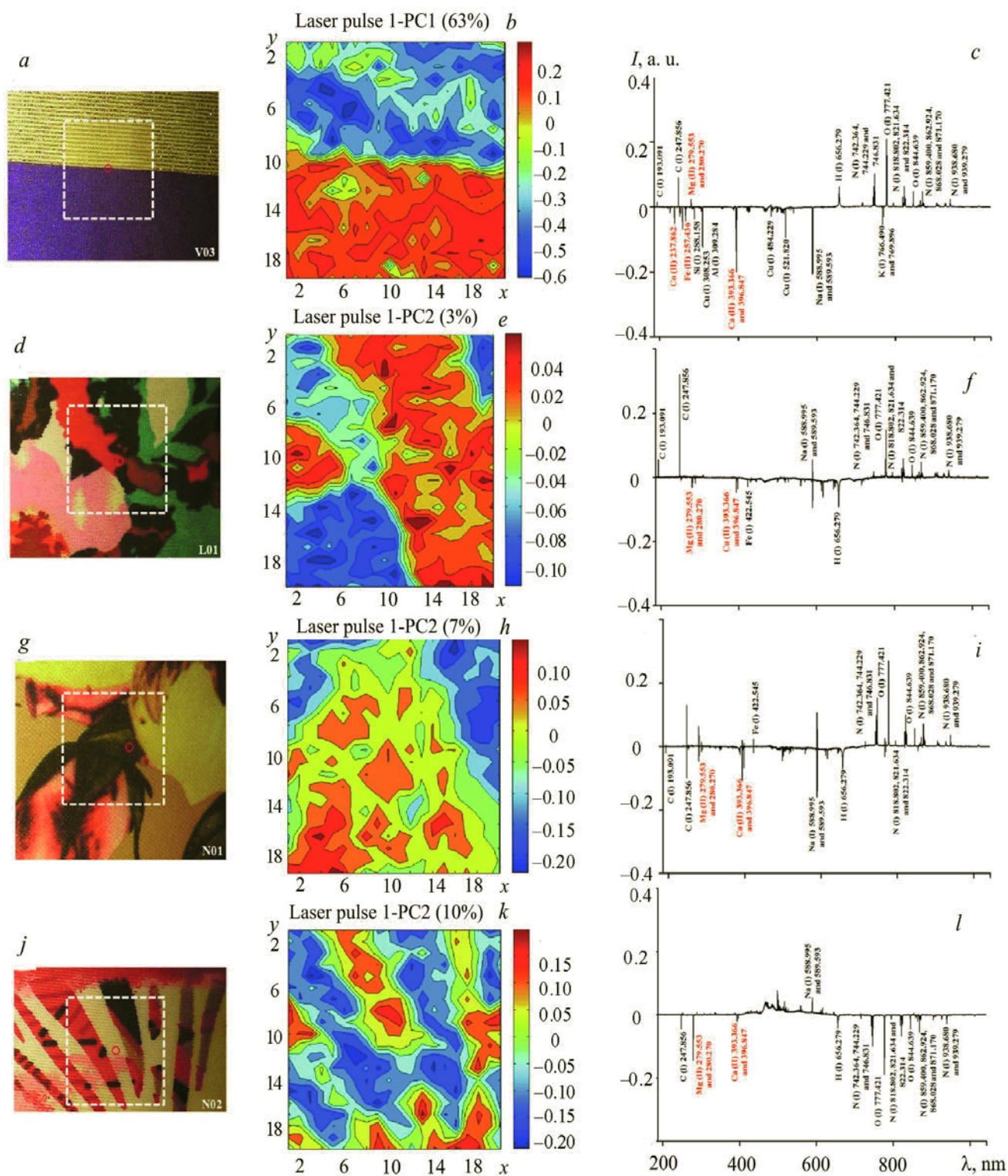


Fig. 1. Woven fabric samples V03, L01, N01, and N02 (a, d, g, j) investigated with LIBS along with their respective scores maps (b, e, h, k) and loadings (c, f, i, l). The white dotted square in parts a, d, g, and j represents the ablated area.

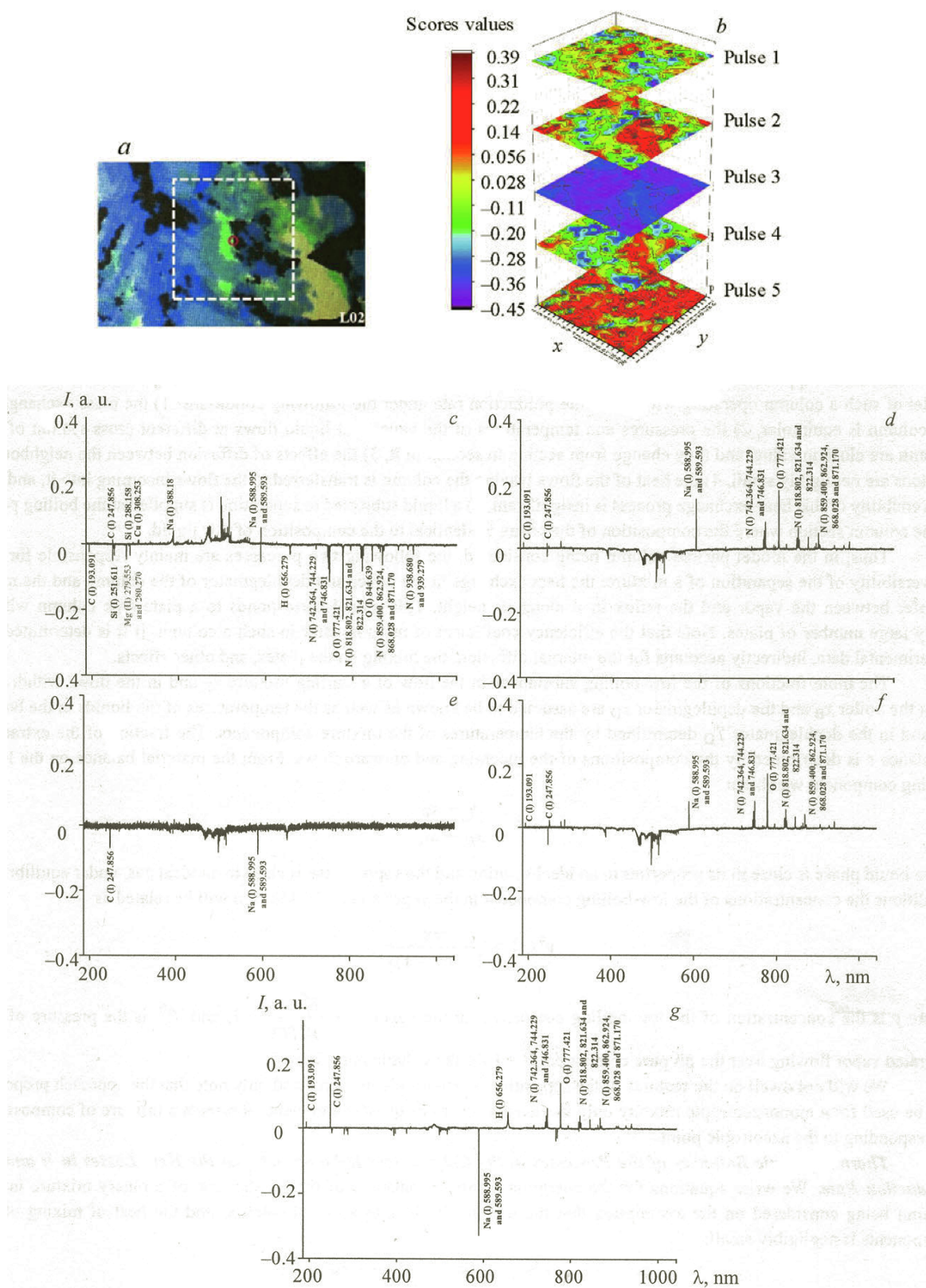


Fig. 2. Liganete woven fabric L02 (a) investigated with LIBS along with the generated scores maps (b) and loadings (c–g) for the first to the fifth pulses, respectively, with PC2 (7% of explained variance). The white dotted square in part a represents the ablated area.

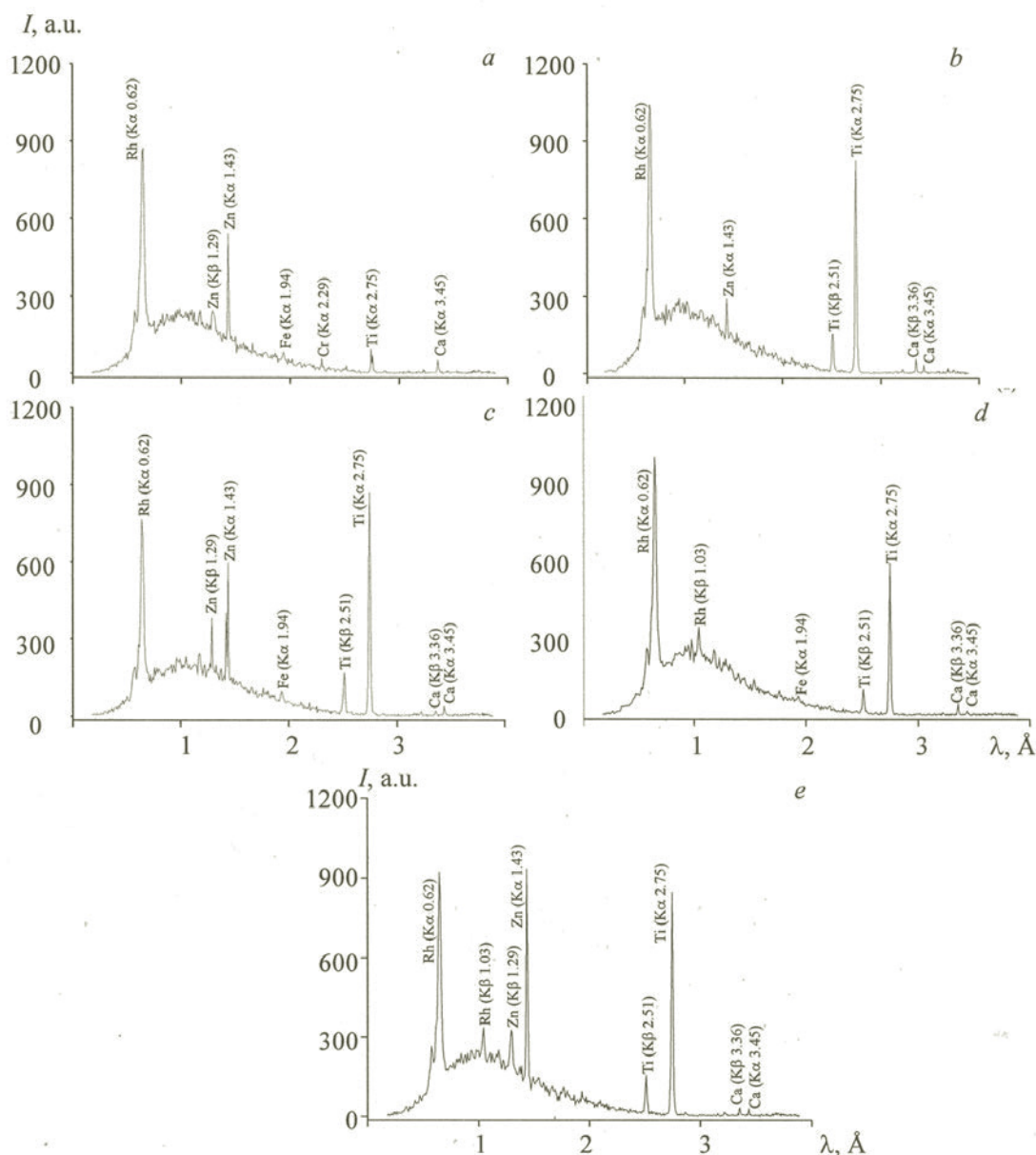


Fig. 3. WD XRF data with the most intense emission for the elements detected in woven fabric samples directly denoted as V03 (a), L01 (b), N01 (c), N02 (d), and L02 (e).

Positive scores were also related with the darker color areas of the woven prints, as shown in the maps of Fig. 1, and this can be verified for the remaining samples in the Supplementary Information. The only sample that was identified in the third pulse was more relevant for sample V04, as these fibers were thicker and rougher to the touch than the other samples, which is shown in Fig. S1h. These findings, in combination with the results of the LIBS and maps, were effective in verifying chemical differences among the dyes and fibers. Figure 2 indicates that the chemical composition can be exploited after each laser pulse focused on the same point. The variations were clearly identified because the dye composition was detected until pulse 2 (Fig. 2b), where the organic and inorganic lines were detected and their magnitudes were higher than others (Fig. 2c–g). After pulse 3, the fiber composition was verifiable because of the presence of the emission line for C (I) at 247.856 nm and the decrease of Na (I) at 588.995 and 589.593 nm, as shown in Fig. 2e.

WD XRF measurements were made directly in the woven fabric samples, and some representative spectra are shown in Fig. 3 and Fig. S2 in order to corroborate the LIBS data. From the spectra is observed the presence of K_α -fluorescence lines for Ti (2.75 Å) and Ca (3.45 Å) for all analyzed samples. The elements Zn (K_α 1.43 Å and

K_{β} 1.29 Å) and Fe (K_{α} 1.94 Å) were detected simultaneously for samples V03 (Fig. 3a), N01 (Fig. 3c), and V02 (Fig. S2b). Chromium fluorescence line (K_{α} 2.29 Å) was verified for sample V03. The scattering from Rh source (K_{α} 0.62 Å and K_{β} 1.03 Å) showed high intensity because of the influence of light elements, such as C, H, and O, on the composition of the woven fabrics.

For instance, Si, Cu, and Co were associated with purple color in compounds $\text{BaCuSi}_2\text{O}_6$ and cobaltous orthophosphate. Silicon was also linked to ultramarine ($\text{Na}_{8-10}\text{Al}_6\text{Si}_6\text{O}_{24}\text{S}_{2-4}$), which is responsible for the blue color as well, as Cobalt Blue and Cerulean Blue [cobalt (II) stannate]. Copper and Fe produced a blue color by means of synthetic pigments of Calcium copper silicate ($\text{CaCuSi}_4\text{O}_{10}$), known as Egyptian Blue, and $\text{BaCuSi}_4\text{O}_{10}$, known as Han Blue. The yellow color can be linked to the yellow ochre of Monohydrated ferric oxide ($\text{Fe}_2\text{O}_3 \times \text{H}_2\text{O}$) and titanium yellow. The red color is the result of iron oxide pigments, such as red ochre (Fe_2O_3). Titanium white is applied to obtain the white color. Cobalt, Cu, and Mg are constituents of green pigments. Iron and Si are part of raw umber, a natural pigment. The black color is generated by compounds from Ti [titanium black (Ti_2O_3)] and Fe [iron black (Fe_3O_4)] [20].

Conclusions. The screening performed in this study can help to evaluate issues regarding the environmental impact and/or to avoid allergic conditions to toxic waste with minimal sample preparation. The scores maps were effective for evaluating each delimited region of woven fabric since each contour included color variations that were reflected in the chemical composition. The LIBS emission lines and the ability to compare the information from the surface and deeper layers were relevant to determining the main compositions of the dyes and fibers, including the pattern of the interlocking fibers. This study can also be used for forensic analysis of fabric material.

Acknowledgments. This research was supported by the São Paulo Research Foundation (FAPESP, Process 2016/00779-6), the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Process 445729/2014-7), International Association for the Exchange of Students for Technical Experience (IAESTE, C. Dai grant fellowship) and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, M. C. Santos grant fellowship). Special thanks to Daniel Fernandes de Andrade and Lucimar Lopes Fialho for helping during the mineral extraction procedures. The authors are grateful to Analítica and Thermo Scientific for the loan of the ICP OES, WD XRF and microwave oven instruments.

REFERENCES

1. <http://www.desenvolvimento.gov.br/sitio/interna/interna.php?area=5&menu=1161>, accessed July, 2016.
2. J. Lademann, A. Patzelt, M. Worm, H. Richter, W. Sterry, and M. Meinke, *Laser Phys. Lett.*, **6**, 759–763 (2009).
3. D. S. Brookstein, *Dermatol. Clin.*, **27**, 309–322 (2009).
4. I. Jäger, C. Hafner, and K. Schneider, *Mutat. Res.*, **561**, 35–44 (2004).
5. C. J. Lord and A. Ashworth, *Nature*, **481**, 287–294 (2012).
6. I. Rezic and I. Steffani, *Microchem. J.*, **85**, 46–51 (2007).
7. J. El Haddad, L. Canioni, and B. Bousquet, *Spectrochim. Acta B*, **101**, 171–182 (2014).
8. J. Kaiser, J. Novotný, M. Z. Martin, A. Hrdlička, R. Malina, M. Hartl, V. Adam, and R. Kizek, *Surf. Sci. Rep.*, **67**, 233–243 (2012).
9. D. F. Andrade, E. R. Pereira-Filho, and P. Konieczynski, *J. Braz. Chem. Soc.*, DOI: 10.21577/0103-5053.20160236.
10. R. R. V. Carvalho, J. A. O. Coelho, J. M. Santos, F. W. B. Aquino, R. L. Carneiro, and E. R. Pereira-Filho, *Talanta*, **134**, 278–283 (2015).
11. E. A. Menezes, R. Carapelli, S. R. Bianchi, S. N. P. Souza, W. O. Matos, E. R. Pereira-Filho, and A. R. A. Nogueira, *J. Hazard. Mat.*, **182**, 325–330 (2010).
12. ISO (International Organization for Standardization), ISO 3160/2 Watch Cases and Accessories; Gold Alloy Coverings. Part 2. Determination of Fineness, Thickness Corrosion Resistance and Adhesion, ISO, Geneva (2003).
13. A. R. Horrocks and S. C. Anand, *Handbook of Technical Textiles*, CRC Press, Boca Raton (2000).
14. H. U. Jinlian, *Structure and Mechanics of Woven Fabrics*, John Wiley & Sons, Chichester (2000).
15. B. K. Sirkova, *AUTEX Res. J.*, **12**, 40–43 (2012).
16. C. C. I. Guaratini and M. V. B. Zanoni, *Qui. Nova*, **23**, 71–78 (2000).
17. G. A. Galbács, *Anal. Bioanal. Chem.*, **407**, 7537–7562 (2015).
18. D. A. Cremers and L. J. Radziemski, *Handbook of Laser-Induced Breakdown Spectroscopy*, 2nd ed., John Wiley & Sons, Chichester (2013).
19. R. L. Carneiro and R. J. Poppi, *Spectrochim. Acta, A*, **118**, 215–220 (2014).
20. N. N. Mahapatra, *Textile Dyes*, CRC Press, Boca Raton (2016).

Supplementary Information

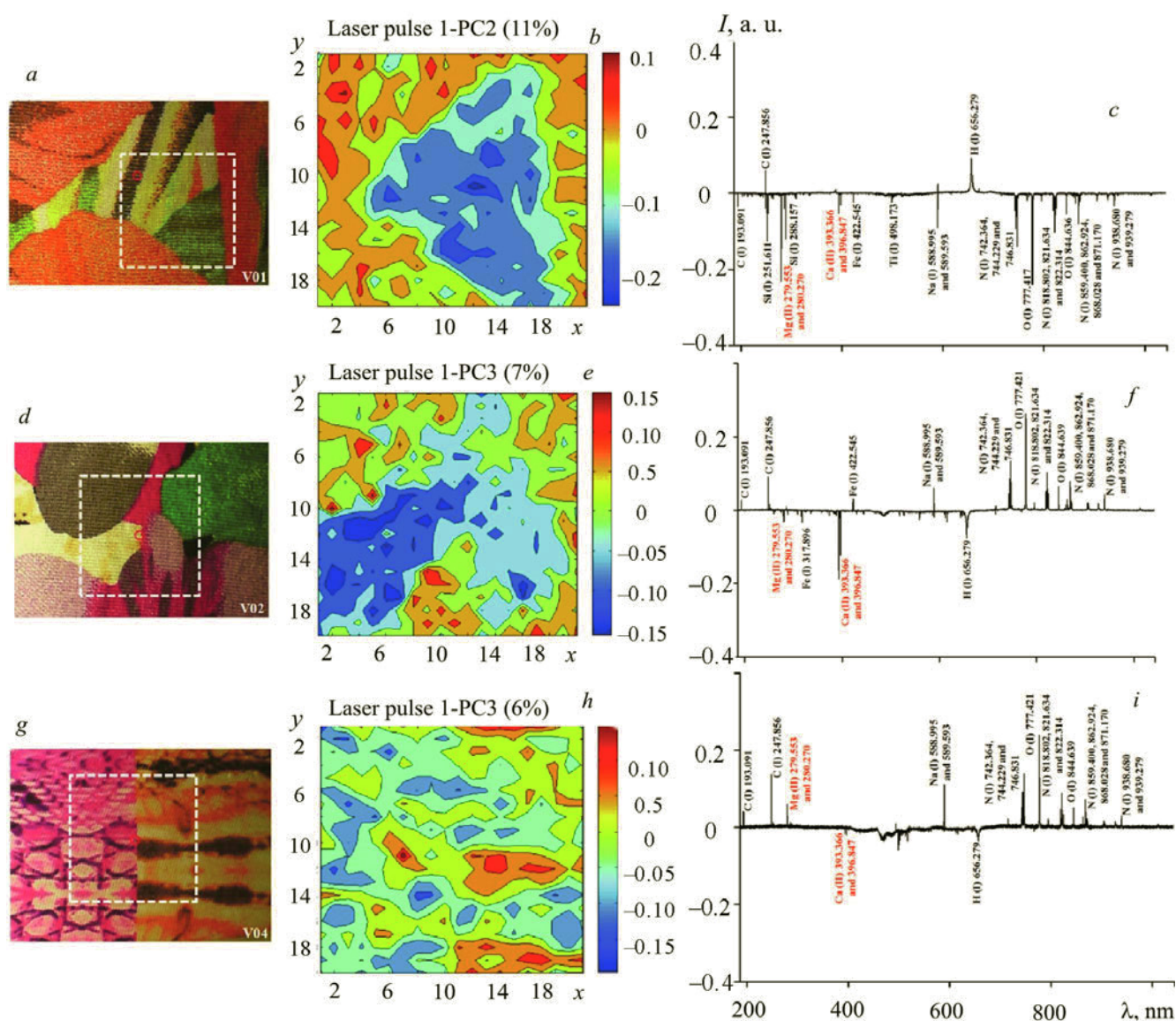


Fig. S1. Three different samples of commercial woven fabrics V01, V02, and V04 (a, d, g) as well as their respective scores maps (b, e, h) and loadings (c, f, i). The white dotted square in parts a, d, and g represents the ablated area.

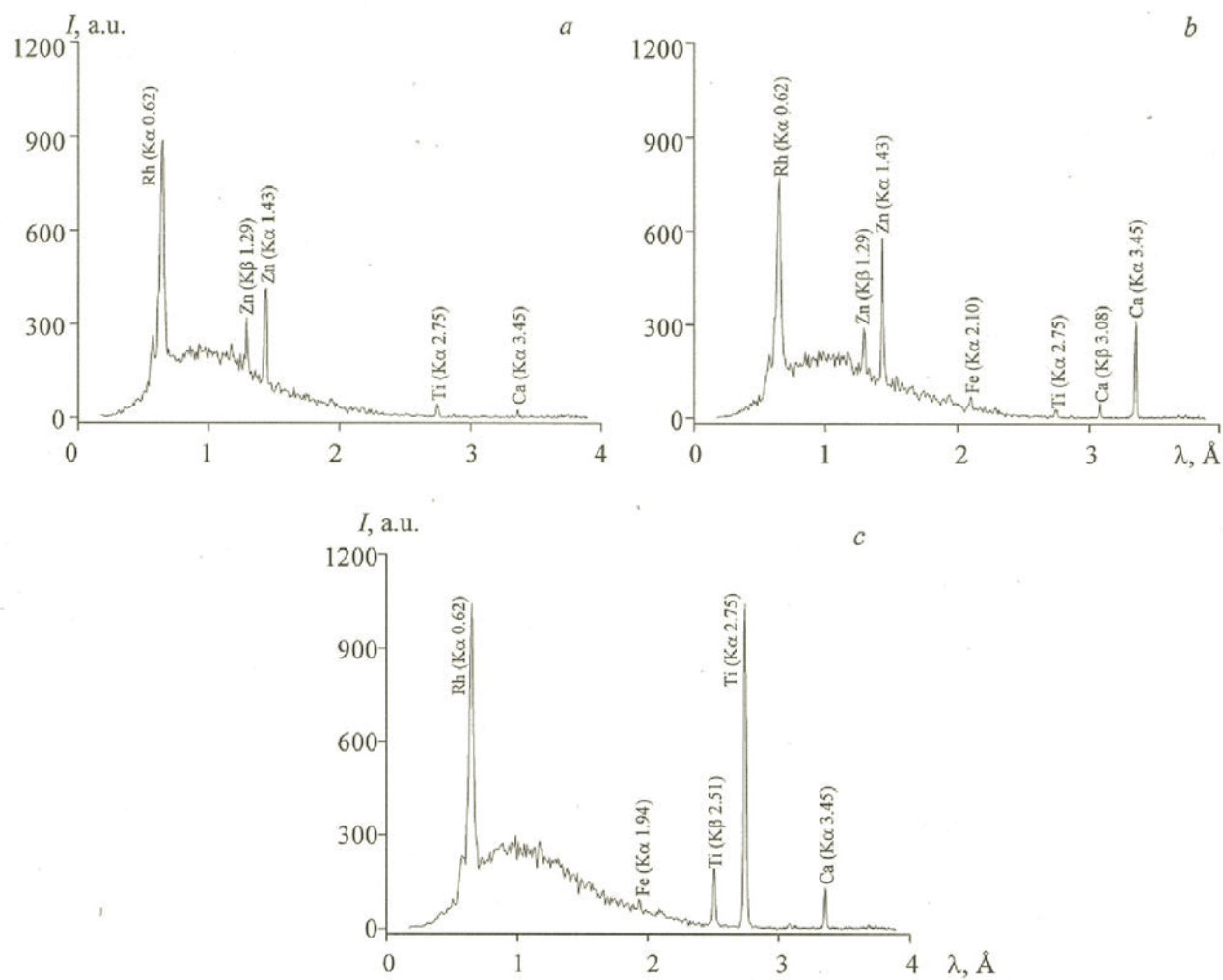


Fig. S2. WD XRF spectra acquired for commercial woven fabrics denoted as V01 (a), V02 (b), and V04 (c).