

TATIANA PEREIRA SARTORI

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS DE ANÁLISE DE CABELO POR
MALDI-TOF-MS E MALDI-MSI E AVALIAÇÃO DE TRATAMENTOS
COSMÉTICOS**

São Carlos

2024

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Assinatura:

Data:

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC

Sartori, Tatiana Pereira

Desenvolvimento de métodos de análise de cabelo por MALDI-TOF-MS e MALDI-MSI e avaliação de tratamentos cosméticos / Tatiana Pereira Sartori. — São Carlos, 2024.

119 f.

Dissertação (Mestrado em Química Analítica e Inorgânica) — Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2024.

Edição revisada

Orientador: Prof. Dr. Emanuel Carrilho

1. MALDI-MSI. 2. MALDI-TOF-MS. 3. Cosméticos. 4. Óleos vegetais. 5. Cuidados com o cabelo. I. Título.



TATIANA PEREIRA SARTORI

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS DE ANÁLISE DE CABELO POR
MALDI-TOF-MS E MALDI-MSI E AVALIAÇÃO DE TRATAMENTOS
COSMÉTICOS**

Dissertação de Mestrado, do Programa de Pós-Graduação em Química (Área de Concentração: Química Analítica e Inorgânica) apresentado ao Instituto de Química de São Carlos - Universidade de São Paulo

Orientador: Prof. Dr. Emanuel Carrilho

São Carlos

2024

Lista de abreviações

18-MEA	ácido 18-metileicosanoico
ABS	acrilonitrila butadieno estireno
ACN	acetonitrila
AGA	alopecia androgenética
ANOVA	análise de variância
ANVISA	agência nacional de vigilância sanitária
BSA	albumina de soro bovino
DAG	diacilglicerol
DHB	ácido 2,5-dihidroxibenzóico
DHT	diidrotestosterona
DNA	ácido desoxirribonucleico
EMA	agência europeia de medicamentos
FAMEs	ésteres metílicos de ácidos graxos
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FT-ICR	ressonância ciclôtrônica de íons com transformada de Fourier
GC-FID	cromatografia gasosa com detector por ionização em chama
GC-MS	cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
HCCA	ácido α -ciano-4-hidroxicinamico
INCA	instituto nacional de câncer josé alencar gomes da silva
ITO	óxido de índio-estanho
LC-MS	cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas
LESS	lauril éter sulfato de sódio
MeOH	metanol

MEV	microscopia eletrônica de varredura
MS	espectrometria de massas
PCA	análise de componentes principais
PDMS	poli(dimetilsiloxano)
SIMS	espectrometria de massas por íon secundário
SoHT	<i>Society of Hair Testing</i>
TFA	ácido trifluoroacético
TFANa	trifluoroacetato de sódio
TAG	triacilglicerol
THC	tetrahidrocanabinol
THF	tetrahidrofurano
UNODC	<i>United Nations Office on Drugs and Crime</i>

Lista de figuras

- Figura 1. Diagrama esquemático representando as principais camadas de um fio de cabelo: a cutícula e suas subdivisões, o córtex e a medula. Fonte: Adaptado de PHILIPSEN et al., 2021 20
- Figura 2. Cisteína (a) e seu dímero, cistina (b). Fonte: Autoria própria 21
- Figura 3. Principais interações entre cadeias laterais de aminoácidos que compõem a haste capilar. Fonte: Autoria própria 22
- Figura 4. Diagrama esquemático das possíveis vias de incorporação de compostos na haste capilar: a partir da corrente sanguínea, pelo suor e sebo produzido por glândulas e através de contato externo. Fonte: Autoria própria. 28
- Figura 5. Esquema do equipamento MALDI -TOF e seu funcionamento básico. 34
- Figura 6. Esquema de funcionamento do LIFT em MALDI-TOF/TOF. Fonte: Autoria própria 38
- Figura 7. Fluxo de trabalho básico para experimentos de imageamento por MALDI. Fonte: Autoria própria. 39
- Figura 8. Raspagem do fio de cabelo para secção longitudinal utilizando uma lâmina perpendicular. Fonte: Autoria própria. 45
- Figura 9. Corte longitudinal do fio de cabelo utilizando uma lâmina inclinada. Fonte: Fonte: Autoria própria. 46
- Figura 10. Esquema de corte longitudinal de fios de cabelo utilizando um bloco metálico com ranhuras. Fonte: Autoria própria 47
- Figura 11. Mechas de cabelo compostas por: A) Fios lisos e descoloridos; B) Fios lisos e naturais e C) Fios cacheados e descoloridos. Fonte: Autoria própria. 50
- Figura 12. Instrumento produzido para corte dos fios de cabelo previamente fixados na lâmina ITO: a) Peça superior impressa em 3D, usada para fixar a lâmina metálica do micrótomo; b) Peça inferior impressa em 3D com área de encaixe para a lâmina ITO; c) Peça inferior produzida em acrílico com área de encaixe para a lâmina ITO. Fonte: Autoria própria. 54

- Figura 13. Aparato para corte longitudinal dos fios de cabelo. a) Peças do suporte de fixação da lâmina de micrótomo com ângulo de 20°; b) Aparato montado com a lâmina fixa; c) Bloco de alumínio com ranhuras de 40 e 50 μm . d) Esquema do corte longitudinal do fio de cabelo. Fonte: Autoria própria 55
- Figura 14. Esquema da fixação dos fios na lâmina ITO com a) fita dupla face sob os fios e b) fita de face simples sobre extremidades dos fios. Fonte: Autoria própria. 56
- Figura 15. Espectro MALDI-TOF de alíquotas das últimas etapas de limpeza do fio de cabelo tratado com óleo de abacate, sendo em azul o procedimento 10x em 5 mL de MeOH em ultrassom + 18h em 5 mL de MeOH, em verde 10x em 5 mL de MeOH e em vermelho 2x em 5 mL de diclorometano, na região de m/z entre 500 e 1100. Fonte: Autoria própria. 60
- Figura 16. Espectro obtido por MALDI-TOF do lauril sulfato de sódio na faixa de m/z entre 300 e 800 Fonte: Autoria própria. 61
- Figura 17. Espectro MALDI-TOF na região de m/z 500 a 1080 de uma alíquota da última etapa de limpeza dos fios de cabelo (verde) e de uma solução aquosa de LESS utilizada no procedimento de lavagem. Fonte: Autoria própria. 62
- Figura 18. Cabelo fixado em parafina após tentativa de corte no micrótomo. Fonte: Autoria própria. 63
- Figura 19. Imagem dos fios de cabelo após procedimento de descoloração com Fonte: Autoria própria. peróxido de hidrogênio e limpeza, com aumento de 20x no microscópio ótico, na qual correspondem a) ao fio intacto e b) ao fio cortado longitudinalmente. 64
- Figura 20. Análise do corte dos fios de cabelo natural e cacheado descolorido por MEV, sendo: A) Fio descolorido (150x), B) Fio descolorido (700x); C) Fio natural (150x) e D) Fio natural (700x). Fonte: Autoria própria. 65
- Figura 21. Comparação entre espectros MALDI-TOF do óleo de abacate utilizando para azul os parâmetros estabelecidos no início dos experimentos, em verde os parâmetros iniciais sem a fita sobre a amostra e em vermelho os parâmetros otimizados. Fonte: Autoria própria. 68

- Figura 22. Análise de componentes principais utilizando a faixa de m/z entre 1280 e 1400 para o padrão de Angiotensina I. Fonte: Autoria própria. 70
- Figura 23. Comparação dos espectros MALDI-TOF do padrão de Angiotensina I aplicado diretamente na lâmina ITO (preto) e sobre as fitas ARcare (vermelho), Adelbras (azul), alumínio (verde) e ARclad (rosa) e seus respectivos valores de m/z . Fonte: Autoria própria. 72
- Figura 24. Esquema do uso do éter 18-coroa-6 e TFA para captura dos íons K^+ e Na^+ , favorecendo a protonação do analito de interesse (DAG E TAG). Adaptado de TONIN et al., 2017. 75
- Figura 25. Espectros das análises dos óleos por injeção direta no ESI-LTQ, utilizando éter 18-coroa-6, dos quais A) óleo de abacate (m/z 80-1100); B) argan (m/z 100-110) e C) coco (m/z 180-1600), com destaque para as áreas onde se encontram DAG e TAG. Fonte: Autoria própria. 76
- Figura 26. Espectro MALDI-TOF do óleo de abacate utilizando DHB (verde) e a mistura DHB/HCCA 3:1 (v/v) (preto) como matriz. Fonte: Autoria própria. 77
- Figura 27. Espectro de massas no óleo de abacate de na região de m/z 580-930, sendo em preto a análise somente do óleo utilizando DHB como matriz e em vermelho a análise do óleo, DHB e trifluoroacetato de sódio. Fonte: Autoria própria. 78
- Figura 28. Espectro de massas no óleo de argan de na região de m/z 580-1080, sendo em preto a análise somente do óleo utilizando DHB como matriz e em vermelho a análise do óleo, DHB e trifluoroacetato de sódio. Fonte: Autoria própria. 79
- Figura 29. Espectro de massas no óleo de coco de na região de m/z 450-800, sendo em vermelho a análise somente do óleo e a matriz e em preto a análise do óleo, DHB e trifluoroacetato de sódio. Fonte: Autoria própria. 80
- Figura 30. Espectros MALDI-TOF dos fios de cabelo tratados com óleo de abacate sem etapa de limpeza (verde) e após etapa de limpeza (rosa), na região de m/z entre 600 e 880. Fonte: Autoria própria. 81

- Figura 31. PCA dos espectros MALDI-TOF (m/z 350–1200; intensidade >1000 u.a.) dos cabelos tratados com os óleos de argan (vermelho), abacate (verde), coco (azul escuro) e o controle (azul claro), sendo A) fixados com fita de alumínio e B) fixados com fita ARclad. Fonte: Autoria própria. 84
- Figura 32. Espectro MALDI-TOF de 10 fios de cabelo tratados com óleo de abacate na região de m/z entre 643,5 e 650,5 A) fixados com fita de alumínio e B) fixados com fita ARclad®, para visualização dos desvios com relação a m/z entre as repetições do tratamento. Fonte: Autoria própria. 86
- Figura 33. Espectro MALDI-TOF do córtex de fibras capilares descoloridas sem tratamento (verde), tratada com óleo de argan (azul) e do óleo de argan (vermelho) na faixa de m/z entre 400 e 950 (A) e na região aproximada de m/z entre 800 e 930. Fonte: Autoria própria. 88
- Figura 34. Espectro MALDI-TOF do córtex de fibras capilares descoloridas e sem tratamento (verde), tratada com óleo de abacate (azul) e do óleo de abacate (vermelho), na faixa de m/z entre 400 e 950 (A) e na região aproximada de m/z entre 800 e 930 (B). Fonte: Autoria própria. 91
- Figura 35. Espectros MALDI-TOF de fibras capilares descoloridas, sendo em verde o controle (fibra sem tratamento), em azul tratada com óleo de coco e em vermelho espectro do óleo de coco, na faixa de m/z entre 400 e 950 (A) e na região aproximada de m/z entre 780 e 900. Fonte: Autoria própria. 93
- Figura 36. PCA dos espectros MALDI-TOF (m/z 350–1200; intensidade >1000 u.a.) dos fios de cabelo tratados com o óleo de abacate 1 dia (verde), 5 dias (vermelho) e 10 dias (azul) após o fim do tratamento. Fonte: Autoria própria. 97
- Figura 37. Espectro MALDI-TOF (m/z 350–1200; intensidade >1000 u.a.) dos fios de cabelo tratados com o óleo de abacate 1 dia (verde), 5 dias (vermelho) e 10 dias (azul) após o fim do tratamento. Fonte: Autoria própria. 98
- Figura 38. Diagrama esquemático da superfície do cabelo antes e após o processo de clareamento. Fonte: Adaptado de KOJIMA, T.; 2015. 99
- Figura 39. Espectros de fragmentação por ESI-MS2 e hipóteses de identificação de TAG. Fonte: Autoria própria. 100

- Figura 40. Espectros de fragmentação por ESI-MS2 para a hipótese do íon (A) $[M+H]^+$ em m/z 881,92 e LIFT MALDI-TOF/TOF para a hipótese do íon (B) $[M+H]^+$ em m/z 881,710 e (C) $[M+Na]^+$ em 903,754. Fonte: Autoria própria. 101
- Figura 41. Espectros de fragmentação por LIFT MALDI-TOF/TOF para o íon de m/z 609,284 (verde), m/z 609,322 (vermelho) e m/z 609,228 (azul) para fios de cabelo distintos tratados com óleo de abacate. Fonte: Autoria própria. 102
- Figura 42. Espectro médio geral de MALDI-TOF da região selecionada para aquisição da imagens para os três fios tratados e o controle. Fonte: Autoria própria. 103
- Figura 43. Imagens de MALDI-TOF nas seções longitudinais de amostras de cabelo tratadas com óleo de argan (1), abacate (2) e coco (3) e do fio de cabelo sem tratamento (controle, 4). Fonte: Autoria própria. 104
- Figura 44. Esquema da aquisição de dados de imagem por MALDI-TOF. Fonte: Autoria própria. 106

Lista de tabelas

Tabela 1.	Protocolos testados de lavagem dos fios com MeOH. Fonte: Autor, 2021.	51
Tabela 2.	Especificações das fitas Adelbras®, Alumínio, Arcare® e ARclad® utilizadas com diferentes números de camadas.	59
Tabela 3.	Proporções em m/m das matrizes DHB e HCCA avaliadas.	66
Tabela 4.	Parâmetros de aquisição de imagens no MALDI-TOF.	69
Tabela 5.	Valores médios do sinal mais intenso referente ao íon $[M^{++H}]$ referente ao padrão de Angiotensina I de diferentes fitas e com diferentes números de camadas.	71
Tabela 6.	Valor médio do sinal mais intenso do padrão (próximo de m/z 1297, referente ao íon $[M+H]^+$ do padrão de Angiotensina I), que foi depositado sobre um fio de cabelo intacto, um fio cortado e do controle.	73
Tabela 7.	Composição de ácidos graxos presentes nos óleos de argan, abacate e coco e seus respectivos desvios padrões (DP).	74
Tabela 8.	Sinais obtidos nos espectros de MALDI-TOF para os três tipos de cabelo (liso descolorido, liso natural e cacheado descolorido) seccionados após tratamento com os óleos de argan, abacate e coco e o controle (sem tratamento), com destaque em azul para os sinais que não aparecem no controle.	82
Tabela 9.	Sinais obtidos nos espectros de MALDI-TOF dos fios de cabelo tratados com os óleos de argan, abacate e coco e do controle (fio sem tratamento), fixados nas extremidades com fita de alumínio e sob os fios com fita ARclad®.	83
Tabela 10.	Sinais do início, meio e final da faixa de m/z do espectro de MALDI-TOF para as 10 repetições do tratamento com óleo de abacate, as médias de m/z de cada sinal e seus respectivos desvios padrões (DP), para fixação dos fios com fita de alumínio e ARclad.	85
Tabela 11.	Lista de massas (m/z entre 350 e 1100) dos espectros de MALDI-TOF do óleo de argan, do córtex e da superfície dos fios tratados com o óleo de argan.	89

Tabela 12. Lista de massas (m/z entre 350 e 1100) dos espectros de MALDI-TOF do óleo de abacate, do córtex dos fios tratados com o óleo de abacate e do controle, com destaque em azul para os sinais encontrados apenas no fio tratado e em vermelho para os sinais encontrados no óleo e do cabelo após tratamento. 92

Tabela 13. Lista de massas (m/z entre 350 e 1100) dos espectros de MALDI-TOF do óleo de coco, do córtex dos fios tratados com o óleo de coco e do controle, com destaque em azul para os sinais encontrados apenas no fio tratado e em vermelho os sinais referentes ao óleo encontrados no fio após tratamento. 95

Tabela 14. Sinais obtidos através dos espectros de MALDI-TOF da superfície dos fios de cabelo intactos tratados com óleo de argan, abacate, coco e o controle, fixados com fita de alumínio. 96

Resumo

A aplicação de produtos cosméticos no cabelo é uma rotina diária para milhões de pessoas, já que ele apresenta grande importância para a autoestima, higiene e bem-estar pessoal. O uso de óleos vegetais em formulações tem se destacado devido ao crescente interesse por produtos naturais. Além dos próprios componentes do óleo já oferecerem propriedades importantes para o cabelo, tais como hidratação e proteção, eles também podem ser utilizados como veículo para ativos. Um dos maiores problemas relacionados ao cabelo é a alopecia androgenética, porém ainda existem poucas opções de produtos no mercado que a tratam com eficiência. Para compreender o uso de óleos vegetais, tanto como tratamento cosmético quanto em terapias para doenças capilares (como a alopecia), é necessário verificar como a incorporação do óleo ocorre nos fios de cabelo. Sendo assim, este estudo representa um avanço pioneiro ao desenvolver um método de análise utilizando a técnica de geração de imagens por espectrometria de massas usando a ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-MSI) para visualizar a incorporação de cosméticos, com foco nos óleos vegetais de argan, abacate e coco, em amostras capilares. Inicialmente os óleos foram caracterizados por GC-MS, GC-FID, injeção direta no ESI-MS e comparação com MALDI-TOF-MS. A aplicação da técnica de MALDI-TOF-MSI permitiu avaliar a permeação dos óleos em fibras capilares, com desvio padrão máximo de 0,08 Da para 10 repetições (óleo de abacate). Nas amostras capilares tratadas com os óleos vegetais foram encontrados sinais que indicam incorporação direta de componentes desses óleos e modificações na fibra, tanto no córtex como na superfície do fio, comprovando que os óleos são incorporados ao cabelo durante o tratamento. Isso revela a eficácia do uso de óleos em formulações cosméticas e indicam que há potencial no uso desses produtos como veículos em tratamentos específicos, como na prevenção a alopecia. Com o método desenvolvido, foi possível gerar imagens da distribuição espacial dos íons no córtex capilar, confirmando os dados que apontam modificações no córtex capilar após os tratamentos.

Palavras-chave: MALDI-MSI, MALDI-TOF-MS, cosméticos, óleos vegetais, cuidado com o cabelo

Abstract

Applying cosmetic products to the hair is a daily routine for millions of people, as it is important for self-esteem, hygiene and personal well-being. The use of vegetable oils in formulations has gained prominence due to the growing interest in natural ingredients. In addition to the oil's components offering important properties for the hair, it can also be used as a vehicle for active ingredients. One of the biggest problems related to hair is androgenetic alopecia, but there are still few product options on the market that treat it efficiently. To understand the use of vegetable oils, both as a cosmetic treatment and in therapies for hair diseases (such as alopecia), it is necessary to check how the oil is incorporated into the hair. Therefore, this study represents a pioneering advance in developing an analysis method using the mass spectrometry imaging technique using matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI-MSI) to visualize the incorporation of cosmetics, focusing in argan, avocado and coconut vegetable oils. Initially, the oils were characterized by GC-MS, GC-FID, direct injection into ESI-MS and comparison with MALDI-TOF-MS. The application of the MALDI-TOF-MSI technique made it possible to evaluate the permeation of oils in hair, with a maximum standard deviation of 0.08 Da for 10 repetitions (avocado oil). In samples treated with vegetable oils, we found signs that indicate direct incorporation of components of these oils and changes in the cortex and surface of the hair, proving that the oils are incorporated into the hair during treatment. This reveals the effectiveness of using oils in cosmetic formulations and indicates that there is potential in using these products as vehicles in specific treatments, such as preventing alopecia. With the method developed, it was possible to generate images of the spatial distribution of ions in the hair cortex, confirming the data that indicate changes in the hair cortex after treatments.

Key words: MALDI-MSI, MALDI-TOF-MS, cosmetics, vegetable oil, hair care

Sumário

Lista de abreviações	IV
Lista de figuras	VI
Lista de tabelas	XI
Resumo	XIII
Abstract	XIV
Sumário	XV
Introdução	17
1. Objetivos	19
2. Revisão Bibliográfica	19
2.1. Anatomia e fisiologia do cabelo	19
2.2. Alopecia	23
2.2.1. Alopecia androgenética (AGA)	23
2.2.2. Alopecia areata	24
2.2.3. Tratamentos para alopecia	25
2.3. Mecanismos de incorporação ao cabelo	26
2.4. Tratamentos capilares	29
2.4.1. Óleos	30
2.5. MALDI-MSI	32
2.5.1. Fluxo de trabalho	38
2.5.2. MALDI-MSI em amostras capilares	41
2.5.3. Preparo das amostras	43
2.5.3.1. Lavagem dos fios	43
2.5.4. Corte longitudinal	44
2.5.4.1. Raspagem	45
2.5.4.2. Corte Manual	46
2.5.4.3. Corte com Micrótomo	47
2.5.4.4. Corte com Criostato	48
2.6. Caracterização de óleos vegetais	48
3. Materiais e Métodos	50
3.1. Coleta e armazenamento	50
3.2. Limpeza e tratamento	51
3.2.1. Procedimentos de limpeza	51
3.2.2. Tratamento com óleos	52
3.3. Desenvolvimento da metodologia de corte	53
3.3.1. Corte em criostato	53
3.3.2. Corte em micrótomo	53
3.3.3. Corte manual	53
3.4. Fixação e deposição da matriz	55
3.5. Análises dos óleos por GC-FID e GC-MS	56
3.6. Análises dos óleos por ESI-MS	57
3.7. Análises por MALDI-TOF	58
	XV

3.8.	Teste de fitas para fixação de amostra	58
	3.8.1. Análise estatística	59
4.	Resultados	60
4.1.	Lavagem dos fios	60
4.2.	Desenvolvimento da metodologia para corte dos fios	62
	4.2.1. Corte em criostato	63
	4.2.2. Corte em micrótomo	63
	4.2.3. Corte manual	64
4.3.	Fixação e aplicação da matriz	66
4.4.	Avaliação de parâmetros do MALDI	67
4.5.	Teste de fitas para fixação de amostra	69
4.6.	Análises dos óleos	73
	4.6.1. Análise dos óleos por GC-MS e GC-FID	73
	4.6.2. Análise dos óleos por ESI-MS	75
	4.6.3. Análise dos óleos por MALDI-TOF-MS	77
4.7.	Análise dos fios de cabelo por MALDI-TOF-MS	80
	4.7.1. Avaliação dos tipos de cabelo	81
	4.7.2. Comparação dos tipos de fixação	83
	4.7.3. Comparação entre os fios tratados e óleos vegetais	87
4.8.	Análises por LIFT MALDI-TOF/TOF e ESI-MS2	99
4.9.	Imageamento por MALDI-TOF	103
5	Conclusões	106
6	Referências Bibliográficas	107
Anexo I		118

Introdução

O uso de cosméticos tem se tornado cada vez mais comum no dia a dia do brasileiro, o que fez com que o país fosse considerado o quarto maior mercado consumidor do mundo do setor de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos segundo dados da Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, perfumaria e Cosméticos (ABIHPEC) em 2022, além de também estar no quarto maior consumidor em produtos para cuidado com o cabelo (ABIHPEC, 2022).

O cabelo apresenta grande importância no bem-estar e na autoestima. Segundo o Caderno de Tendências da ABIHPEC 2019-2020, o Brasil passa por um momento no qual a busca por cabelos naturais, seja ele crespo, cacheado, liso ou ondulado, tem ganhado força. O crescimento no interesse pelo uso de produtos ecologicamente corretos e a busca por ingredientes naturais destacou o uso de óleos vegetais em formulações cosméticas, pois além de atender ao apelo dos consumidores por produtos naturais, também supre a necessidade de hidratação dos cabelos naturais, principalmente os crespos (ABIHPEC, 2019). Óleos vegetais são usados diretamente no fio ou em fórmulas cosméticas como agentes condicionantes, já que possuem efeito hidratante e protetor. Além dos próprios componentes do óleo já oferecerem propriedades importantes para o cabelo, ele também pode ser utilizado como veículo para ativos (TINOCO et al., 2022).

Vale ressaltar que o cabelo não está relacionado apenas à estética, uma vez que possui outras funções como regulador da temperatura, receptor sensorial, proteção contra abrasão mecânica e radiação solar, além de ser um indicativo de doenças (DIAS DOS SANTOS, 2017). Durante a formação da fibra capilar, os elementos são incorporados permanentemente na estrutura queratinosa, sendo assim os fios de cabelo podem refletir alguns aspectos das mudanças metabólicas e fisiológicas que ocorrem à nível folicular, podendo ser usado como uma matriz biológica em diversas análises. (ADAV et al., 2018)

Um dos problemas mais populares que afetam o cabelo é a alopecia, ou queda de cabelo. O tipo de alopecia mais comum é a androgenética, que se caracteriza pela perda de cabelo progressiva, ocorrendo principalmente em homens. A comprovação da penetração de moléculas em fibras capilares e o entendimento do mecanismo de incorporação é essencial para a garantia da eficácia de tratamentos para alopecia como também para área cosmética em geral (GUMMER, 2001)

As grandes vantagens em se analisar amostras de cabelo é que ele é mais estável em comparação com outras matrizes biológicas humanas (por exemplo, sangue, urina), sendo fácil de coletar, transportar e armazenar. Além disso, sua amostragem é um procedimento não invasivo (WOŁOWIEC et al., 2013).

Os métodos convencionais para análise de amostras de cabelo são cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS). No entanto, são necessárias técnicas de preparo de amostra complexas e demoradas, que podem levar horas ou até dia. O resultado dessas análises não fornece informações cronológicas tão precisas, propiciando apenas informações baseadas na taxa média de crescimento do cabelo por mês (cerca de 12 mm/mês) (FLINDERS et al., 2017b; MIKI et al., 2011b). Além disso, requerem grandes quantidades de amostra de cabelo (10–100 mg) e muitas vezes há a necessidade de se executar protocolos de limpeza complexos e demorados (FLINDERS; BASSINDALE; HEEREN, 2019).

Ressalta-se que, apesar da evidente necessidade em se entender a ação dos cosméticos nas fibras capilares, faltam estudos na literatura sobre o tema. Uma técnica promissora para análises capilares é o imageamento por espectrometria de massas com ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-MSI), já que, além de trazer benefícios no preparo de amostras, uma vez que permite um rápido preparo com pequenas quantidades de amostra, também permite a localização espacial dos analitos na seção dos tecidos analisados. No caso de análise de cabelo, ainda pode fornecer informações cronológicas precisas sobre a incorporação de analitos ao fio com base na sua taxa de crescimento (ADAV et al., 2018).

Embora o MALDI-MSI já tenha sido empregado na análise de drogas em amostras capilares em diversos estudos científicos, esse trabalho representa um avanço pioneiro ao utilizar dessa técnica para visualizar a incorporação de cosméticos, como óleos vegetais, em amostras capilares, destacando a importância da compreensão dos processos de incorporação de substâncias em fibras capilares em tratamentos cosméticos e, também, no uso desses compostos como veículo para ativos de tratamento de doenças capilares como a alopecia.

1. Objetivos

- Desenvolver dispositivos e métodos analíticos para a análise molecular dos fios de cabelo por espectrometria de massas e técnica de imageamento;
- Avaliar a permeação de substâncias provenientes dos óleos vegetais em fibras capilares;
- Gerar imagens da distribuição espacial dos compostos de interesse no córtex dos fios de cabelo.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Anatomia e fisiologia do cabelo

A pele humana, considerada um dos maiores órgãos do corpo, é composta por duas camadas: a epiderme e a derme. Outras estruturas presentes na pele são nervos sensoriais, glândulas sebáceas, vasos sanguíneos e folículos capilares. Humanos possuem cerca de dois milhões de folículos, o que tem grande influência na saúde da pele. São nesses folículos que os fios de cabelo são formados e queratinizados, ou seja, ocorre a transformação de grupos sulfídricos em ligações dissulfeto (DIAS DOS SANTOS, 2017).

O cabelo é composto por 65 a 95% de proteínas, sendo estas compostas por 20 aminoácidos mais comuns, e 15 a 35% de água, 1 a 9% de lipídios e alguns minerais. O ciclo de crescimento capilar, em condições normais, consiste em três fases principais: anágena, catágena e telógena (DIAS DOS SANTOS, 2017).

Anágena é a fase em que ocorre a produção e crescimento da haste capilar, na qual as células epiteliais da base de um folículo se dividem, mantêm uma alta e constante taxa mitótica e ocorre a produção de pigmentos. Até 90% dos fios de cabelo podem estar nessa fase (WANG; LU; L-S AU, 2006).

A segunda fase é uma fase curta, chamada catágena, na qual ocorre uma extensa morte celular programada (apoptose) na maioria dos queratinócitos foliculares, término

da produção de pigmentos e da divisão celular e regressão do istmo e do bulbo capilar (HINDS; THOMAS, 2008).

A última fase, a telógena, é uma fase de repouso com posterior queda da haste capilar do folículo. Durante essa fase as células da papila dérmica e os queratinócitos se reativam, dando início a um novo ciclo de crescimento capilar. A nova fase anágena se desenvolve e a nova haste empurra a antiga, levando-a ao desprendimento (também citado como fase exógena) (RANDALL, 2008).

No entanto, a haste capilar é composta por três partes principais: a cutícula, o córtex e a medula (quando robusto e espesso o suficiente), como mostra a **Figura 1**.

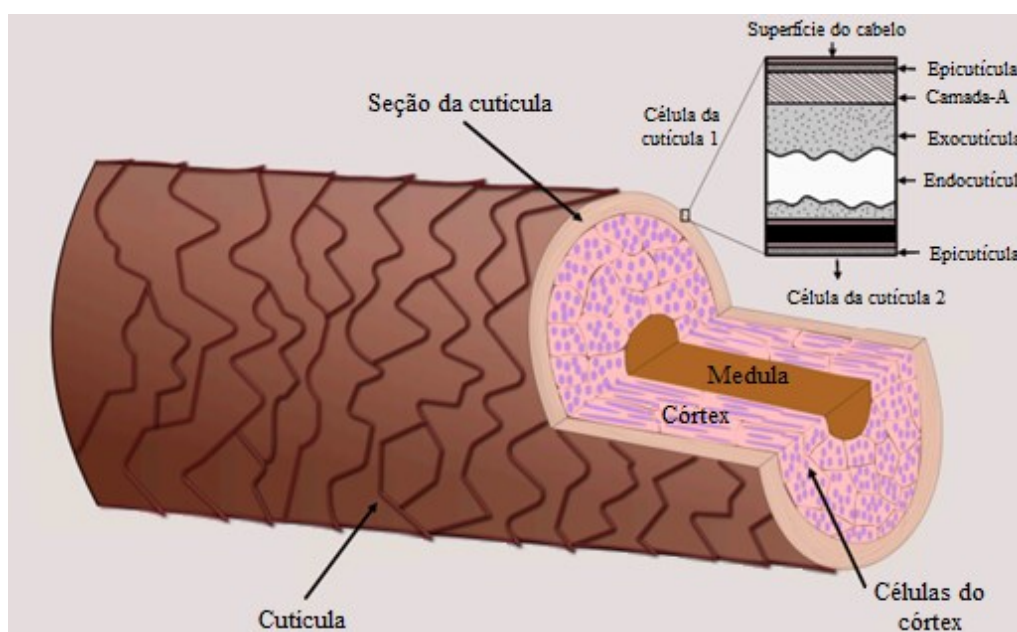


Figura 1. Diagrama esquemático representando as principais camadas de um fio de cabelo: a cutícula e suas subdivisões, o córtex e a medula. Fonte: Adaptado de PHILIPSEN et al., 2021.

A cutícula é a camada mais externa e é vital para proteger a estrutura interna de danos causados por fatores ambientais ou tratamentos cosméticos, sendo a camada mais afetada pelos componentes dos produtos capilares. Ela é formada por múltiplas camadas, cada uma com cerca de 0,5 μm de espessura (PHILIPSEN et al., 2021). Cada célula da superfície contém uma fina membrana proteica, a epicutícula, coberta por uma camada

lipídica. Abaixo existem três camadas, a camada A, a exocutícula ou camada B e a endocutícula, todas contendo proteínas fortemente reticuladas, principalmente a cistina (DIAS, 2015).

A parte interna da haste capilar é composta majoritariamente pelo córtex, que consiste em vários filamentos intermediários de queratina. As queratinas são proteínas que possuem cistina em grande proporção, as quais são formadas pela dimerização da cisteína) em condições oxidantes por meio de uma ligação dissulfeto. A **Figura 2** representa a cisteína (a) e a cistina (b).

Estas ligações cruzadas conferem muita estabilidade física e química à fibra de queratina, portanto essa é a região responsável pelas propriedades de resistência mecânica, elasticidade, além de umidade e cor ao cabelo. Uma vez que é onde se encontram os grânulos de melanina, pode ser caracterizada como eumelanina (pigmento que confere tons que variam do preto ao marrom) ou feomelanina (cores que variam do amarelo ao vermelho) (DIAS, 2015).

Quando os melanócitos, responsáveis por produzir esses pigmentos, deixam de produzi-los, a fibra perde sua coloração, dando surgimento ao cabelo branco.

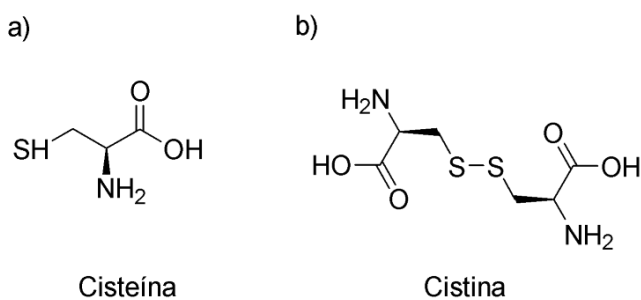


Figura 2. Cisteína (a) e seu dímero, cistina (b). Fonte: Autoria própria.

A estrutura mais interna, a medula, geralmente está presente apenas em pelos grossos, como pelos da barba, assim não apresentam relevância para o uso de cosméticos capilares (PHILIPSEN et al., 2021).

No fio de cabelo há dois tipos de queratinas, a cristalina e a amorfa (conformação não definida), sendo cerca de 30% da estrutura do cabelo cristalina e 70% amorfa. Dentro da classe da queratina cristalina, encontram-se a α -queratina (estrutura em forma de α -

hélice), presente majoritariamente no córtex e β -queratina (estrutura em forma de β -folha), localizada principalmente na região da cutícula (DIAS DOS SANTOS, 2017).

No fio como um todo, o alto teor de ligações de dissulfeto provenientes da cistina forma uma rede de ligações cruzadas, porém a interação entre as cadeias também ocorre por ligações de hidrogênio, interações iônicas e interações hidrofóbicas (**Figura 3**), o que fornece características físicas e propriedades mecânicas ao fio do cabelo.

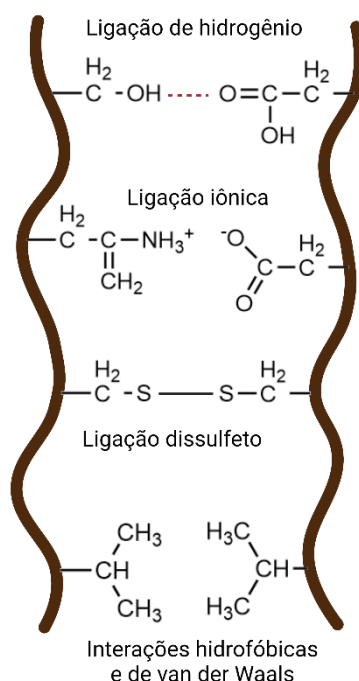


Figura 3. Principais interações entre cadeias laterais de aminoácidos que compõem a haste capilar. Fonte: Autoria própria.

Cerca de 300 proteínas do cabelo foram identificadas até a publicação do trabalho de ADAV, 2018. As queratinas capilares são resistentes e muito difíceis de solubilizar, portanto, é desafiador identificar e quantificar essas proteínas com precisão. Superar esses desafios técnicos é essencial para entender o papel biológico, a abundância e a estrutura dos compostos presentes na haste capilar em geral (ADAV et al., 2018). A análise de substâncias incorporadas ao cabelo também é de extrema importância para entender sua composição geral, as interações que podem ocorrer entre o fio e outras substâncias e até mesmo compreender problemas de saúde.

2.2. Alopecia

Um dos principais problemas quando se trata de cabelo é a alopecia, que se refere a perda de cabelo ou pelos, decorrente da disfunção ou perda de folículos capilares e alterações na produção de fibra capilar. Embora a perda de cabelo em si não cause danos à saúde física, provoca grande impacto negativo na qualidade de vida e na saúde mental dos pacientes, sendo associada a baixa autoestima, ansiedade e depressão. Portanto, distúrbios capilares são um problema significativo para muitos indivíduos (VAREJÃO et al., 2014). Esse problema, que afeta homens e mulheres, pode ser transitório ou definitivo, possuindo diferentes causas possíveis, tipos e graus.

2.2.1. Alopecia androgenética (AGA)

A alopecia androgenética (AGA), conhecida como calvície, é o tipo mais comum de queda de cabelo progressiva. Seu nome está associado à andrógenos, que são hormônios masculinos. No entanto, apesar de atingir em maior quantidade a população masculina, é uma condição genética que pode afetar tanto homens quanto mulheres (LEE et al., 2018). Nela ocorre a miniaturização progressiva do folículo piloso, levando ao afinamento dos fios. Isso é resultado de alterações na dinâmica do ciclo capilar, já que a duração da fase anágena diminui e a da fase telógena aumenta gradualmente (LOLLI et al., 2020).

A testosterona é o principal andrógeno circulante nos homens. Atinge a pele através do sangue capilar e é convertido em diidrotestosterona (DHT) pela 5- α -redutase, (enzima localizada na papila dérmica do folículo), um andrógeno mais forte que possui um papel muito importante no afinamento dos fios. Na pele, os andrógenos mais fracos, desidroepiandrosterona, sulfato de desidroepiandrosterona e androstenediona são convertidos periféricamente (em sebócitos, glândulas sudoríparas e células da papila dérmica) nos andrógenos mais potentes como a testosterona e DHT. Alterações nesses hormônios são fundamentais no desenvolvimento da doença (LOLLI et al., 2020).

Embora a relação entre DHT e a AGA masculina tenha sido constatada, o papel dos andrógenos não é bem definido na alopecia feminina, uma vez que, apenas um terço das mulheres com AGA apresentam níveis anormais de andrógenos. Para explicar os demais casos uma hipótese criada é a sensibilidade aumentada aos andrógenos, porém, a AGA também foi descrita em mulheres sem receptores de andrógenos, sugerindo que mecanismos independentes desses compostos podem estar envolvidos. (STARACE et al., 2020).

O receptor de estrogênio beta é expresso nos folículos capilares e uma evidência indireta da influência de estrogênios no crescimento do cabelo vem do aumento da prevalência da AGA em mulheres após a menopausa. No entanto, o papel do estrogênio ainda é incerto (REDLER; MESSENGER; BETZ, 2017).

Vale ressaltar que, apesar de ser uma condição genética e progressiva, é possível melhorar com a utilização de tratamentos apropriados, como medicações tópicas ou orais, laserterapia e procedimentos minimamente invasivos, que visam aumentar o número de fios de cabelo e retardar o afinamento. Uma alternativa é o transplante capilar, no entanto, apresentam alto custo e riscos como infecção local, já que se trata de um procedimento invasivo (VAREJÃO et al., 2014).

2.2.2. Alopecia areata

A alopecia areata é uma doença inflamatória autoimune que causa queda de cabelo, caracterizada por pequenas falhas circulares de cabelo ou pelos do corpo. A evolução da alopecia areata não é previsível e há casos em que a extensão da perda pode causar alopecia total, porém ela é reversível já que a doença não destrói os folículos pilosos (SIMAKOU et al., 2019).

As atividades autoimunes de células presentes no bulbo capilar, como a Th1, Th17, NK e CD8+, produzem IFN- γ que perturba o funcionamento do folículo e interrompe o ciclo de crescimento capilar, causando perda prematura e inibição do crescimento dos fios. Anticorpos IgG contra as células do folículo piloso também são encontrados em pacientes com esse tipo de alopecia. Ainda assim, a causa exata da alopecia areata é pouco compreendida, porém fatores emocionais, traumas físicos e

quadros infecciosos podem desencadear ou agravar o quadro. Além disso, a doença coexiste com outras doenças autoimunes e pode ser secundária a infecções ou inflamações (SIMAKOU et al., 2019).

2.2.3. Tratamentos para alopecia

As opções terapêuticas aprovadas pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Brasil para AGA são limitadas à poucos medicamentos (LEE et al., 2018).

A **finasterida** é um inibidor da 5- α -redutase tipo II que bloqueia a conversão de testosterona em DHT, levando a diminuição da queda capilar, aprovado pela FDA e pela Anvisa apenas para uso em AGA masculina, já que tem sido associada a malignidades mediadas por estrogênio, como câncer de mama, porque pode gerar excesso de estrogênio e devido ao efeito teratogênico (STARACE et al., 2020).

Os efeitos colaterais podem incluir dores de cabeça, náuseas, ondas de calor e diminuição da libido. A **dutasterida**, que também é um inibidor da 5- α -redutase (tipo I e II) assim como a finasterida, foi aprovada em 2022 pela Anvisa para tratamento da alopecia masculina, demonstrando uma maior eficácia se comparada a finasterida (STARACE et al., 2020; ANVISA, 2022).

O **minoxidil** (3-óxido-2,4-diamino-6-piperidinopirimidina), que tem seu uso tópico aprovado pela FDA e pela Anvisa para tratamento da AGA para homens e mulheres, é um bloqueador dos canais de potássio cujo efeito colateral é o aumento do crescimento do cabelo. O mecanismo de ação ainda não é conhecido, sabe-se que há um prolongamento da fase anágena e o aumento de folículos reduzidos. Algumas hipóteses que explicam esses fatores incluem vasodilatação e efeitos proliferativos, anti-androgênicos e anti-inflamatórios. O uso oral de minoxidil, apesar de não ser aprovado pelas agências reguladoras, é usado em alguns tratamentos com indicação médica (STARACE et al., 2020; ANVISA, 2022).

Para que o desenvolvimento de novas estratégias de prevenção ou tratamento seja bem-sucedido é necessário inicialmente compreender o crescimento capilar e a influência de produtos de uso tópico e ingeríveis no crescimento do fio, já que a incorporação de

cosméticos no cabelo ainda não é bem compreendida. Sendo assim, o primeiro passo é esclarecer os mecanismos de incorporação de compostos ao cabelo.

2.3. Mecanismos de incorporação ao cabelo

Desde a década de 90, os mecanismos de incorporação de substâncias ao cabelo têm sido investigados com o intuito de entender como ocorrem e, assim, melhorar a interpretação dos resultados de análises capilares (CONE, 1996; HENDERSON, 1993; PRAGST; BALIKOVA, 2006).

Acreditava-se que a contribuição predominantemente para incorporação de drogas no cabelo se dava pela via de difusão passiva da corrente sanguínea na base do bulbo capilar. Porém, avaliando o perfil de distribuição de **metoxifenamina**, um análogo não regulado da metanfetamina, houve alterações que indicam que existe pelo menos dois locais de incorporação no fio, o que gerou sobreposição do composto na haste capilar e prejudicou a resolução cronológica em até 11 dias ou mais (KAMATA et al., 2015).

A detecção de tilidina por MALDI-MSI provou que a contaminação externa por suor/sebo pode imitar a ingestão crônica de **tilidina**, ou seja, sua presença em todo o comprimento do cabelo não é necessariamente causada pela ingestão múltipla do medicamento (POETZSCH et al., 2015). Isso ocorre pois os ductos das glândulas sebáceas e apócrinas (sudoríparas) saem diretamente no túnel do folículo piloso, abaixo da superfície da pele, portanto, a haste capilar (exceto pelos da barba) fica em contato com as secreções até que emerja da pele (UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME, 2014).

Esses resultados indicam que exista pelo menos dois principais sítios de incorporação de medicamentos e drogas, o bulbo capilar e a parte superior da raiz capilar. Também sugerem que as vias de incorporação e perfis de distribuição de medicamentos em cabelos únicos variam consideravelmente dependendo das propriedades das substâncias de interesse (KAMATA et al., 2015).

A *United Nations Office on Drugs and Crime* (UNODC), além de propor a incorporação de produtos químicos ao cabelo por difusão passiva do sangue que abastece o folículo piloso e através do suor, sebo e da secreção de glândulas, também cita a

absorção diretamente da pele para a zona de síntese capilar e pela exposição a produtos químicos em aerossóis, fumaça ou pelo contato direto (UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME, 2014).

Usando NanoSIMS (Nano espectrometria de massas por íon secundário), a penetração e distribuição de **corantes** na cutícula do cabelo por contato direto foi investigada e descobriu-se que a endocutícula (região pobre em cistina) continha mais moléculas de corante em comparação com outras estruturas da cutícula mais ricas em cistina (camada A e exocutícula). Além disso, a investigação da penetração e adsorção de **L-teanina, quitosana catiônica e óleo de palma** no cabelo por TOF-SIMS (espectrometria de massas por íon secundário com ionização por tempo de voo) utilizando marcação com deutério, comprovou uma maior absorção em cabelos danificados pela descoloração (KOJIMA, 2015).

Esses estudos ajudam a esclarecer a permeação de compostos para dentro da haste capilar, sendo assim, podemos identificar alguns tipos de mecanismos de incorporação (**Figura 4**), que incluem: a) a incorporação através da difusão ativa ou passiva do sangue dos vasos capilares para o folículo capilar; b) a incorporação pelo contato com do suor e secreções produzidos pelas glândulas sudoríparas e sebáceas adjacentes ao fio; c) incorporação pelo contato direto com a superfície do fio; d) a incorporação através do contato com substâncias externas presentes no ambiente (DAYANNE CRISTIANE MOZANER BORDIN et al., 2015).

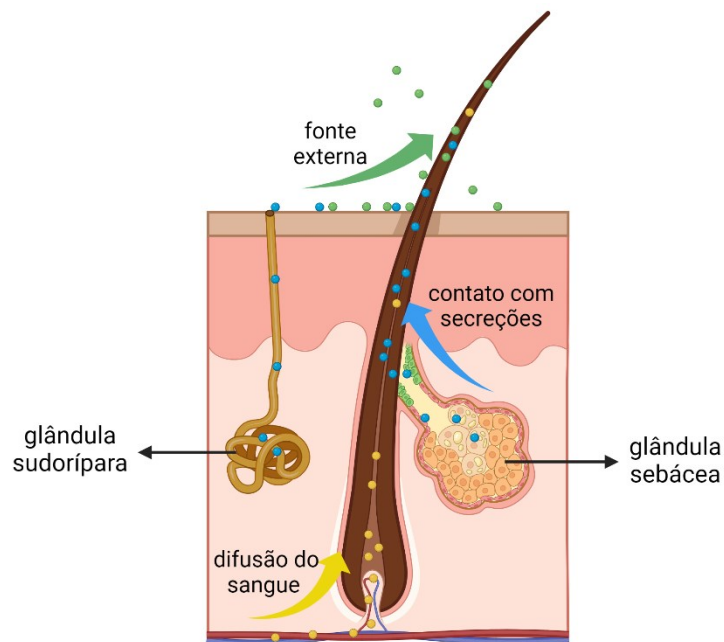


Figura 4. Diagrama esquemático das possíveis vias de incorporação de compostos na haste capilar: a partir da corrente sanguínea, pelo suor e sebo produzido por glândulas e através de contato externo. Fonte: Autoria própria.

A incorporação na estrutura do cabelo é influenciada pelas propriedades químicas e físicas dos compostos. Em geral, tamanhos menores, alta hidrofobicidade e a presença de grupos básicos ionizáveis tendem a favorecer ligações com a estrutura capilar. A **queratina** desempenha um papel de destaque com seus grupos carboxila, amina, fenol, hidroxila e sulfidril, além de múltiplas ligações de hidrogênio na incorporação de xenobióticos. Para drogas, a **melanina** é descrita como um “sítio” de ligação pois se comporta como um trocador catiônico fraco e, portanto, tende a se ligar a drogas básicas como cocaína, nicotina e anfetaminas (UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME, 2014).

Atualmente tem crescido a necessidade em se entender a ação dos cosméticos nas fibras capilares, já que os efeitos dependem do local de ação dos produtos e comprovação da incorporação dos produtos é necessária para garantir a eficiência dos tratamentos cosméticos. Porém, faltam estudos na literatura sobre o tema (DIAS SANTOS et al., 2022).

2.4. Tratamentos capilares

A aplicação de produtos cosméticos no cabelo se tornou uma importante rotina diária para milhões de pessoas, já que ele está diretamente relacionado a autoestima, bem-estar e higiene. Além da busca por aprimorar características físicas dos fios, como reconstrução, diminuição da quebra, elasticidade, cor, entre outros, cosméticos são também usados a fim de diminuir danos relacionados a luz UV, ao contato com produtos químicos e outros fatores externos (TINOCO et al., 2022).

Tratamentos capilares mais comuns são realizados através de cosméticos de uso tópico ou de ingestão oral. Produtos de ingestão oral se caracterizam por atingir o folículo capilar e o fio de cabelo pela difusão da corrente sanguínea e contato com secreções. Vitaminas para crescimento e fortalecimento capilar e remédios para alopecia podem ser consumidos dessa forma. Tratamentos capilares tópicos também podem ser realizados com medicamentos, no qual fórmulas cosméticas podem ser utilizadas como veículos para ativos como, por exemplo, no uso de **minoxidil** para tratamento de alopecia. Cosméticos de uso tópico comuns para cabelo incluem xampu, condicionador, cremes, tintas, descolorantes, alisadores, protetores térmicos, entre outros.

Houve um crescimento no interesse pelo uso de produtos sustentáveis e ecologicamente corretos, o que estimulou empresas e pesquisas a buscarem compostos naturais para uso em cosméticos capilares (TINOCO et al., 2022). As principais características desejadas pelos consumidores são de ingredientes naturais e “isentos de” sais, sulfatos, silicones, parabenos e outros componentes prejudiciais. Muitas marcas têm investido em produtos ricos em ingredientes naturais, respondendo ao desejo dos consumidores.

O cabelo é composto por células mortas e não tem capacidade de se reparar. Portanto, é importante reparar os cabelos danificados usando agentes condicionadores para evitar maiores danos ao cabelo. Considera-se que o efeito reparador de agentes condicionantes é causado pela adsorção na superfície e permeação no fio de cabelo.

Óleos vegetais são amplamente utilizados como agentes condicionantes em produtos capilares, já que possui efeito hidratante e protetor do fio, além de suprirem o desejo por “produtos verdes” (ABIHPEC, 2019).

2.4.1. Óleos

Óleos vegetais são óleos extraídos de sementes, frutas e plantas como um todo. São constituídos de uma grande variedade de compostos, como ácidos graxos livres, monoglicerídeos, diacilgliceróis (DAG), triacilgliceróis (TAG), fosfolípidios, fenóis, esteróis e carotenóides (pigmentos). Os compostos majoritários são os TAGs, uma combinação de um glicerol ligado a três ácidos graxos (CAO et al., 2021).

Por serem compostos que suprem o apelo dos consumidores por produtos naturais e, ao mesmo tempo, atendem diferentes necessidades de tratamentos capilares, como hidratação, brilho, controle de *frizz* e proteção, o uso de óleos vegetais em produtos cosméticos tem sido um destaque (ABIHPEC, 2019).

Três óleos que têm sido amplamente utilizados em cosméticos são os óleos de argan, coco e abacate. Os três também são citados como veículos em produtos que contêm óleos essenciais, já que podem prevenir a rápida volatilização e prolongar a ação desses compostos (ABELAN et al., 2022). O uso direto do óleo, fora de formulações cosméticas, também pode ser indicado como tratamento de hidratação capilar. Acredita-se que o efeito condicionante e reparador de danos ocorre devido a adsorção na superfície e permeação na haste capilar (KOJIMA, 2015).

O número de produtos cosméticos que possuem óleo de argan em sua composição aumentou significativamente. Na área farmacêutica, propriedades de prevenção de doenças cardiovasculares e obesidade chamam atenção. O óleo de argan é composto por cerca de 95% de TAG e 4% de DAG, tendo como principais ácidos graxos o oleico (O), linoleico (L), palmítico (P) e esteárico (S), em ordem decrescente. Outros compostos presentes são monoacilgliceróis, ácidos graxos livres, tocoferóis e esteróis. Como a árvore de argan é endêmica do Marrocos, o óleo é um produto caro, sendo frequentemente encontrado produtos falsificados, o que se pode determinar pela caracterização do óleo (KHARBACH et al., 2021; PAGLIUCA et al., 2018).

O abacate é nativo do México, que é o maior produtor atualmente, com mais de 100 variedades documentadas. No Brasil, segundo dados do IBGE, 338 mil toneladas dele foram produzidas em 2022, sendo 146 mil só no estado de São Paulo. Portanto, o óleo de abacate pode ser considerado um produto mais acessível quando comparado ao

óleo de argan, já que é um produto nacional e de menor custo associado (IBGE, 2023). O óleo de abacate possui excelentes qualidades para uso na indústria cosmética e alimentícia devido a riqueza de micronutrientes funcionais e vitaminas encontrados em sua composição. Seu uso é citado na produção de protetores solares, sabonetes, cremes, entre outros.

A composição do óleo de abacate pode mudar de acordo com a variedade, qualidade e maturidade da fruta, mas a quantidade aproximada de ácidos graxos monoinsaturados é de 70%, saturados é de 16% e de poli-insaturados é próximo de 13%. Os componentes minoritários são fitosteróis e lecitina (aumento de espalhabilidade), β -sitosterol, α -tocoferol (vitamina E) e outras vitaminas (D e A), luteína e compostos bioativos. Esses compostos são de grande importância pois proporcionam ao óleo propriedades relevantes para a área cosmética, como estabilidade, alta capacidade de penetração na pele, hidratação e cicatrização (STOLP; KODALI, 2022).

A demanda por óleo de coco também cresceu drasticamente devido a suas aplicações na área cosmética, na área de alimentos, lubrificantes e para produção de produtos de transesterificação, como polímeros. O óleo de coco é rico em ácidos graxos saturados de cadeias médias (6-12 átomos de carbono), sendo o ácido láurico (La) o majoritário. É composto por TAG (85%), seguido de DAG (7%), monoacilgliceróis (3%), fosfolípidios (0,2%) e ácidos graxos livres (0,13%) e bioativos naturais (FERREIRA et al., 2019). Estudos mostram que a presença de fitoesteróis e fenóis provoca efeitos antioxidante, anti-inflamatório e hipolipidêmicos.

Além dos óleos serem usados propriamente como parte do tratamento capilar, a fase oleosa pode consistir em um óleo carreador, no qual o princípio ativo está dissolvido. O uso dos óleos de argan, abacate e coco como carreadores para óleos essenciais foi citado (ABELAN et al., 2022).

O uso de nanoemulsões para tratamento tópico utilizando óleos vegetais como fase oleosa e surfactante tem sido estudado. Nanoemulsões são sistemas isotrópicos onde gotículas de tamanho nanométrico (< 200 nm) podem favorecer a penetração de medicamentos no folículo capilar. Seu uso mostrou capacidade de favorecer a absorção de minoxidil nos folículos capilares. Sua aplicação como veículo para finasterida também foi citada, mas experimentos mais detalhados são necessários para esclarecer o potencial do seu uso (GOMES et al., 2014). O óleo de coco foi utilizado em nanoemulsões contendo

extrato de uma planta conhecida como cúrcuma selvagem para desenvolvimento de cosméticos (WUTTIKUL; SAINAKHAM, 2022).

Além da penetração nos folículos capilares é importante entender também como a incorporação do óleo ocorre nos fios de cabelo para compreender seu uso como veículo e como tratamento direto (ABELAN et al., 2022). Para determinar a incorporação de compostos no fio de cabelo, faz-se necessário o uso de uma técnica que identifique e forneça a localização espacial dos analitos no interior dos fios.

O uso de espectroscopia Raman e espectroscopia no infravermelho foi testado para avaliação da incorporação de cosméticos em cabelo, mostrando que foi possível observar a permeação desses produtos para o interior da fibra capilar descolorida, apesar de permanecerem com maior concentração na região da cutícula (DIAS SANTOS et al., 2022).

Técnicas de imageamento químico também podem ser usadas a fim de entender e comprovar a absorção dos cosméticos capilares de uso tópico. A penetração da **tripalmitina**, contida no óleo de palma, em cabelos danificados foi demonstrada por TOF-SIMS. As imagens sugeriram a penetração da tripalmitina na cutícula e até 10 μm da direção do córtex, mas foi necessário utilizar tripalmitina deuterada para a confecção das imagens (KOJIMA, 2015).

A técnica de imageamento por MALDI-TOF MS pode ser utilizada com a finalidade de observar a permeação de compostos presentes nos óleos vegetais para o interior de fibras capilares, já que permite visualizar a localização espacial de compostos com alta massa molecular como metabólitos e proteínas, sendo capaz de fornecer a localização de lipídios, como os TAG, que estão presentes em grande quantidade nos óleos.

2.5. MALDI-MSI

A espectrometria de massas (MS) é uma ferramenta analítica indispensável em química, farmácia, medicina e em inúmeros campos da ciência. O princípio básico da MS é a geração de íons a partir de compostos de interesse utilizando um método adequado, separação desses íons pela razão massa/carga (m/z) e detecção qualitativa ou quantitativa

(GROSS, 2017). A cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) e a cromatografia gasosa (GC) são duas das principais ferramentas utilizadas atualmente acopladas a MS. (HORATZ *et al.*, 2018).

A investigação de moléculas de alta massa molecular e biomoléculas por MS foi possível a partir da década de 80 com a introdução de métodos suaves de ionização, como *electrospray* (ESI) e ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI). O desenvolvimento da MALDI-MS se tornou uma importante ferramenta para análise de uma ampla gama de compostos, incluindo macromoléculas de massas molares acima de 100kDa (PATIL *et al.*, 2024).

Um importante marco na espectrometria de massas, principalmente na questão da verificação espacial, foi o desenvolvimento da técnica de imageamento, inicialmente denominada Imageamento por Espectrometria de Massas (IMS - *Imaging Mass Spectrometry*) mas, devido a possível confusão a sigla utilizada para espectrometria de mobilidade iônica (IMS - *ion mobility spectrometry*), o termo mais difundido atualmente é MSI (*Mass Spectral Imaging*) (GROSS, 2017).

Apesar dos primeiros passos para o surgimento do imageamento químico utilizando MALDI em 1994, por Spengler e Kauffmann, foi apenas em 1997 que Caprioli utilizou a técnica para aquisição de imagens de biomoléculas (proteínas e peptídeos) (CAPRIOLI; FARMER; GILE, 1997; SPENGLER; HUBERT; KAUFMANN, 1994).

O MALDI-MSI realiza uma sequência de medidas na superfície de uma amostra, ao longo de uma grade predefinida, fornecendo informações dos compostos presentes em cada ponto dessa grade. A combinação dos espectros permite a criação de mapas moleculares bidimensionais (2D) ou tridimensionais (3D), como mostra o trabalho de Mallah (2018), no qual um cérebro foi dividido em várias seções, e os espectros e imagens obtidas de cada seção foram mesclados formando uma imagem 3D para visualização de mudanças lipídicas associadas a lesões cerebrais (MALLAH *et al.*, 2018).

A geração de imagens tem passado por mudanças significativas que permitiram melhora na sensibilidade de detecção e resolução espacial, contribuindo para a popularização da técnica e permitindo o mapeamento de distribuições moleculares em seções de tecido animal e vegetal (STOECKLI; FARMER; CAPRIOLI, 1999; COLE, 2017a).

Um dos analisadores mais comuns usados com MALDI é o analisador de tempo de voo (TOF, do inglês *time-of-flight*), cujo princípio é a separação de íons com diferentes m/z de acordo com o intervalo de tempo até atingirem o detector (**Figura 5**). O laser do MALDI incide na amostra, que é desessorvida junto com a matriz e ionizada. Os íons são focalizados e entram ao mesmo tempo no analisador (GROSS, 2017).

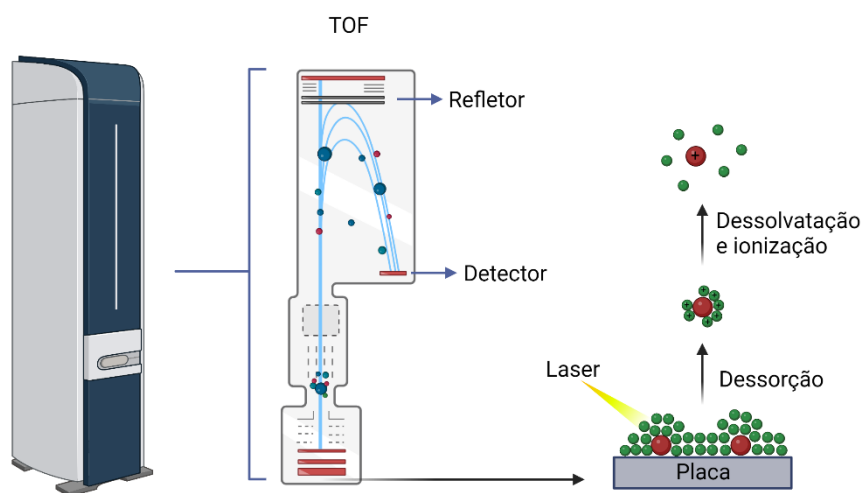


Figura 5. Esquema do equipamento MALDI -TOF MS e seu funcionamento básico.
Fonte: Autoria própria.

O refletor é utilizado para aumentar o espaço que os íons viajam até chegar ao detector, conseqüentemente aumentando seu tempo de voo. Além disso, o campo elétrico aplicado no refletor corrige uma possível diferença de energia cinética que pode ocorrer no processo de ionização para íons de mesma m/z , fazendo com que cheguem juntos ao detector. Isso permite uma separação mais eficiente e melhora a resolução de massa para íons de $m/z < 6000$ Da. Os métodos lineares, que não utilizam o refletor, possuem menor resolução de massas e maior sensibilidade e são aplicados para massas maiores (GROSS, 2017).

Outros analisadores que também podem ser utilizados são o Orbitrap ou Ressonância Ciclotrônica de Íons com Transformada de Fourier (FT-ICR), que oferecem alta resolução de massas e alta precisão (BUCK et al., 2015a). A principal vantagem no uso deles está no poder de superar as interferências de sinal de matrizes e outras impurezas, permitindo desempenho superior na análise de composto com baixa massa

molecular ($m/z < 500$). Porém, a maior limitação para o uso desses equipamentos está relacionada ao seu alto custo. Sendo assim, o custo inferior associado a alta resolução do TOF faz com que seja frequentemente utilizado desde os primeiros trabalhos sobre MS até hoje (HAN et al, 2019).

Essa técnica é capaz de visualizar e identificar diversos analitos, como drogas, metabólitos, biomarcadores e proteínas em diferentes materiais, como seções ou lâminas de tecidos animais e tecidos ou células vegetais, preservando sua localização espacial. Para isso, segue um fluxo de trabalho bem definido com algumas etapas indispensáveis para seu funcionamento adequado (BLANC et al., 2018; MACCARRONE et al., 2017; MIKI et al., 2011a; RYAN; SPRAGGINS; CAPRIOLI, 2019; STURTEVANT; LEE; CHAPMAN, 2016).

Uma grande área de aplicação da técnica é no diagnóstico de câncer em combinação com histopatologia (DJAMBAZOVA; VAN ARDENNE; SPRAGGINS, 2023). Seu uso na discriminação de regiões patológicas de biópsias câncer em glândulas salivares através perfis metabólicos e lipídicos mostraram um aumento significativo de glicerofosfolípidos nos tecidos tumorais e redução de esfingomielinas e os triacilgliceróis (SOMMELLA et al., 2022).

Na caracterização das diferenças bioquímicas entre tecido canceroso, mucosa adjacente e saudável de câncer colorretal foi possível observar assinaturas fosfolipídicas características do tecido tumoral e diferenças bioquímicas entre a mucosa saudável e o tecido saudável adjacente ao tumor, este podendo ser considerado como metaplasia (MIRNEZAMI et al., 2014). Esse tipo de estudo abre caminho para o uso de MALDI-MSI em soluções clínicas em tempo real.

A técnica também pode ser utilizada para outros tipos de diagnósticos clínicos, como na identificação e visualização da distribuição espacial de metabólitos alterados na doença de Alzheimer, na localização de neuropeptídeos vinculados a doença de Parkinson, em peptídeos expressos em lesões cerebrais de esclerose múltipla, no perfil proteico associado à resposta inflamatória durante a cicatrização de queimaduras e para a caracterização da biodistribuição espacial de medicamentos (CHEN et al., 2022; MANZANARES-MEZA; GUTIÉRREZ-ROMÁN; MEDINA-CONTRERAS, 2017)

O MALDI-MSI também é usado para avaliação de tecidos vegetais. Sua aplicação na análise da distribuição de metabólitos em morango com diferentes estágios de

maturidade indicou que antocianinas são responsáveis pela cor dos morangos, já que estão em maior abundância em morangos vermelhos e localizadas principalmente na periferia da fruta (WANG et al., 2021). Métodos para mapear alterações lipídicas em cereais com diferentes tempos de armazenamento foram desenvolvidos, no qual destacam a importância do protocolo de preparo da amostra na análise da classe de compostos (ZHANG; ZHANG; SHI, 2023). A técnica também tem sido adotada para a investigação de respostas a estresses abióticos e bióticos, mecanismos de defesa de plantas, relações simbióticas e processos como fixação de nitrogênio e ciclagem de nutrientes (BOUGHTON; THINAGARAN, 2018).

Melhorar a eficiência de ionização pode contribuir para melhorias de sensibilidade em MSI. Com essa finalidade, Soltwisch et al. introduziu a estratégia de posicionamento do laser (LPI) na fonte MALDI convencional, que usa um laser ajustável para iniciar processos secundários de ionização na fase gasosa, conhecida como MALDI-2. Este método aumentou os rendimentos de íons de metabólitos nos tecidos em até duas ordens de grandeza (SOLTWISCH et al., 2015).

A comercialização de MALDI-2 MSI juntamente com espectrometria de mobilidade iônica aprisionada (MALDI-2-TIMS-MSI) pode aumentar ainda mais a identificação molecular precisa e a sensibilidade, mostrando capacidades extraordinárias em análises metabolômicas, sendo capaz de mapear a distribuição espacial de mais de 30 espécies diferentes de esteróis em um sistema simbiótico platelmintos–algas (BIEN et al., 2021).

Estratégias para geração de imagem que abrangem mais de uma técnica são ferramentas importantes para complementar informações específicas de uma amostra. A combinação de imagens por espectroscopia Raman e por MALDI-MSI foi utilizada na avaliação de desenhos com marcador permanente e tecidos biológicos de camundongos (fígado, rim e cérebro), usando uma única amostra para as duas análises, já que Raman é uma técnica não destrutiva (CHEN et al., 2023; YANG et al., 2023).

O MALDI convencional e o MALDI-2 também foram utilizado combinado com espectrometria de mobilidade de íons aprisionados (TIMS – *Trapped Ion Mobility Spectrometry*) em busca de aprimorar a sensibilidade e especificidade no imageamento de lipídeos e metabólitos em esferóides tumorais (modelo *in vitro*) (CHEN et al., 2023). Outra abordagem de geração de imagens integrada incluiu a microscopia de fluorescência

e MALDI para monitorar *in situ* a reação da trombina com seus potenciais inibidores em um chip microfluídico de vidro ITO–PDMS. A integração de duas técnicas de detecção complementares pode melhorar a velocidade de análise, a eficiência, a sensibilidade e a precisão do método analítico (WANG et al., 2023).

Na última década, a lipidômica ganhou atenção considerável. Devido à sua sensibilidade e versatilidade incomparável, a espectrometria de massas (MS) emergiu como ferramenta identificação e detecção de lipídios. Imagens de MALDI com laser em modo de transmissão (t-MALDI) podem fornecer informações moleculares com um tamanho de pixel menor que 1 μm , o que torna este método interessante na caracterização química de tecidos e células em um nível (sub)celular (NIEHAUS et al., 2019).

O uso de pós-ionização induzida por laser no modo de transmissão (t-MALDI-2) foi adaptado a um analisador de massa Orbitrap, aumentando de forma relevante a sensibilidade e precisão na visualizando de fosfolipídios e glicolipídios no cérebro de camundongos, alcançando um tamanho de pixel de 600 nm, e aplicado também para análise de célula única (NIEHAUS et al., 2019). Para diferenciar isômeros posicionais de ligação dupla C=C na distribuição de fosfo- e glicolipídeos, um processo de derivação Paternò – Büchi foi aplicado em seções de tecido, que foram analisados por MALDI-2 com fragmentação por dissociação induzida por colisão (CID) no tecido cerebral de camundongo (BEDNAŘÍK et al., 2018).

Experimentos de fragmentação, conhecidos por MALDI-MS/MS, ou TOF/TOF no caso do analisador por tempo de voo, podem ser realizados de modos distintos, como o decaimento pós-fonte (PSD), a dissociação induzida por laser (LID) e a dissociação induzida por colisão (CID). O desejo de superar as desvantagens do PSD e de utilizar o LID em todo o seu potencial desencadeou o desenvolvimento do LIFT-TOF/TOF (SUCKAU et al., 2003), cujo esquema de funcionamento está representado na **Figura 6**. No modo LIFT, a energia cinética do íon precursor e dos fragmentos é aumentada imediatamente após a fragmentação e os fragmentos metaestáveis são reacelerados para minimizar a propagação de energia, possibilitando sua chegada ao detector em diferentes tempos de voo. Assim, todos os fragmentos são detectados (DAVE et al., 2011). Geralmente, a técnica de LIFT é utilizada combinação com outra técnica de identificação de compostos, como HPLC-MS ou GC-MS.

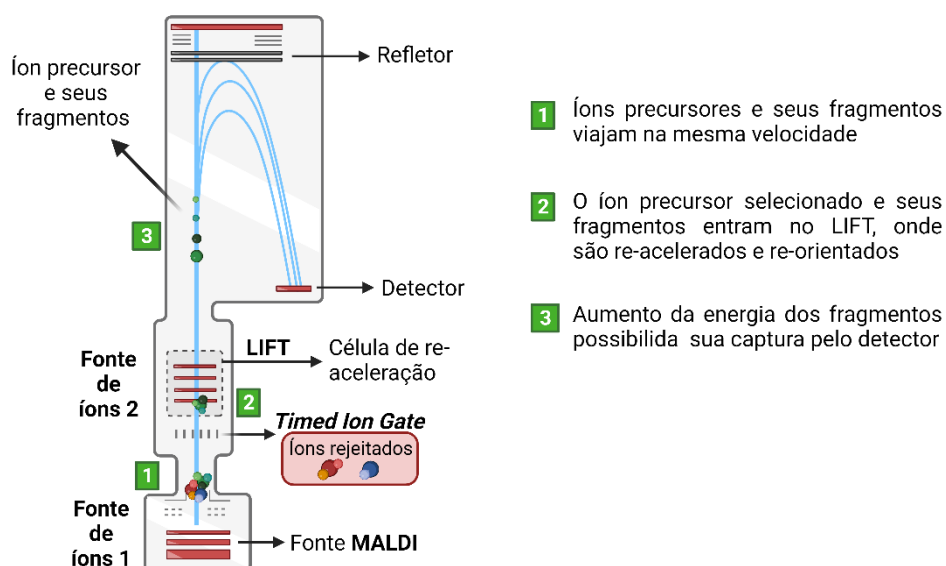


Figura 6. Esquema de funcionamento do LIFT em MALDI-TOF/TOF. Fonte: Autoria própria. Fonte: Autoria própria.

MALDI-LIFT-MS/MS foi aplicado para identificação de proteínas em cristalino do olho humano através do perfil de fragmentação e comparação com biblioteca de dados. As proteínas identificadas por foram confirmadas por LC-MS/MS, apesar do número total de proteínas identificadas por essa abordagem ser maior (RONCI et al., 2011). A análise de isômeros de fulerenos de gaiola aberta foi realizada utilizando grafite como matriz, revelando diferentes vias de fragmentação usando LIFT e permitindo a diferenciação dos isômeros (NYE et al., 2019).

2.5.1. Fluxo de trabalho

O fluxo de trabalho em MALDI-MSI consiste nas seguintes etapas: preparo de amostra, que inclui a coleta, fixação, limpeza, corte dos tecidos; escolha e deposição da matriz; aquisição dos dados; análises dos dados. A obtenção de resultados confiáveis e reprodutíveis está diretamente relacionada à boa execução do método analítico, portanto

devem ser tomados uma série de cuidados durante todo o processo, desde a coleta das amostras até o tratamento dos dados obtidos (BRUKER, 2022).

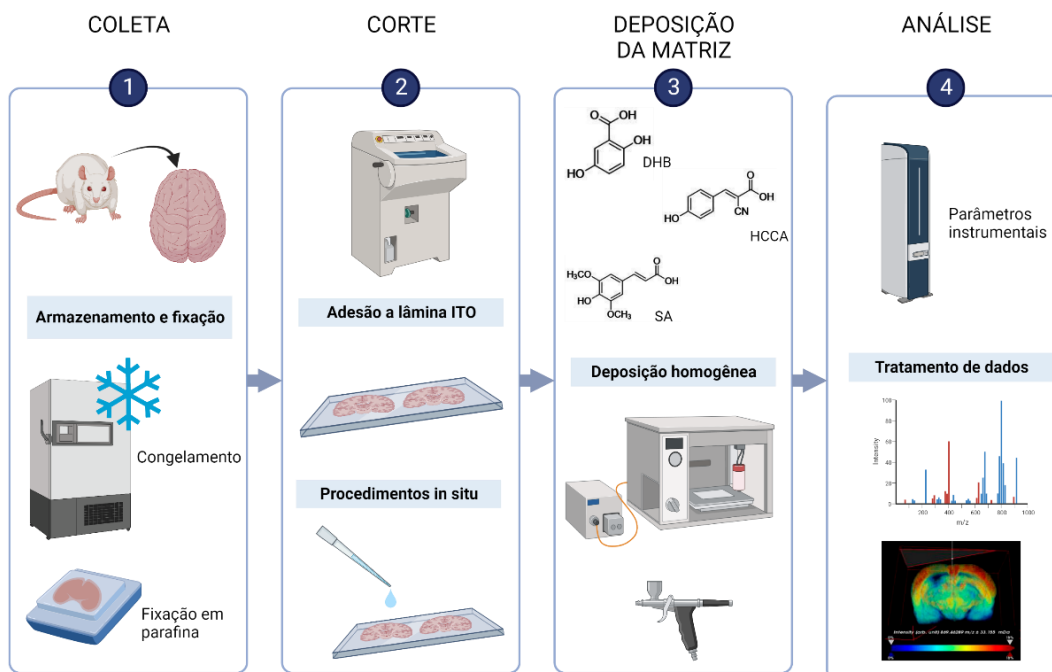


Figura 7. Fluxo de trabalho básico para experimentos de imageamento por MALDI. Fonte: Autoria própria.

A coleta das amostras deve ser realizada com cautela para que a integridade na localização espacial das moléculas seja mantida. Para evitar a deformação e degradação das amostras, o congelamento instantâneo é altamente aconselhável. Uma alternativa ao congelamento é embeber o tecido em parafina e fixar com formalina como foi demonstrado por Buck (2015), porém esse processo de incorporação e posterior remoção da parafina utilizando solventes pode remover lipídios na amostra (BUCK et al., 2015a).

Depois realiza-se o corte do tecido, para o qual equipamentos como micrótomos e criostatos são amplamente utilizados. Realizar essa etapa a baixa previne a deslocalização dos analitos na amostra quando o corte é efetuado.

Em alguns casos pode haver problemas com contaminação, que podem ser solucionados adicionando uma etapa de limpeza previamente ao corte. Um exemplo é a análise de drogas em fios de cabelo, na qual principal limitação é a contaminação devido a exposição externa, medicamentos, contaminação laboratorial, entre outros fatores. Apenas o corte da amostra é insuficiente para evitar a contaminação externa, pois esta

pode estar em qualquer nível e, portanto, deve-se inferir uma metodologia de limpeza com eficiência comprovada (BOUSCHEN et al., 2010).

Após o corte, a amostra deve ser aderida em uma lâmina condutora antes da aplicação da matriz. As lâminas geralmente utilizadas em MALDI-MSI são lâminas de vidro revestidas com óxido de índio-estanho (ITO) que fornece uma superfície condutora. Outros parâmetros fundamentais são a escolha da matriz e sua deposição. Geralmente, a intensidade dos sinais de íons e a resolução espacial é fortemente influenciada por esses parâmetros já que a deposição da matriz determina a distribuição e o tamanho dos cristais da matriz (CAPRIOLI; FARMER; GILE, 1997).

Para ser considerada ideal para imageamento por MALDI, uma matriz deve atender duas condições básicas: Permitir uma aplicação homogênea e ser totalmente estável em vácuo por um longo período. As matrizes orgânicas polares e ácidas mais comumente utilizadas no modo positivo de íons são o ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) e ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB), já no modo negativo de íons a 9-Aminoacridina é amplamente aplicada (RZAGALINSKI; VOLMER, 2017).

Diferentes matrizes têm sido estudadas com diferentes finalidades, considerando também a implantação de novas classes de compostos, como o grafeno, óxido de grafeno, nanopartículas de metal e óxidos metálicos, ou líquidos iônicos, polímeros e matrizes orgânicas e híbridas orgânico-inorgânicas (RZAGALINSKI; VOLMER, 2017; FRIESEN, 2015; GUAN, 2018; KOSYAKOV, 2018).

A heterogeneidade na cristalização ou diferenças na espessura da camada de matriz podem gerar informações errôneas. Muitos métodos foram estudados e desenvolvidos para a otimização do processo de revestimento com matriz e, atualmente, existem equipamentos comerciais especializados em efetuar a deposição de forma homogênea, como o instrumento ImagePrep™ (Bruker) e o TM-Sprayer™ (HTX Technologies). A comparação entre métodos de baixo custo e aqueles disponíveis comercialmente mostra que mesmo instrumentos muito simples possuem capacidade de serem utilizados para a deposição de matrizes homogêneas quando o acesso aos equipamentos comerciais não é possível (HUANG et al, 2018)

Os parâmetros para a aquisição de dados, como configuração de foco do laser, intensidade, comprimento de onda, taxa de repetição, largura de varredura, taxa de repetição por *pixel*, modo de íon (positivo ou negativo), tensão do refletor, potencial de

aceleração, além de calibração de massa externa, devem ser configurados para a aquisição de imagens. O tratamento dos dados é realizado em softwares específicos para MSI. Atualmente, existem vários pacotes de softwares comerciais ou de código aberto disponíveis para analisar esses dados, em formatos online ou offline, como MSiReader, msIQuant, SpectralAnalysis, FlexImaging, SCiLS e Cardinal (RZAGALINSKI et al., 2018).

2.5.2. MALDI-MSI em amostras capilares

O primeiro emprego de MALDI-MSI em amostras capilares foi realizado por Miki (2011) para determinar a incorporação de metanfetamina (MIKI *et al.*, 2011). O monitoramento da distribuição de drogas e medicamentos continua sendo maior aplicação de MALDI-MSI em amostras de cabelo. A maioria das drogas tem alta afinidade com a melanina, portanto acredita-se que a deposição de drogas *in vivo* ocorra principalmente no córtex e na medula (KAMATA et al., 2015). Isso também significa que a coloração do cabelo é importante para a análise de drogas, assim como para medicamentos, que foram citados como encontrados em concentração significativamente menor em cabelos descoloridos. Uma revisão recente, realizada por Ueki (2022), discorre amplamente sobre o uso de MSI para visualização de medicamentos em amostras capilares (UEKI; FUKUSAKI; SHIMMA, 2022).

A análise de canabinóides demonstrou a aplicabilidade da técnica na detecção de **Δ^9 -tetrahidrocanabinol** (THC) em pequenas quantidades de amostra, (BEASLEY; FRANCESE; BASSINDALE, 2016) mesmo o THC sendo uma molécula fenólica, que é incorporada ao cabelo em uma extensão menor do que drogas de caráter básico (UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME, 2014).

A detecção de **metanfetamina** incorporada no cabelo foi possível até em nanogramas por miligrama e apresentou boa correlação semiquantitativa com os resultados obtidos por HPLC-MS/MS, sendo possível a quantificação desse composto. (WANG; WANG, 2017) **Cocaína** e seus metabólitos também foram identificados e quantificados (FLINDERS et al., 2017b).

Uma vantagem interessante em se utilizar MALDI-MSI para análise capilar consiste no fornecimento de informações cronológicas visuais e precisas de compostos ingeridos por via oral, geralmente em dias e até em horas, já que a resolução espacial ao longo do comprimento do cabelo pode ser determinada em relação ao tempo de crescimento do fio de cabelo, pois um *pixel* de 150 µm equivale a aproximadamente 11 h de crescimento. Geralmente os menores tamanhos de pixel que podem ser obtidos entre 5 e 10 µm, que correspondem a um tempo de crescimento do fio de entre 20 e 45 min. Além disso, menores quantidades de amostras são necessárias e suas preparações são mais simples e rápidas (FLINDERS; BASSINDALE; HEEREN, 2019).

Ao analisar **zolpidem** em amostras capilares, Shima (2017) concluiu que a técnica de MSI pode distinguir entre ingestões únicas, ocasionais e múltiplas pela detecção de áreas com alta concentração. Então, além do uso da técnica de MSI em hastes capilares com a finalidade de detectar uso de drogas, ela pode ser aplicada para fins clínicos, como avaliação da absorção de medicamentos e produtos químicos, ou mesmo detectar variações do organismo devido a ingestão ou uso de determinadas substâncias (SHIMA et al., 2017).

No caso da análise da haste capilar, o preparo da amostra consiste basicamente em uma limpeza prévia do fio para retirada de produtos depositados na superfície, o seccionamento, fixação na lâmina específica para o equipamento utilizado e deposição da matriz. Diversos autores relatam sensibilidade muito baixa quando é utilizado o cabelo intacto, reforçando a necessidade de se efetuar um corte longitudinal no fio de cabelo (NAKANISHI; NIRASAWA; TAKUBO, 2014; SHEN et al., 2014; WANG; WANG, 2017).

Até o presente trabalho, não havia registros sobre análise da incorporação de cosméticos e óleos vegetais em fibras capilares por MALDI-TOF-MSI. Portanto, esse trabalho se propôs a explorar essa aplicação da técnica, representando um avanço pioneiro e destacando a importância de compreender os processos de incorporação de substâncias em fibras capilares. Esse conhecimento pode trazer detalhes valiosos para testes de eficácia de cosméticos, contribuindo para o desenvolvimento de novas formulações cosméticas, visando melhorar a saúde e a estética capilar.

2.5.3. Preparo das amostras

2.5.3.1. Lavagem dos fios

A lavagem prévia dos fios tem como propósito evitar contaminações externas, como suor, lipídios, resíduos de produtos cosméticos e até mesmo drogas ou medicamentos. Sendo assim, é uma etapa imprescindível quando se utiliza cabelo como matriz biológica, principalmente em análises semiquantitativas.

Diversos protocolos de lavagem e procedimentos de descontaminação foram publicados ao longo dos anos e suas limitações e eficácia foram recentemente revisadas (BACIU et al., 2015; ERNE et al., 2019; MANTINIEKS et al., 2018). Os resultados variam entre os diversos procedimentos de descontaminação investigados e, para análise de drogas, é difícil provar que o composto depositado externamente tenha sido totalmente eliminado (TSANACLIS; ANDRAUS; WICKS, 2018). A interpretação dos resultados torna-se ainda mais difícil quando se considera as influências externas de xampus, procedimentos de tintura e descoloração e até os efeitos da exposição luz solar e altas temperaturas (ERNE et al., 2019).

Segundo a *Society of Hair Testing* (SoHT), apenas o corte não elimina a contaminação externa já que ela pode ocorrer em qualquer nível do fio, sendo assim a descontaminação geralmente deve incluir pelo menos um solvente orgânico inicial para remover óleos, seguido de lavagens aquosas (SOCIETY OF HAIR TESTING, 1997).

Protocolo de lavagem publicado por Cairns (2004) é aplicado em 12 mg de cabelo, que devem ser lavados por 15 min com 2 mL de isopropanol sob agitação vigorosa (900 rpm) em tubo Eppendorf, seguido de duas lavagens com 2 mL de tampão fosfato com 0,01% de albumina de soro bovino (BSA), pH 6, por 30 min a 37 °C com agitação vigorosa, seguida de duas lavagens por 60 min com a solução tampão (CAIRNS et al., 2004).

Cuypers (2016) avaliou lavagens com 5 mL de diclorometano, isopropanol, acetonitrila, diclorometano/água e metanol/água por 1 min em ultrassom para descontaminação de cocaína. Apenas a lavagem com metanol demonstrou menores concentrações de cocaína na parte externa do fio sem, e o teste de lavagem final com

água, como indica a SoHT, não apresentou diferenças significativas com relação as amostras não lavadas (CUYPERS et al., 2016).

A UNODC cita dois protocolos de descontaminação: um com solvente aquoso e outro com solvente orgânico. O primeiro é composto por uma lavagem com 10 mL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,1% em água (m/v) durante 3 min, seguido por duas limpezas com 10 mL de água por 3 min, uma com 10 mL de acetona por 3 min e secagem abaixo de 60 °C durante 30 min para aproximadamente 100 mg de cabelo (UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME, 2014).

O segundo, para a mesma quantidade de cabelo, recomenda duas lavagens por 2 min em 5 mL de diclorometano, com uma etapa de secagem com papel absorvente entre as duas lavagens (UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME, 2014). Flinders *et al.* usa apenas uma lavagem com 10 mL de diclorometano para um único fio com agitação durante 1 min. (FLINDERS et al., 2017a).

O protocolo de lavagem publicado por Erne et al. consiste em 10 lavagens com 5 mL de metanol durante 2 min em ultrassom, seguido por uma lavagem prolongada durante 18 h em 5 mL de metanol em um novo tubo Eppendorf. Ao final, os cabelos são lavados três vezes por adição, agitação e descarte de 2 mL de metanol (ERNE et al., 2019).

2.5.4. Corte longitudinal

Embora a análise de amostras de cabelo intactas tenha sido demonstrada por MALDI-MSI, uma das questões levantadas é a eficiência da ionização dos compostos incorporados ao núcleo da haste capilar uma vez que diversos compostos absorvidos são aprisionados principalmente no córtex. Portanto, a realização de seções longitudinais foi proposta como solução para resolver este problema, fator que também proporciona uma melhor deposição da matriz devido a parte interna dos cabelos ser mais porosa que a superfície (KAMATA et al., 2015).

Para MSI, é necessário que haja a padronização das seções de tecido, pois influencia diretamente a qualidade dos resultados obtidos, portanto o corte deve ser realizado de forma precisa, gerando uma superfície uniforme. O tipo de corte mais

comumente utilizado em MSI é a secção de tecidos congelados, mas existem alternativas (PIETROWSKA et al., 2016). Diferentes métodos de exposição do córtex e seccionamento serão discutidos nesse tópico, como a raspagem, o corte manual, o corte com micrótomo e o corte em criostatos.

2.5.4.1. Raspagem

A raspagem dos fios com uma lâmina é um método simples para expor o córtex capilar. Ele consiste em apoiar os fios em uma placa e usar a ponta de uma lâmina, mantida a um pouco menos de 90° em relação à placa, e raspar a espessura do cabelo até a profundidade desejada (Figura 8).

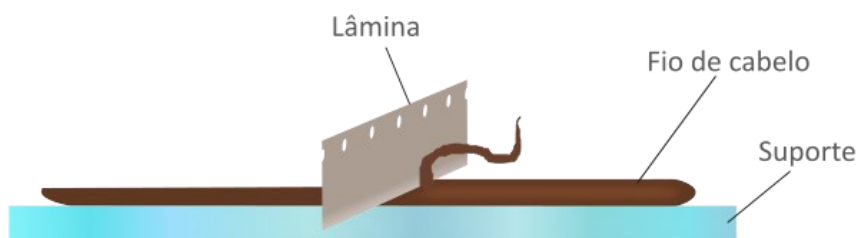


Figura 8. Raspagem do fio de cabelo para secção longitudinal utilizando uma lâmina perpendicular. Fonte: Autoria própria.

Shen (2004) testou o uso de bisturi para raspar o fio do cabelo longitudinalmente, no entanto observou que esse procedimento não era muito eficiente já que deixava a superfície do fio não uniforme (SHEN et al., 2014).

Kempson (2012) cita que a região do córtex permanece razoavelmente plana, porém a cutícula é significativamente danificada durante o procedimento. Além disso, durante o processo pode haver contaminação ou deslocalização dos analitos (KEMPSON; KIRKBRIDE, 2002). Apesar de ser o mais simples e mais fácil de implementar para fios muito curtos (alguns milímetros), é o método que traz maiores desvantagens e não pode ser considerado um método adequado para MSI (KEMPSON; KIRKBRIDE, 2002).

2.5.4.2. Corte Manual

Outra forma de expor o córtex é realizar o corte do fio ao longo de seu comprimento. Isso pode ser realizado de forma manual, utilizando uma lâmina e um suporte que permita a fixação do fio de cabelo (Figura 9).

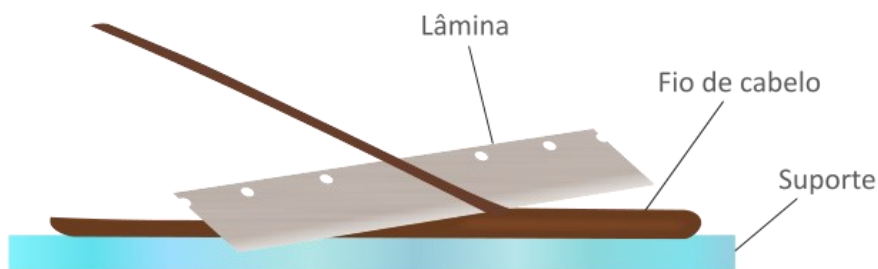


Figura 9. Corte longitudinal do fio de cabelo utilizando uma lâmina inclinada. Fonte: Autoria própria.

Um método de corte longitudinal utilizando um aparato metálico foi citado primeiramente por Kempson (2002), que confirma que esse método retém a estrutura cuticular muito melhor do que o método de raspagem. A ideia é prender o fio com uma fita adesiva na lateral de um bloco metálico e posicioná-lo dentro de uma ranhura presente no bloco, passando a lâmina e seccionando o fio com a mesma espessura da altura da ranhura (Figura 10).

Tanto amostras de cabelo cacheado quanto liso podem ser cortadas pois a lâmina, quando corretamente posicionada, segura o fio de cabelo na ranhura efetua o corte ao longo do comprimento. (KEMPSON; KIRKBRIDE, 2002) Uma análise posterior que usou o mesmo aparato constatou que este permite um corte longitudinal apropriado aparentando danos mínimos à amostra, além de terem se mostrado reprodutíveis (FLINDERS et al., 2015).

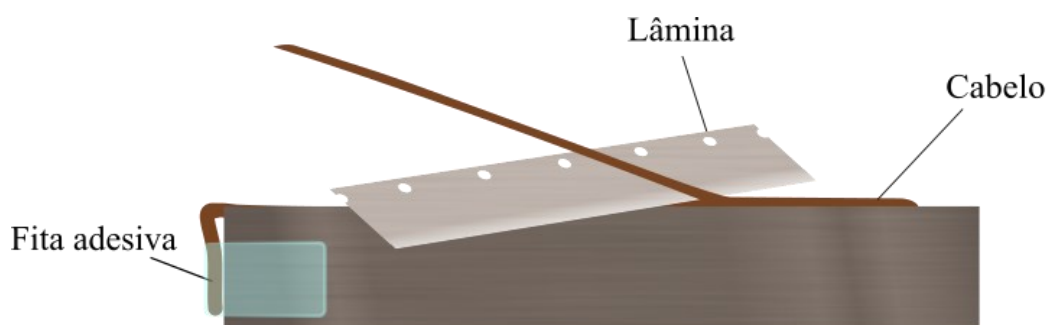


Figura 10. Esquema de corte longitudinal de fios de cabelo utilizando um bloco metálico com ranhuras. Fonte: Autoria própria.

2.5.4.3. Corte com Micrótomo

Para o corte em micrótomo geralmente as amostras são fixadas em formalina e embebidas em parafina (FFPE). Esse tipo de corte, realizado em temperatura ambiente, é uma alternativa ao uso de tecidos frescos congelados, já que essa técnica nem sempre está disponível. As amostras FFPE sofrem processos de degradação tecidual limitados e são usadas rotineiramente em diagnósticos clínicos e pesquisas (HERMANN et al., 2020).

Amostras FFPE eram considerados incompatíveis com MALDI-MSI devido à baixa acessibilidade de proteínas pela forte reticulação com o formaldeído. No entanto, essa limitação foi superada pela recuperação antigênica adequada que reverte a reticulação de proteínas (PIETROWSKA et al., 2016).

A presença de parafina durante a análise por MALDI pode gerar problemas de supressão de íons. Portanto, é necessário um processo de retirada da parafina muito cuidadoso, no qual geralmente se utiliza xileno. A remoção da parafina é uma etapa crítica, pois durante esse processo existe o risco de ocorrer a modificação ou remoção dos componentes endógenos como proteínas, peptídeos e substâncias de baixa massa molecular, principalmente no caso de compostos sensíveis a solventes orgânicos, como os lipídios (HERMANN et al., 2020; PIETROWSKA et al., 2016).

Apesar dessas desvantagens, amostras FFPE já foram usadas com sucesso para imagens de peptídeos/proteínas (CASADONTE et al., 2014; DE SIO et al., 2015;

O'ROURKE; DJORDJEVIC; PADULA, 2015) e de metabólitos resistentes a solventes específicos (BUCK et al., 2015b). Uma pesquisa recente também mostrou tecidos preservados por fixação em formalina e processados por inclusão em parafina não apresentam grandes alterações de lipídios e peptídeos em comparação com amostras de tecido congeladas (PIETROWSKA et al., 2016). Métodos foram desenvolvidos para analisar lipídios em tecidos FFPE, demonstrando que esse método de preparo de amostras pode ser aplicado para análises lipidômicas (DENTI et al., 2021).

2.5.4.4. Corte com Criostato

O congelamento rápido usando nitrogênio líquido no momento de coleta da amostra é o método geralmente empregado para tecidos animais, apesar de poder causar rachaduras no tecido pelo resfriamento abrupto de partes da amostra. Com a amostra armazenada congelada, o corte mais comumente empregado utiliza um criostato. Para isso, a amostra deve ser disposta no equipamento posição correta e utiliza-se lâminas para efetuar o corte. A amostra geralmente é aderida à algum material para efetuar o corte, como carboximetilcelulose. É o método relatado como sendo o mais uniforme para diversas amostras (COLE, 2017b).

Apesar de ser o mais indicado para análises de MSI, muitas vezes não está disponível próximo ao local de coleta das amostras, o que pode se tornar um problema já que, principalmente em tecidos animais, é importante que a amostra seja rapidamente resfriada e mantida a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para conservar os componentes de interesse, portanto o transporte da amostra deve ser realizado com cautela para não haver influências negativas nos resultados. Como o cabelo é uma matriz estável, a necessidade de rápida conservação a baixas temperaturas depende da estabilidade do analito de interesse.

2.6. Caracterização de óleos vegetais

Devido ao interesse das indústrias cosmética e farmacêutica em utilizar óleos vegetais, a caracterização de seus componentes é importante para as diversas aplicações.

Diferentes ferramentas analíticas podem ser utilizadas para avaliar a composição química e as propriedades (ANTONIOSI FILHO, N. R., 1999).

A composição de ácidos graxos influencia nos valores nutricionais e em características específicas dos óleos. Técnicas amplamente usadas com a finalidade de identificar a composição de ácidos graxos é o GC-MS, que pode ser combinado com GC-FID para a quantificação. Para isso, geralmente os ácidos graxos são convertidos em seus ésteres metílicos correspondentes em um processo de transesterificação (FERREIRA et al., 2019).

A caracterização do perfil lipídico em termos da composição de TAG é importante para a tipificação, controle de qualidade e triagem de adulteração e contaminação desses óleos. Perfis de TAG de coco foram analisados por HPLC acoplada a detecção por índice de refração (HPLC-RI) e por GC acoplado a detecção de ionização por chama (GC-FID). Um estudo permitiu a diferenciação de variedades de coco baseado em seu perfil lipídico, com a caracterização baseada na infusão direta utilizando ionização por eletrospray (ESI-MS), sem separação prévia, o que pode auxiliar no direcionamento de plantações de coco para fins específicos, dependendo da característica que se busca (FERREIRA et al., 2019).

A ESI é considerada branda, o que simplifica o espectro de massas de misturas complexas em comparação com técnicas de ionização mais fortes, o que tornou comum o uso desse tipo de ionização em análises diretas de misturas sem separação cromatográfica (TONIN et al., 2017).

A supressão quase completa da dissociação de íons durante o ESI poderia levar a uma relação de um íon por analito, porém, para algumas misturas complexas a ionização é capaz de formar vários tipos de íons a partir do mesmo analito, o que reduz a sensibilidade e aumenta a complexidade do espectro. No modo positivo, uma molécula poderia ser detectada como $[M+H]^+$, $[M+NH_4]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$ e/ou $[M-H+2Na]^+$. Para o modo negativo felizmente esse efeito é menos comum, gerando predominantemente íons como $[M-H]^-$, embora $[M+Cl]^-$ também pode ocorrer (TONIN et al., 2017).

Uma alternativa para resolver essa dificuldade é sequestrar da solução os principais cátions metálicos. Éteres coroa podem ser utilizados com esse propósito, uma

vez que são conhecidos por serem sequestradores eficientes dos íons Na^+ e K^+ (TONIN et al., 2017).

3. Materiais e Métodos

3.1. Coleta e armazenamento

As amostras de cabelo (**Figura 11**) foram fornecidas pela empresa Katléia Lab Ltda - Centro Avançado de Diagnóstico Capilar (São Carlos, Brasil) como parte de um projeto PIPE (FAPESP – SEBRAE), intitulado: Cosméticos Personalizados “Sob Medida”: Do diagnóstico ao tratamento. Elas foram armazenadas a temperatura ambiente até o tratamento. Foram fornecidas 4 mechas de fibras lisas e descoloridas, 4 mechas de fibras lisas e naturais (sem processo de descoloração) e 4 mechas de fibras cacheadas e descoloridas.



Figura 11. Mechas de cabelo compostas por: A) Fios lisos e descoloridos; B) Fios lisos e naturais e C) Fios cacheados e descoloridos. Fonte: Autoria própria.

3.2. Limpeza e tratamento

3.2.1. Procedimentos de limpeza

Diversos procedimentos de limpeza para análise de drogas em cabelo estão reportados na literatura e descritos acima, no item 2.5.3. Os procedimentos que obtiveram resultados satisfatórios no trabalho desenvolvido por Erne et al. (2019), ou seja, foram efetivos na limpeza externa dos fios, foram avaliados nesse trabalho.

O primeiro protocolo, recomendado pela UNODC (*United Nations Office on Drugs and Crime*), consistiu em duas lavagens por 2 min em 5 mL de diclorometano (estabilizado com amileno PA-ACS-ISO, Panreac), em cerca de 10 fios de cabelo, com auxílio de um tubo eppendorf e secagem após cada lavagem utilizando jato de nitrogênio.

O segundo protocolo, idealizado por Erne et al., consistiu em 10 lavagens com 5 mL de metanol (grau HPLC, Merk) em ultrassom por 2 min, seguido por uma lavagem longa durante 18 h em 5 mL de metanol e mais 3 lavagens com 2 mL de metanol (MeOH) seguidas de descarte imediato. Foram testadas variações desse protocolo com números variados de lavagem para verificar a efetividade, conforme apresentado na **Tabela 1**.

Tabela 1. Protocolos testados de lavagem dos fios com MeOH. Fonte: Autor, 2021.

Número de lavagens curtas com 5 mL MeOH (2 min)	Lavagem longa com 5 mL MeOH
10 lavagens em ultrassom	18 h
5 lavagens em ultrassom	18 h
10 lavagens em ultrassom	não
5 lavagens em ultrassom	não
5 lavagens em repouso	não

Outro procedimento avaliado foi a lavagem com lauril éter sulfato de sódio (LESS), um surfactante primário muito utilizado em sistemas de limpeza, como shampoos e sabonetes líquidos, e muito utilizado na cosmetologia. Nesse caso, mechas de cabelo entre 1 e 3 g são lavadas com solução a 10% de LESS e esfregadas com os

dedos durante 1 min, enxaguadas com água corrente em abundância durante 1 min, passam por um último enxague com água ultrapura e são secas em ambiente padronizado a 22 °C por 24 h.

3.2.2. Tratamento com óleos

O tratamento foi realizado em mechas de cabelo virgens e em mechas de cabelo descolorido. Para a descoloração, mechas cabelo virgem foram submetidas ao processo de descoloração oxidativa com um descolorante à base de peróxido de hidrogênio, seguindo-se as orientações de uso do fabricante. As amostras já foram obtidas após a realização desse procedimento.

Mechas virgens e descoloridas, medindo aproximadamente 20 cm e pesando entre 1 e 3 g, foram lavadas com uma solução de lauril éter sulfato de sódio (LESS) 10% durante 1 min e enxaguadas em água corrente. Esse processo foi repetido duas vezes. Após a lavagem as mechas foram secas em ambiente padronizado a 22 °C por 24 h.

Após a secagem, as mechas foram submetidas ao tratamento com três óleos vegetais: óleo de argan, óleo de coco e óleo de abacate. Os óleos foram aplicados diretamente nas mechas em quantidade suficiente para envolver bem os fios. Cada mecha foi embalada em papel alumínio e levada a estufa a 28 °C por 24 h. Em seguida, cada mecha foi lavada duas vezes com solução de LESS 10%, enxaguadas com água corrente em abundância, finalizadas com um enxague com água ultrapura e deixadas para secagem em ambiente controlado (24 °C) por 24 h. As mechas que não passaram pelo tratamento também foram submetidas ao processo de limpeza.

3.3. Desenvolvimento da metodologia de corte

3.3.1. Corte em criostato

Realizou-se a tentativa do corte longitudinal em um criostato, seguindo o procedimento citado por Kamata (2015), que consistiu na fixação dos fios na lâmina de vidro utilizando fita dupla face e congelamento de uma camada de água sobre os fios. (KAMATA et al., 2015). O equipamento utilizado foi um criostato Leica, modelo CM 1850.

O equipamento não possui suporte para lâminas de vidro, portanto o corte com os fios já depositados sobre as lâminas não foi efetivo. Sendo assim, foram testadas outras formas de cortá-los: fixando-os em gel de agarose com posterior congelamento, fixando-os em gelatina com congelamento e fixando-os em Tissue-Tek® O.C.T. Compound (Sakura), um composto formado por glicóis e resinas transparentes muito utilizado na histologia para incorporar tecidos e realizar o seccionamento em criostato.

3.3.2. Corte em micrótomo

Como o corte em criostato não foi efetivo, avaliou-se o corte em micrótomo. Para isso, inicialmente as fibras capilares foram fixadas em parafina. Diversas tentativas foram realizadas com o propósito de manter os fios alinhados: fixar os fios diretamente em parafina; posicionar os fios sobre um gel de agarose 10% e fixá-los em parafina, jogando-a sobre o gel; posicionar os fios sobre gelatina fixá-los em parafina.

3.3.3. Corte manual

Um aparato foi desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa, baseado em um aparato criado por Kempson (2002), com o objetivo de cortar os fios de cabelo previamente colados na lâmina ITO com fita dupla face (**Figura 12**). Ele foi impresso em

3D utilizando ABS (acrilonitrila butadieno estireno) cinza e em acrílico utilizando a cortadora a laser Kawai modelo KW600. A parte superior (**Fig. 12a**) é utilizada para fixar a lâmina utilizada no micrótomo e a parte inferior é utilizada para fixar a lâmina ITO contendo os fios, que foi produzida em ABS (**Fig. 12b**) e em acrílico (**Fig. 12c**).

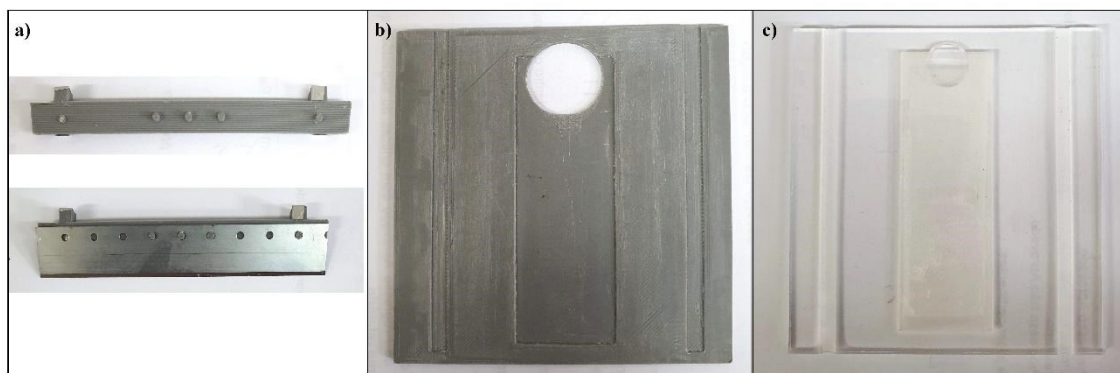


Figura 12. Instrumento produzido para corte dos fios de cabelo previamente fixados na lâmina ITO: a) Peça superior impressa em 3D, usada para fixar a lâmina metálica do micrótomo; b) Peça inferior impressa em 3D com área de encaixe para a lâmina ITO; c) Peça inferior produzida em acrílico com área de encaixe para a lâmina ITO. Fonte: Autoria própria.

Um outro aparato metálico para corte longitudinal das amostras foi desenvolvido (**Figura 13**), baseado no processo descrito por Kempson (2002), que consiste em duas partes: a primeira compreende um bloco de material polimérico, onde posiciona-se uma lâmina de micrótomo a um ângulo de aproximadamente 20°, parafusos e uma placa metálica, usados para fixar a lâmina (**Fig. 13a**, separados e **13b**, montado); a segunda é composta por um bloco de alumínio com ranhuras entre 40 e 50 μm , no qual os cabelos são posicionados e presos na lateral com fita adesiva (**Fig. 13c**). O esquema do corte é apresentado na **Fig. 13d** (KEMPSON; KIRKBRIDE, 2002).

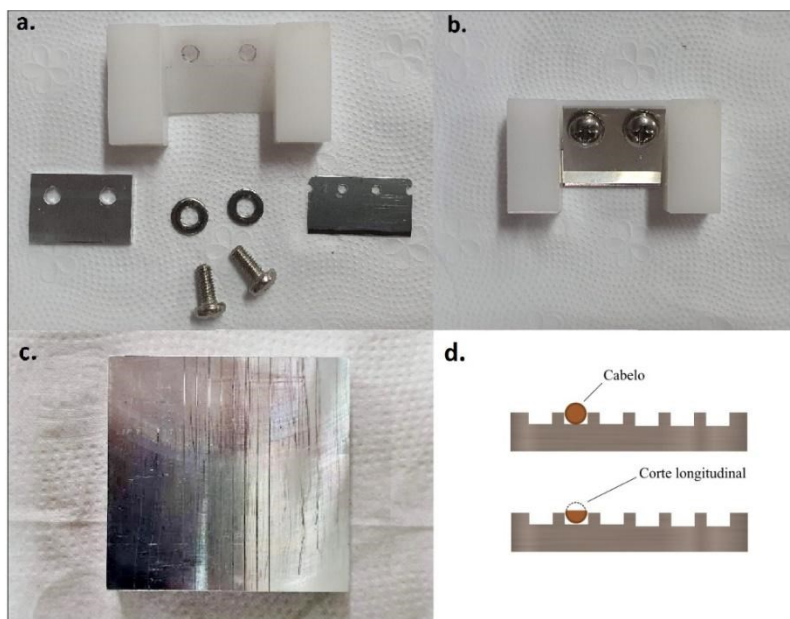


Figura 13. Aparato para corte longitudinal dos fios de cabelo. a) Peças do suporte de fixação da lâmina de micrótomo com ângulo de 20°; b) Aparato montado com a lâmina fixa; c) Bloco de alumínio com ranhuras de 40 e 50 μm . d) Esquema do corte longitudinal do fio de cabelo.

3.4. Fixação e deposição da matriz

Os fios de cabelo devem ser fixados em lâminas de vidro com revestimento condutivo ITO (óxido de índio e estanho) (Bruker Daltonics) para posterior análise por MALDI-TOF. Dois métodos de fixação foram testados e estão ilustrados na **Figura 14**: o primeiro com auxílio de fita dupla face sob toda a extensão dos fios, como mostra o esquema da **Fig. 14a**; o segundo colando a fita apenas sobre as extremidades dos fios, que pode ser usado como alternativa quando não há necessidade de avaliar o bulbo do cabelo (**Fig. 14b**). As fitas usadas para fixação serão citadas a frente, no item 3.8.

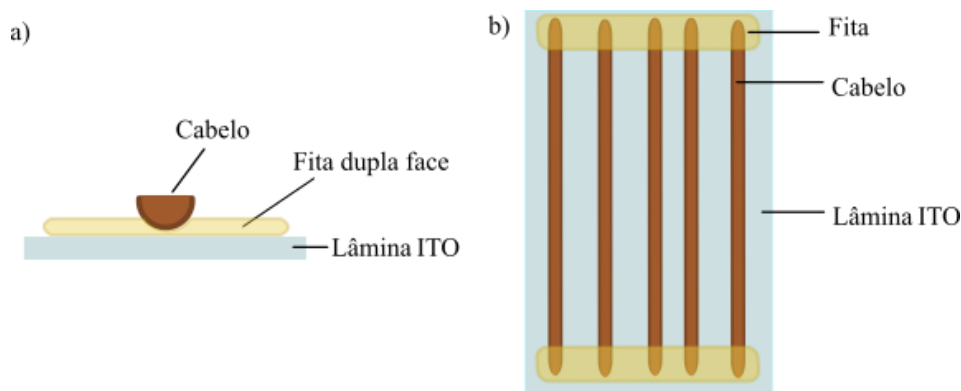


Figura 14. Esquema da fixação dos fios na lâmina ITO com a) fita dupla face sob os fios e b) fita de face simples sobre extremidades dos fios. Fonte: Autoria própria.

A matriz conhecida como DHB (ácido 2,5-dihidroxibenzoico) e a matriz HCCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinamico) foram depositadas sobre os fios utilizando o equipamento TM-Sprayer™ (HTX Technologies) em diferentes concentrações e proporções, todas em solução acetonitrila 1:1 acidificada com 0,1% de ácido trifluoracético (v/v).

3.5. Análises dos óleos por GC-FID e GC-MS

A fim de compreender a composição dos óleos utilizados no trabalho, eles foram submetidos a análise por cromatografia gasosa com detector por ionização em chama (GC-FID) e GC-MS. Para isso foi utilizado o cromatógrafo a gás GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu, Japão) e uma coluna capilar DB-225-MS (50% cianopropil-fenil-metil(poli)siloxano; 15 m \times 0.25 mm d.i. \times 0.25 μ m de espessura do filme; Agilent Technologies, USA), amplamente usada para separação de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES).

Os óleos passaram pelo procedimento de transesterificação, a fim de possibilitar a volatilidade dos ácidos graxos, bem como suas identificações e quantificações. Foi utilizado um padrão contendo 37 FAMES (CRM47885; Supelco, Sigma–Aldrich, EUA) para quantificação dos ácidos graxos.

Para o procedimento de transesterificação, 200 μ L de padrão interno C19:0 com concentração de 1.000 mg L⁻¹ de hexano foi adicionado a 5 mg de óleo, seguido pela

adição de 50 μL de KOH 2 mol L^{-1} solubilizado em metanol–hidróxido de potássio metanólico (KOH–MeOH) e submetido a agitação em vórtex por 30 s. O sobrenadante formado foi transferido para um microtubo tipo Eppendorf® contendo um cristal de Na_2SO_4 anidro (agente secante). O microtubo foi centrifugado a 10.000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. Após a centrifugação, cerca de 100 μL da fase superior foi transferida para frascos com septo de teflon e levados para análise. Cada amostra e padrão foram analisados por GC-FID em triplicata e os ácidos graxos foram confirmados pela análise em GC-MS.

3.6. Análises dos óleos por ESI-MS

As amostras foram preparadas na concentração de 0,05 mg mL^{-1} dos óleos em metanol (50 ppm) com $3,5 \cdot 10^{-3}$ mg mL^{-1} de éter 18-coroa-6 (3,5 ppm) e 0,3% de ácido trifluoroacético (TFA).

As soluções dos óleos de argan, abacate e coco foram analisados por injeção direta, com auxílio de uma seringa, no espectrômetro de massas íon trap linear LTQ XL™ (Thermo Fisher, EUA) equipado com um ESI, no modo positivo de íons. As condições de análise foram: vazão do gás 10 u.a., voltagem do capilar 3,99 V, temperatura da fonte 39 °C e voltagem das lentes 85 V. O espectro foi obtido na região de m/z entre 50 e 2000. Os espectros foram processados no software Xcalibur™ (Thermo Fisher, EUA). Também foi realizada a fragmentação de íons selecionados por ESI-MS/MS com fragmentação por CID, visando identificar compostos de interesse para os tratamentos capilares.

3.7. Análises por MALDI-TOF-MS

As análises por MALDI-TOF foram realizadas no espectrômetro de massas Autoflex maX® (Bruker Daltonics), que utiliza o laser *smartbeam-II*, com potência de laser em 90%, diâmetro do foco em 20 µm e taxa de repetição em 2.000 Hz. Os espectros foram obtidos no modo positivo de íons, utilizando o refletor, na região de m/z 200-2000. O software *flexControl* (Bruker Daltonics) foi utilizado para aquisição e o *flexAnalysis* (Bruker Daltonics) para o tratamento dos dados, assim como o software aberto MZmine.

3.8. Teste de fitas para fixação de amostra

Avaliou-se o uso de diferentes camadas de quatro fitas distintas: a fita polimérica dupla face Arcare® (Adhesives Research) com 140 µm de espessura, a fita dupla face de polipropileno Adelbras® com 56 µm, a fita de tecido não tecido (TNT) condutivo e EC-2 condutivo como camada adesiva ARclad® (Adhesives Research) com 122 µm e a fita de alumínio de face simples Scotch® de 72 µm. Foram avaliadas fitas de diferentes materiais e camadas para verificar a influência do material e da altura no resultado das análises. Elas foram cortadas em pedaços com cerca de 2 mm de comprimento e coladas na lâmina com revestimento ITO. O padrão de angiotensina I $4 \mu\text{mol L}^{-1}$ foi adicionado sobre 1 camada de fita, 2 camadas e 3 camadas de fitas sobrepostas para as quatro fitas, além de ser aplicado diretamente na lâmina (sem fita) como o controle.

A mistura de matrizes DHB/HCCA 3:1 (m/m) com concentração de 8 mg/mL foi aplicada utilizando o equipamento TM-Sprayer™. A aquisição dos espectros foi realizada 4 vezes para cada camada de fita avaliada. Com isso, buscou-se verificar se as fitas, levando em consideração o número de camadas, a espessura final e a condutividade, podem causar desvios de m/z . O padrão e a matriz também foram aplicados sobre fios cortados e intactos para verificar se há deslocamento devido à altura do fio. O cálculo das alturas para as diferentes camadas de fitas e suas siglas se encontram na Tabela 2.

Tabela 2. Especificações das fitas Adelbras®, Alumínio, Arcare® e ARclad® utilizadas com diferentes números de camadas.

Fita	Número de camadas	Espessura aproximada (µm)
Adelbras®	1 camada	56
	2 camadas	112
	3 camadas	168
Alumínio	1 camada	72
	2 camadas	144
	3 camadas	216
Arcare®	1 camada	140
	2 camadas	280
	3 camadas	420
ARclad®	1 camada	122
	2 camadas	244
	3 camadas	366
Sem fita	-	0

3.8.1. Análise estatística

Para explorar os resultados das diferentes fitas e número de camadas foi utilizada a PCA (análise de componentes principais) verificando a correlação dos espectros totais do padrão de Angiotensina I, na faixa de m/z entre 1.280 e 1.400, considerando apenas os pontos em que o sinal possui intensidade maior que 2.000 a.u. para alguma das amostras.

A fim de verificar desvios com relação a m/z utilizando as diferentes fitas, os valores de m/z do sinal mais intenso referente ao íon $[M+H]^+$ do padrão de Angiotensina I para as quatro fitas com três diferentes números de camadas foram comparadas ao controle, perfazendo um fatorial 3×4 com um adicional, foram submetidos a análise de variância e complementados com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Avaliou-se a influência do fio de cabelo intacto, fio cortado e sem fio (controle) sobre o sinal mais intenso do padrão (próximo de m/z 1.297, referente ao íon $[M+H]^+$ do padrão de Angiotensina I), pela análise de variância sendo complementada pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, em 4 repetições.

4. Resultados

4.1. Lavagem dos fios

Foram avaliadas lavagens utilizando solventes com base em procedimentos já reportados na literatura para incorporação de medicamentos e drogas em cabelo. Portanto, os fios foram submetidos aos procedimentos que utilizam MeOH e diclorometano, e a última etapa de limpeza de cada procedimento foi analisada por MALDI-TOF MS (**Figura 15**). Foi possível observar sinais em m/z 823,502 e 824,518 no processo de limpeza que utilizou 10 lavagens com 5 mL de MeOH, em verde, que não foram obtidos nos outros procedimentos. O procedimento com 2 lavagens em 5 mL de DCM foi o que apresentou menor número de sinais, com menor intensidade (sinais em vermelho). Os fios também foram observados no microscópio, no qual não foi possível observar nenhuma diferença em sua superfície após as lavagens.

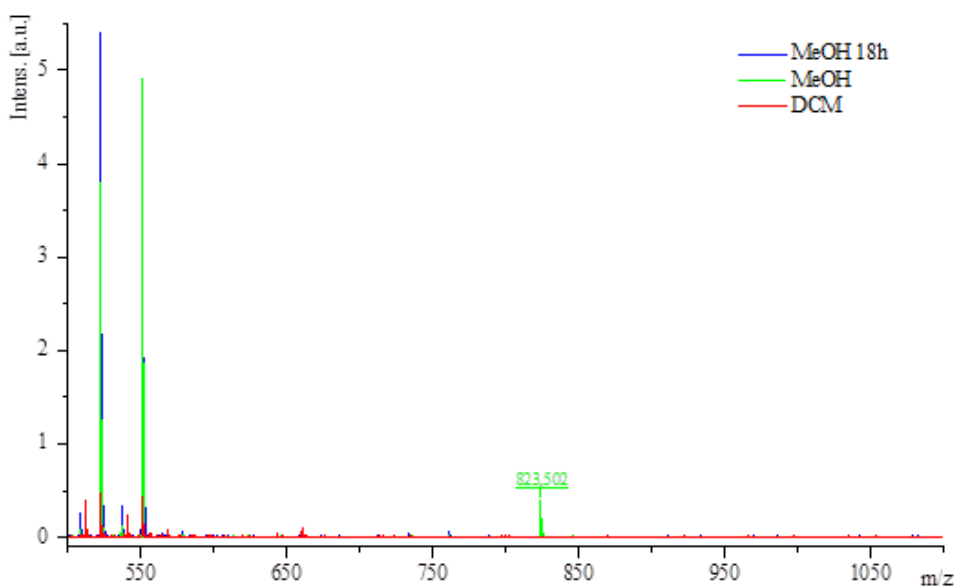


Figura 15. Espectro MALDI-TOF-MS de alíquotas das últimas etapas de limpeza do fio de cabelo tratado com óleo de abacate, sendo i) em azul: o procedimento 10× em 5 mL de MeOH em ultrassom + 18 h em 5 mL de MeOH, ii) em verde: 10× em 5mL de MeOH, e iii) em vermelho: 2× em 5 mL de diclorometano, na região de m/z entre 500 e 1100. Fonte: Autoria própria.

Também foi testado um procedimento de limpeza sem o uso de solventes, processo comum na indústria cosmética que utiliza lauril éter sulfato de sódio (LESS). Inicialmente o LESS foi avaliado por MALDI-TOF MS na região de m/z entre 100 e 2000 com concentração de 0,01 $\mu\text{L/mL}$ e 0,1 $\mu\text{L/mL}$ de THF utilizando a mistura de matrizes DHB/HCCA 1:3 (m/m) na concentração de 10 mg/mL de solução acetonitrila 1:1 acidificada com 0,1% de ácido trifluoroacético (v/v). O espectro obtido (Figura 16) para o LESS apresenta diversos sinais na região de $m/z < 750$, o que pode interferir na região de interesse e deve-se ser observado com cuidado ao se utilizar esse surfactante na limpeza dos fios.

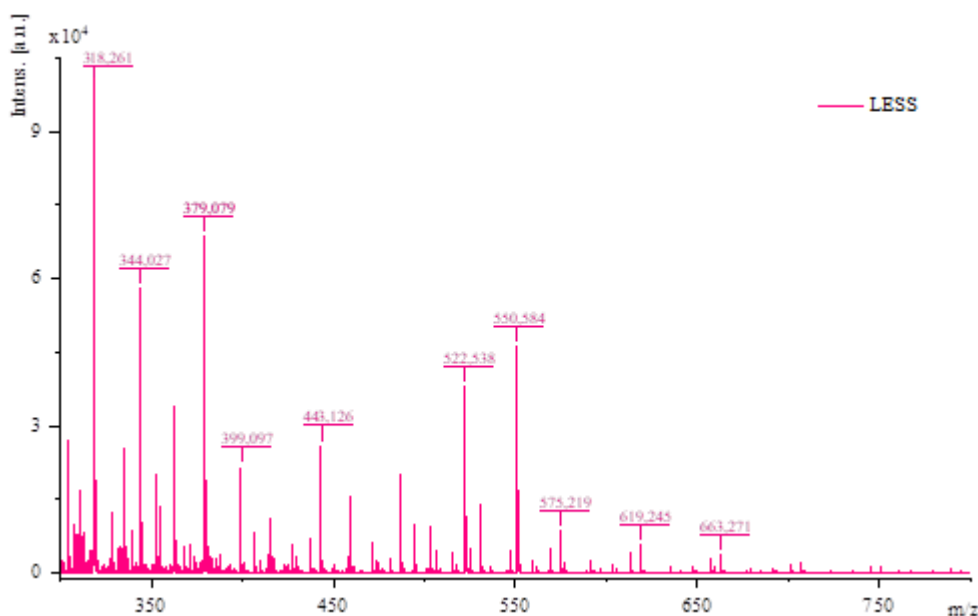


Figura 16. Espectro obtido por MALDI-TOF-MS do lauril sulfato de sódio na faixa de m/z entre 300 e 800. Fonte: Autoria própria.

Após a lavagem com LESS, a última água de enxague das amostras foi coletada para verificar se ainda havia resíduos do composto ou de contaminantes na parte externa do fio. A **Figura 17** ilustra o espectro de massas de uma alíquota retirada durante a última etapa da limpeza dos fios de cabelo com água ultrapura em comparação com o espectro do LESS, comprovando a ausência do composto na última etapa da lavagem. Através do espectro de massas obtido foi possível observar que não houve interferentes

na região de interesse para a análise dos óleos, entre m/z 500 e 1100, portanto, o procedimento de lavagem com LESS foi considerado efetivo.

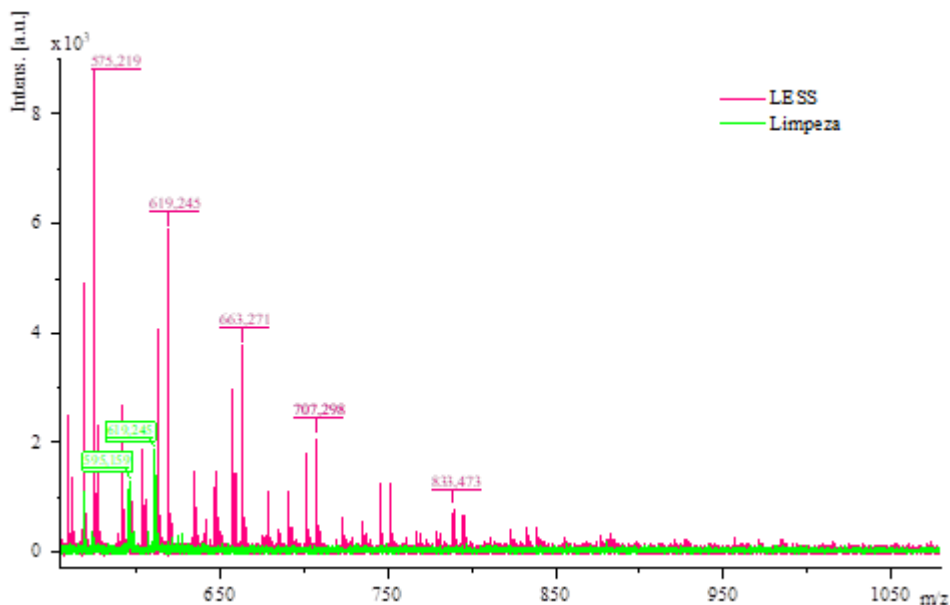


Figura 17. Espectro MALDI-TOF MS na região de m/z 500 a 1.080 de uma alíquota da última etapa de limpeza dos fios de cabelo (verde) e de uma solução aquosa de LESS utilizada no procedimento de lavagem (rosa). Fonte: Autoria própria.

O uso de solventes pode agredir a cutícula e até o córtex capilar, ou ainda extrair compostos incorporados ao fio. Sendo assim, a metodologia de limpeza escolhida foi a lavagem com LESS, como é de costume na área cosmética.

4.2. Desenvolvimento da metodologia para corte dos fios

A metodologia de corte foi desenvolvida avaliando diversas formas que são relatadas na literatura para o corte de amostras biológicas, que são o corte manual, corte por micrótomo a temperatura ambiente e o corte por criostato a baixas temperaturas.

4.2.1. Corte em criostato

O corte em criostato não foi adequado devido à dificuldade de fixar a lâmina ITO no equipamento, pois não há suporte adequado para esse aparato. Ao se utilizar os outros compostos para incorporar os fios encontrou-se o mesmo problema do uso do micrótomo: a dificuldade em manter os fios alinhados para que o corte fosse satisfatório ao longo de todo o comprimento do fio.

4.2.2. Corte em micrótomo

O corte em micrótomo, utilizado parafina para imobilizar os fios, não foi adequado. Mesmo utilizando a espessura de 5 μm para realizar o corte não foi possível cortar o fio ao longo de todo o comprimento necessário (2 cm). Acredita-se que o principal motivo seja que os fios não estão alinhados na parafina, o que faz com que a lâmina atinja apenas algumas partes, não permitindo um corte simétrico ao longo de toda a fibra capilar, como é possível observar na **Figura 18**, cujos fios fixados em parafina foram cortados de forma não uniforme.



Figura 18. Cabelo fixado em parafina após tentativa de corte no micrótomo. Fonte: Autoria própria.

4.2.3 Corte manual

Os aparatos produzidos usando-se uma cortadora a laser ou uma impressora 3D não foram eficientes para os cortes dos fios, pois não foi possível ajustar a altura da lâmina e mantê-la uniforme. Além disso, quando a lâmina atingia o fio ele se descolava da fita dupla face.

Sendo assim, um aparato metálico desenvolvido foi utilizado para corte das amostras. Para isso, após a limpeza das peças metálicas, a lâmina do micrótomo foi posicionada na peça superior, os fios foram presos na lateral da placa metálica por uma fita e cortados longitudinalmente.

É de suma importância que a superfície das amostras esteja uniforme para as análises de MSI, portanto, o método de corte foi avaliado no microscópio invertido CKX41 (Olympus) onde foi possível verificar o corte ao longo de toda a extensão da fibra capilar de um cabelo liso e descolorido (**Figura 19**).

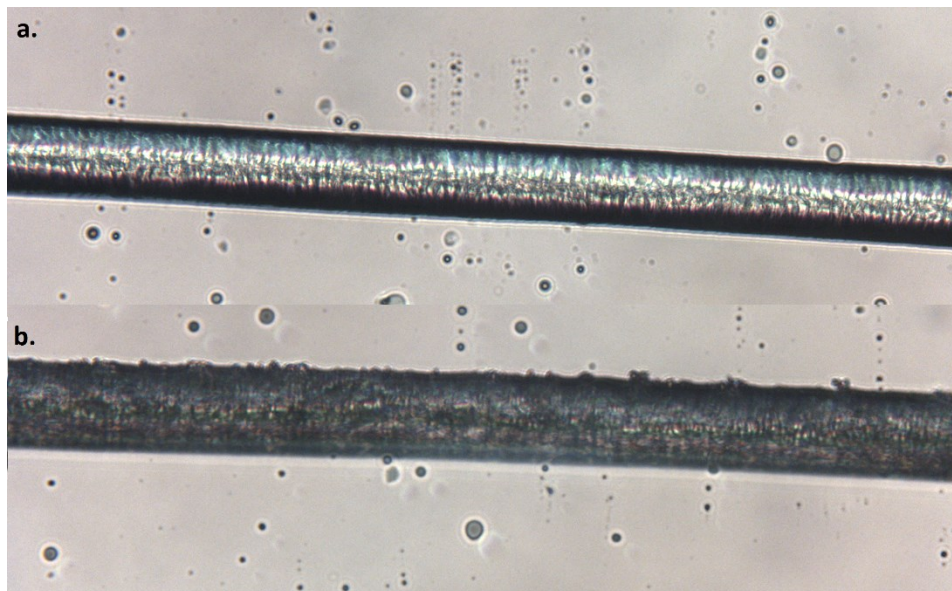


Figura 19. Imagem dos fios de cabelo liso após procedimento de descoloração com peróxido de hidrogênio e limpeza, com aumento de 20× no microscópio ótico, na qual correspondem a) ao fio intacto e b) ao fio cortado longitudinalmente. Fonte: Autoria própria.

O método de corte também foi avaliado por microscopia eletrônica de varredura (MEV) para os fios de cabelo liso natural (**Figura 20 A e B**) e o fio de cabelo cacheado descolorido (**Figura 20 C e D**). Para isso, foi realizada a deposição de carbono e avaliou-se os fios com aumento de 150× (**Figura 20 A e C**) e 700× (**Figura 20 B e D**).

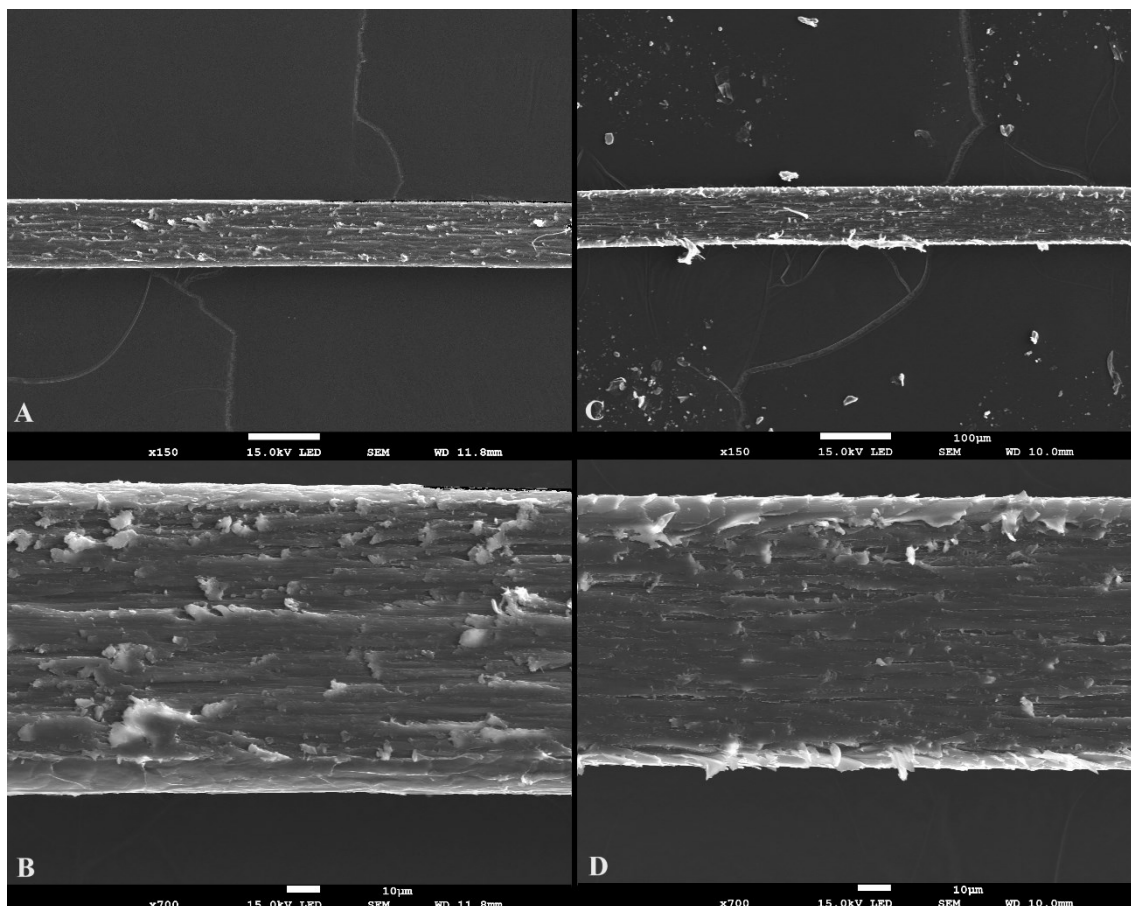


Figura 20. Análise do corte dos fios de cabelo natural e cacheado descolorido por MEV, sendo: A) Fio descolorido (150×), B) Fio descolorido (700×); C) Fio natural (150×) e D) Fio natural (700×). Fonte: Autoria própria.

Foi possível observar que o corte foi efetivo, já que expôs a região do córtex capilar. Na **Figura 20C** pode-se observar algum dano na cutícula, porém não afeta a região interna do fio. O melhor método de corte foi definido como o corte manual utilizando o aparato metálico produzido em laboratório e todos os cortes foram realizados seguindo o procedimento descrito no tópico 3.3.3.

4.3 Fixação e aplicação da matriz

As amostras foram coladas com auxílio de uma fita dupla face condutiva em lâminas ITO como representado no esquema da **Figura 14b**.

As matrizes ácido dihidroxibenzóico (DHB) e ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA) em solução aquosa de acetonitrila (1:1) em 0,1% de TFA foram avaliadas em diferentes proporções para definir qual ofereceria melhor resultado. As proporções avaliadas estão reportadas na **Tabela 3**.

Tabela 3. Proporções em m/m das matrizes DHB e HCCA avaliadas.

Proporção (m/m)	
DHB	HCCA
1	-
-	1
1	1
1	2
2	1
1	3
3	1
1	10
10	1

Com a melhor proporção definida, diferentes concentrações também foram testadas: 7 mg/mL, 8 mg/mL e 10 mg/mL. Ao final, definiu-se como a melhor condição a mistura de DHB/HCCA 1:3 com concentração de 8 mg/mL de ACN com 0,1% de TFA. A melhor condição foi definida como a que apresentou maior intensidade dos sinais na região de interesse (m/z 500- 1200).

Essa matriz foi então aplicada sobre a lâmina com auxílio do equipamento TM-Sprayer™ (HTX Technologies, LLC), o que possibilitou a deposição uniforme da matriz sob os fios.

4.4 Avaliação de parâmetros do MALDI

Com o intuito de encontrar os melhores parâmetros para aquisição dos espectros por MALDI, diversos testes foram realizados. A potência do laser, o feixe do laser, o diâmetro do foco do laser, o ganho do detector, número de disparos do laser, frequência, número de espectros adquiridos, entre outros parâmetros, encontrando assim as melhores condições de análise.

Na **Figura 21** está representada a diferença entre os espectros do óleo de abacate obtidos com os parâmetros utilizados no começo dos experimentos e o obtido após uma avaliação detalhada dos parâmetros, tanto no preparo da amostra, na matriz e nos parâmetros instrumentais. A figura mostra três espectros referentes ao óleo de abacate na região de m/z entre 840 e 950.

Em azul, o espectro foi obtido utilizando os parâmetros iniciais de aquisição, nos quais a amostra foi depositada sobre a fita ARcare®, a matriz utilizada era DHB 10 mg/mL, a potência do laser era de 90%, foco em “*medium*” e o ganho do detector em 1.856 V.

Em verde, o espectro obtido seguiu os mesmos parâmetros instrumentais, mas a amostra foi depositada diretamente na lâmina de vidro sem o uso de fitas.

Em vermelho, o espectro foi obtido variando diversos parâmetros. A amostra foi depositada diretamente na lâmina de vidro, a matriz utilizada foi uma mistura de DHB/HCCA 3:1 (v/v) em concentração de 8 mg/mL, a potência do laser em 60%, foco em “*minimum*” e o ganho do detector em 1.929 V. O ganho do detector e a potência do laser foram ajustados a cada amostra analisada.

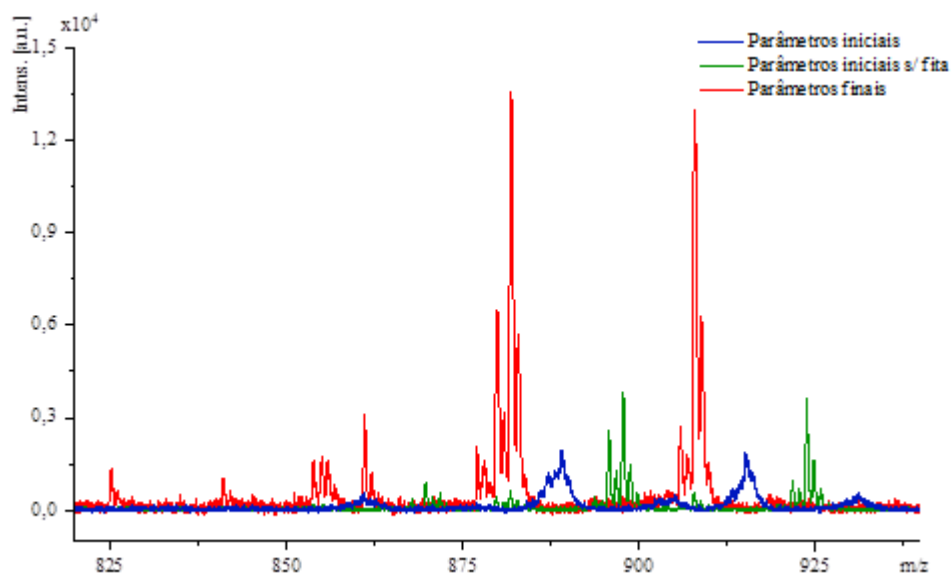


Figura 21. Comparação entre espectros MALDI-TOF MS do óleo de abacate utilizando para i) azul os parâmetros estabelecidos no início dos experimentos com fita dupla face ARcare, ii) em verde os parâmetros iniciais sem a fita dupla face sob a amostra, e iii) em vermelho os parâmetros otimizados sem fita dupla face. Fonte: Autoria própria.

Observando os resultados foi possível definir que era imprescindível retirar a fita sob a amostra ou buscar novas possibilidades de fitas, já que a fita ARclad causou grande interferência no espectro do óleo de abacate. A busca de diferentes materiais para fixar as amostras de cabelo é essencial quando há a necessidade de análise do bulbo capilar, uma vez que prender a amostra com fita sobre as extremidades do fio não é uma opção.

Além disso, a mistura de matrizes DHB/HCCA 3:1 (v/v) passou a ser utilizada nas análises dos fios de cabelo. Os parâmetros instrumentais adotados a partir dos testes estão dispostos na **Tabela 4**.

Tabela 4. Parâmetros de aquisição de imagens no MALDI-TOF MS.

Parâmetros de aquisição			
Modo de aquisição	MALDI <i>Imaging</i>	Espectros adquiridos	6-10
Polaridade	Positivo	Nº de tiros do laser (shots)	500-1.000
Menor <i>m/z</i> adquirida	200	Potência do laser	60-95%
Maior <i>m/z</i> adquirida	2.000	Frequência	2.000 Hz
Ganho do detector (refletor)	1.929V-2.1V	Foco do laser	<i>Minimum</i>

4.5 Teste de fitas para fixação de amostra

Com a necessidade de encontrar novas fitas que tornassem possível a fixação das amostras sem grandes interferências nos resultados, o padrão de Angiotensina I foi avaliado utilizando as fitas ARcare®, Adelbras®, ARclad® e fita de alumínio em até três camadas. Além da avaliação visual dos espectros, que se encontram no Anexo I, foram realizadas análises estatísticas para determinar o comportamento dos sinais no espectro entre as fitas e camadas testadas. Foi utilizada a PCA (análise de componentes principais) para verificar a correlação dos espectros do padrão de Angiotensina I considerando toda a faixa de *m/z* entre 1.280 e 1.400 (**Figura 22**).

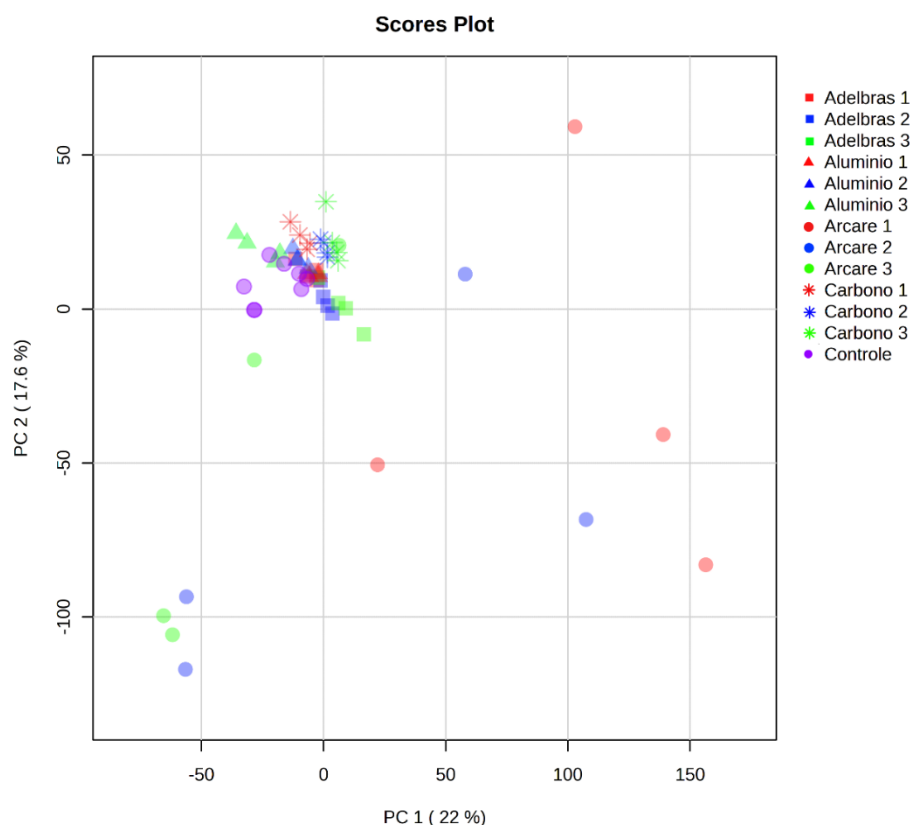


Figura 22. Análise de componentes principais utilizando a faixa de m/z entre 1.280 e 1.400 para o padrão de Angiotensina I para os estudos das fitas adesivas e a altura das amostras em função do número de fitas. Fonte: Autoria própria.

O círculo roxo representa o controle (0). Para as fitas, as cores i) vermelho representam uma camada, ii) azul duas camadas, e iii) verde claro três. Os quadrados representam as fitas Adelbras®, os triângulos representam as fitas de alumínio, os círculos representam a fita ARcare®, e os asteriscos a tira ARclad®.

Pode-se observar que, independentemente do número de camadas, a fita de alumínio apresentou resultado muito semelhante ao do controle, isso pode ser verificado pelos triângulos, que estão mais próximos aos círculos roxos do controle. Já as fitas Adelbras®, representada pelos quadrados, ficou mais distante do controle, sendo uma camada de fita a que apresenta valor mais próximo. A maior discrepância com relação ao controle foi detectada para as diferentes camadas de fita Arcare®, representada pelos triângulos.

Para avaliar o deslocamento em função da m/z entre as diferentes fitas e diferentes camada verificando a diferença estatística, foi selecionado o sinal mais intenso referente ao íon $[M+H]^+$, referente ao padrão de Angiotensina I, e foi realizada a análise de

variância (ANOVA). Portanto, a análise foi em esquema fatorial com um adicional, 3×4+1 (3 camadas de fitas, 4 modelos de fita distintos + um controle), sendo complementado com o teste de Tukey. Na **Tabela 5** está representado os valores médios (4 repetições) do sinal mais intenso referente ao íon [M+H]⁺ referente ao padrão de Angiotensina I.

Tabela 5. Valores médios do sinal mais intenso referente ao íon [M+H]⁺ referente ao padrão de Angiotensina I de diferentes fitas e com diferentes números de camadas.

Controle	1.296,81 [#]	SD 0,11						
Fitas/ Camadas	Adelbras®	SD	ARcare®	SD	Alumínio	SD	ARclad®	SD
1	1.299,337 ^{b A#}	0,37	1.307,678 ^{a C}	3,06	1.296,858 ^{b A#}	0,26	1.296,01 ^{b A#}	0,03
2	1.301,224 ^{b A}	0,57	1.312,676 ^{a B}	5,78	1.296,403 ^{c A#}	0,13	1.295,44 ^{c A#}	0,04
3	1.301,518 ^{b A}	0,84	1.316,286 ^{a A}	1,81	1.296,946 ^{c A#}	0,20	1.294,80 ^{c A#}	0,02

Médias seguidas de letras iguais, na linha minúscula e na coluna maiúscula, não diferem pelo teste de Tukey a 5% p-value < 0,01 para todas as causas de variação (anexo 1)

Médias seguidas de # não diferem do controle (0 fitas)

Quando comparamos as fitas entre si, temos que as fitas Adelbras®, Alumínio e ARclad® não apresentam diferença entre si considerando uma camada, porém diferem da ARcare®. Para as demais camadas as fitas Adelbras® e ARcare® diferem, enquanto a de Alumínio e a ARclad® não apresentam diferença.

É possível observar que não houve diferença significativa entre o uso das diferentes camadas de fita Adelbras®, porém apenas utilizando uma camada de fita o resultado não diferiu do controle. Ao utilizar a fita ARcare®, fita não condutiva de maior espessura, além do resultado de todas as diferentes camadas apresentarem diferença do controle, o teste de uma camada diferiu dos testes com duas e três camadas. Já os resultados da fita de alumínio e da ARclad®, fitas condutivas, não apresentaram diferença do controle, nem entre as camadas, mostrando um resultado mais propício para o uso. Como a fita de alumínio é a única fita que possui apenas uma face colante, o que torna difícil seu uso na fixação de amostras, a fita ARclad® foi considerada a mais adequada para fixar as amostras sob o comprimento dos fios, enquanto a de alumínio pode ser usada para fixar os fios pelas extremidades (Esquema de fixação das amostras na **Figura 14**).

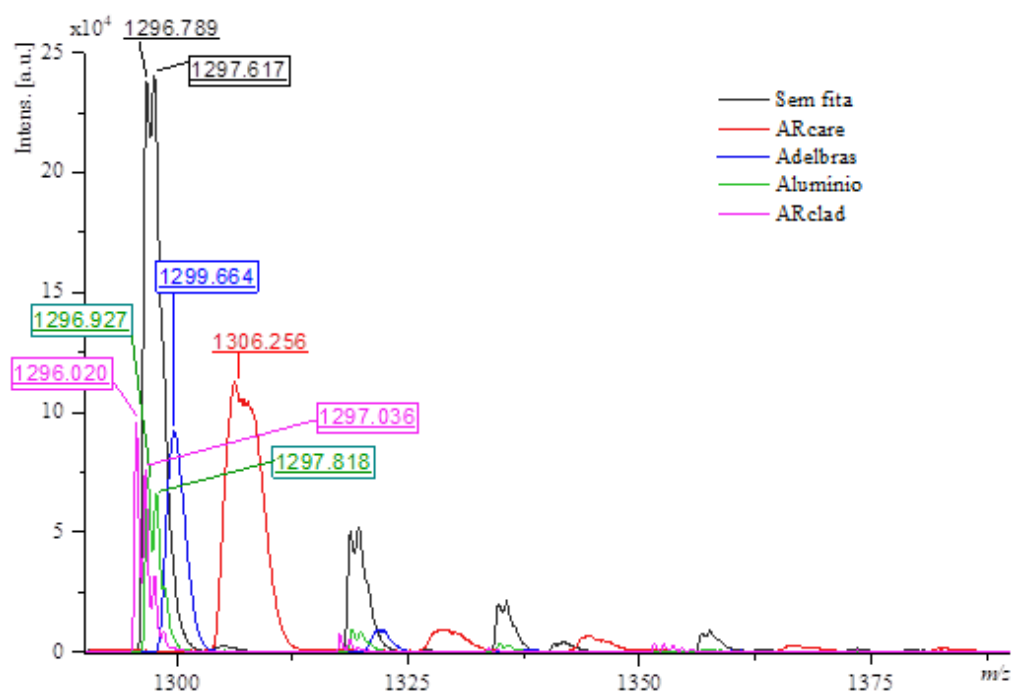


Figura 23. Comparação dos espectro MALDI-TOF MS do padrão de Angiotensina I aplicado diretamente na lâmina ITO (preto) e sobre as fitas ARcare (vermelho), Adelbras (azul), alumínio (verde) e ARclad (rosa), com seus respectivos valores de m/z . Fonte: Autoria própria.

Como o cabelo não é condutor e possui uma espessura considerável, cerca de 80 μm intacto e acima de 40 μm após o corte, comparou-se também o sinal mais intenso do padrão (referente ao íon $[M+H]^+$), que foi depositado sobre um fio de cabelo intacto e um fio cortado. Os resultados da análise encontram-se na **Tabela 6**.

Tabela 6. Valor médio do sinal mais intenso do padrão (próximo de m/z 1.297, referente ao íon $[M+H]^+$ do padrão de Angiotensina I), que foi depositado sobre um fio de cabelo intacto, um fio cortado e do controle.

Amostra	Média do sinal
Fio intacto	1.297,51 A
Fio cortado	1.297,44 A
Controle	1.296,74 B

Médias seguidas de letras iguais não diferem pelo teste de Tukey a 5%

O resultado obtido pela ANOVA mostra que, ao analisar sinal referente ao íon $[M+H]^+$ do padrão de Angiotensina I sobre os fios intactos e cortados, houve diferença significativa com relação ao controle. Ou seja, os valores de m/z encontrados para esse íon nas análises do fio intacto e cortado possuem diferença significativa com relação ao m/z do mesmo íon obtido para o controle. Esse fator demonstra que pode ocorrer deslocamento dos valores de m/z ao comparar o analito adicionado diretamente à lâmina do equipamento e o analito incorporado ao fio de cabelo, sendo que o deslocamento ocorre para valores maiores de m/z com alturas maiores. Pela média dos sinais é possível constatar que o deslocamento é próximo de 0,7 em m/z para os fios cortados. Fatores de calibração podem ser aplicados diretamente nos softwares do equipamento para diminuir o impacto dos deslocamentos causados pela espessura do fio.

4.6 Análises dos óleos

4.6.1 Análise dos óleos por GC-MS e GC-FID

Os óleos foram caracterizados por GC-MS e GC-FID a fim de compreender sua composição em função dos ácidos graxos. Um padrão de 37 ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) foi utilizado para quantificação dos ácidos graxos por GC-FID e os espectros de massas obtidos por GC-MS foram utilizados para identificar e confirmar os compostos encontrados em comparação com uma biblioteca de dados. A análise foi realizada em três repetições. A **Tabela 7** apresenta a composição, em porcentagem, de

ácidos graxos presentes nos óleos obtida pela média das três repetições e seus respectivos desvios padrões (DP).

O óleo de argan é rico em ácido oleico (C18:1n-9), um ácido graxo monoinsaturado comumente encontrado em óleos vegetais, que representa 49,0% do total de ácidos graxos do óleo de argan, seguido pelo ácido linoleico (C18:2n-6), um ácido graxo com duas insaturações, correspondente a 30,9% e pelo ácido palmítico (C16:0), ácido graxo saturado que representa 13,6% da composição. Portanto, podemos afirmar que o óleo de argan é composto majoritariamente por ácidos graxos insaturados com cadeias de 18 carbonos.

Tabela 7. Composição de ácidos graxos presentes nos óleos de argan, abacate e coco e seus respectivos desvios padrão (DP).

Ácidos Graxos	CN:B	Óleo de argan (%)	DP	Óleo de abacate (%)	DP	Óleo de coco (%)	DP
Capróico	C6:0	-	-	-	-	0,55	0,01
Caprílico	C8:0	-	-	-	-	7,62	0,08
Cáprico	C10:0	-	-	-	-	5,89	0,04
Láurico	C12:0	0,03	0,01	0,02	0,01	48,88	0,06
Mirístico	C14:0	0,15	0,01	0,05	0	18,54	0,04
Palmítico	C16:0	13,59	0,08	18,09	0,07	8,82	0,02
Palmitoleico	C16:1	0,11	0	7,43	0,03	-	-
Esteárico	C18:0	5,15	0	0,50	0,01	2,36	0,01
Oleico	C18:1n-9	49,02	0,04	63,49	0,08	5,88	0,01
Linoleico	C18:2n-6	30,92	0,05	9,57	0,07	1,30	0
Y-linolênico	C18:3n-6	0,07	0	0,43	0	-	-
Araquídico	C20:0	0,30	0	-	-	-	-
Não identificado	-	0,41	0,22	0,43	0,03	0,17	0

O óleo de abacate possui uma quantidade relativa ainda maior de ácido oleico, representando 63,5% da composição de ácidos graxos, enquanto o ácido palmítico é o segundo maior em concentração com 18,1%, seguido pelo ácido linoleico que corresponde a 9,6%. Sendo assim, o óleo de abacate é composto por ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados.

Já o óleo de coco apresenta cadeias de ácidos graxos saturados menores, como os ácidos capróico, caprílico e cáprico, que não são encontrados nos óleos de argan e abacate. Ademais, possui como componente principal o ácido láurico (C12:0), com 48,9% da concentração total de ácidos graxos, seguido do ácido mirístico (C14:0) que representa 18,5% e do ácido palmítico (C16:0), que corresponde a 8,8%. Portanto, o óleo de coco é rico em ácidos graxos de cadeias médias e saturadas.

Apesar da análise por GC ser capaz de identificar e quantificar os ácidos graxos que compõem os óleos, não podemos inferir se eles se encontram livres ou ligados, como em moléculas de DAG ou TAG. Para identificar os componentes dos óleos foi realizada a análise no ESI-MS com injeção direta.

4.6.2 Análise dos óleos por ESI-MS

Os óleos foram preparados em solução na concentração de 50 ppm dos óleos em metanol, com 3,5 ppm de éter 18-coroa-6 e 0,3% de TFA, para proporcionar a maior formação de íons $[M+H]^+$, já que o éter coroa sequestra os íons Na^+ e K^+ , como mostra o esquema da **Figura 24**.

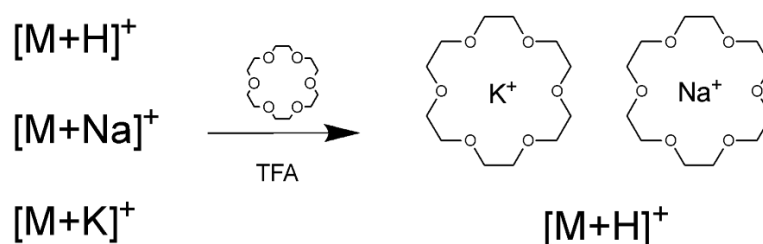


Figura 24. Esquema do uso do éter 18-coroa-6 e TFA para captura dos íons K^+ e Na^+ , favorecendo a protonação do analito de interesse (DAG E TAG). Adaptado de TONIN et al., 2017.

Utilizando esse método, os óleos de argan, abacate e coco foram analisados em triplicata. Foi possível observar os ácidos graxos estão majoritariamente na forma de TAG e DAG, como já é esperado em óleos vegetais. Os espectros obtidos, com destaque

para as áreas onde busca-se encontrar TAG e DAG protonados, se encontram da **Figura 25**.

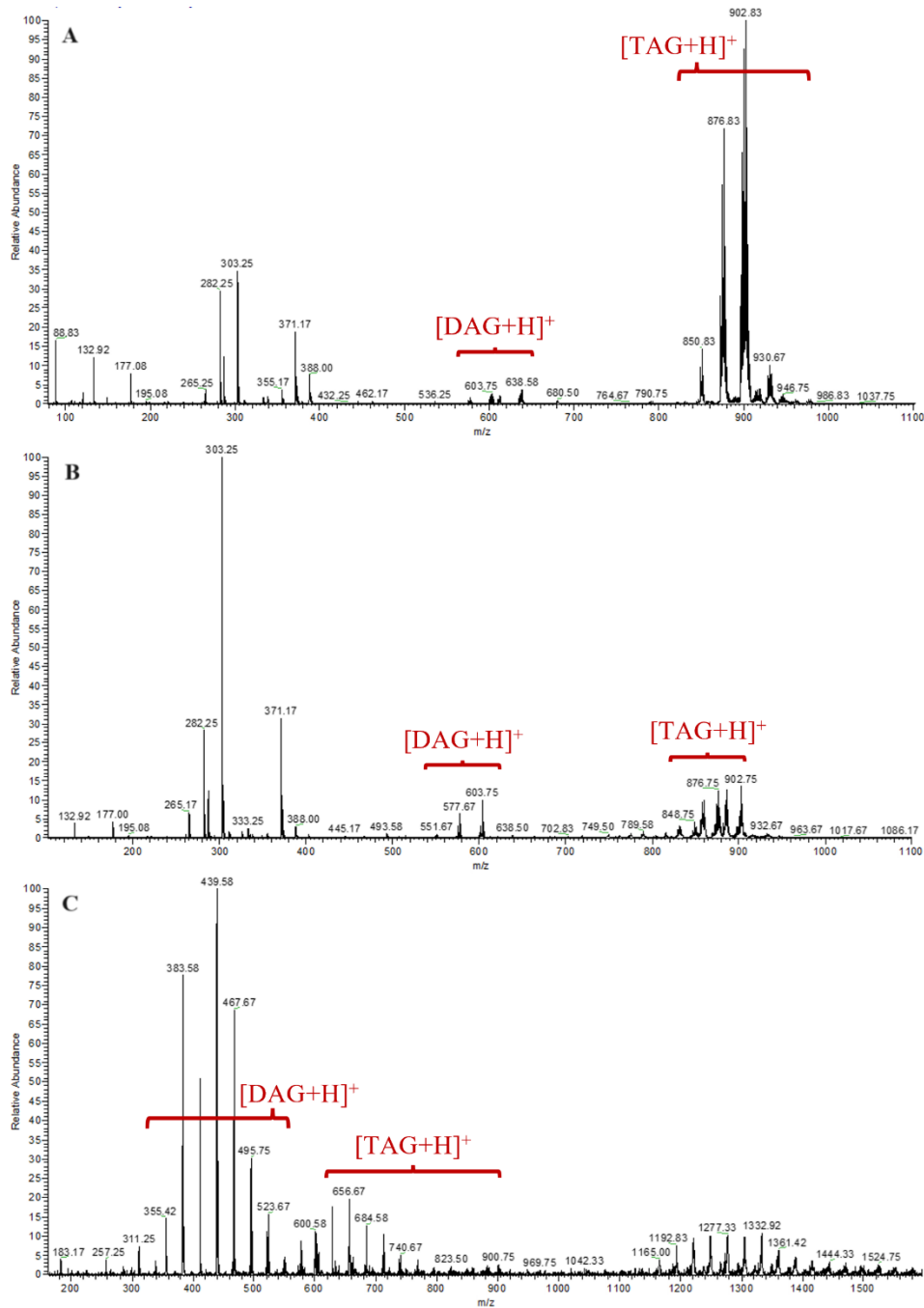


Figura 25. Espectros das análises dos óleos por injeção direta no ESI-LTQ, utilizando éter 18-coroa-6, dos quais A) óleo de abacate (m/z 80-1.100); B) argan (m/z 100-1.110) e C) coco (m/z 180-1.600), com destaque para as áreas onde se encontram DAG e TAG. Fonte: Autoria própria.

4.6.3 Análise dos óleos por MALDI-TOF-MS

A análise dos óleos com os quais os fios de cabelo foram tratados foi realizada por MALDI-TOF MS para definir a faixa de m/z de interesse e encontrar os sinais relacionados a cada óleo. Os óleos foram preparados em 2 mL de THF, seguindo a proporção 20 $\mu\text{L/mL}$. Frequentemente o uso de DHB é citado para análise de lipídios, porém misturas de matrizes podem ser boas alternativas para melhorar a ionização. Portanto, as matrizes DHB e HCCA foram avaliadas em diferentes proporções. Observando a intensidade dos espectros e o número de sinais obtidos, a mistura escolhida para as análises foi de DHB/HCCA 3:1, devido a um aumento na intensidade dos sinais na região dos triacilgliceróis, como mostra o espectro do óleo de abacate na **Figura 26**, na qual foi avaliado o uso de DHB (verde) e a mistura DHB/HCCA 3:1 (v/v) (preto).

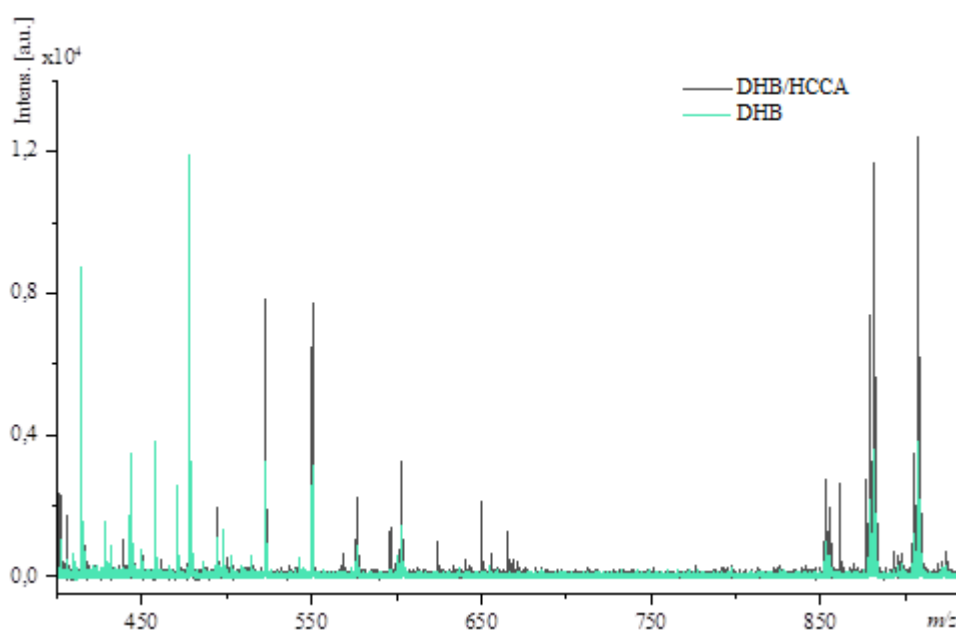


Figura 26. Espectro MALDI-TOF-MS do óleo de abacate utilizando DHB (verde) e a mistura DHB/HCCA 3:1 (v/v) (preto) como matriz. Fonte: Autoria própria.

Seguindo os parâmetros finais de análise, com ajuste do ganho do detector, foram avaliadas o uso na matriz DHB/HCCA 3:1 8 mg mL^{-1} na proporção de amostra e matriz

1:2 e DHB/HCCA 3:1 8 mg mL⁻¹ com trifluoroacetato de sódio (TFANa) 1 mg.mL⁻¹ de THF como agente cationizante na proporção de matriz, amostra e TFANa 4:2:1.

O óleo de abacate (**Figura 27**) apresentou sinais de maior interesse na região de m/z entre 850 e 980, que podem estar relacionados à TAGs, além de sinais na região de $m/z < 740$. Foi possível observar que, quando o TFANa foi adicionado à matriz (vermelho), houve o surgimento de um sinal intenso em m/z 656,015, porém não houve aumento considerável na intensidade dos demais sinais.

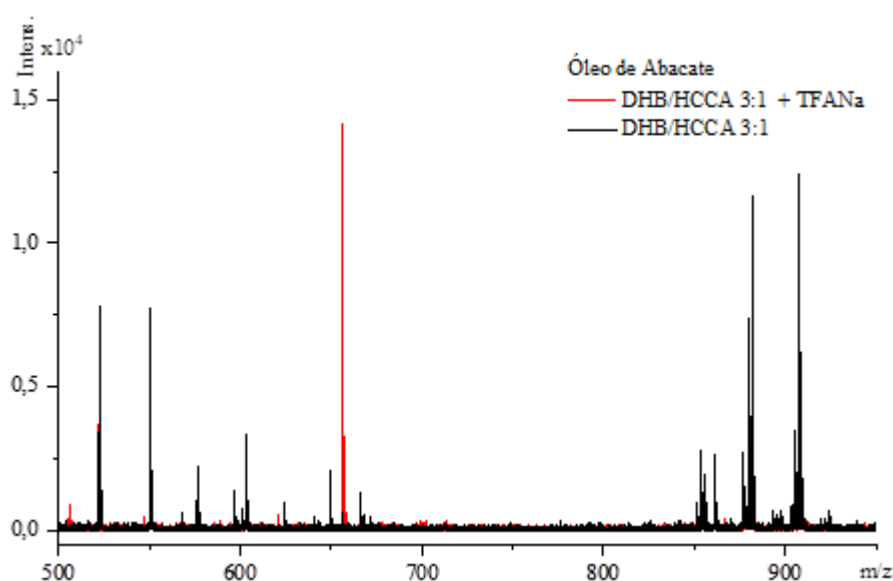


Figura 27. Espectro de MALDI-TOF-MS no óleo de abacate de na região de m/z 580-930, sendo em preto a análise somente do óleo utilizando DHB como matriz e em vermelho a análise do óleo, DHB e trifluoroacetato de sódio. Fonte: Autoria própria.

No espectro de massas do óleo de argan (**Figura 28**) foi possível observar sinais na região de m/z entre 850 e 1.080 e na região de $m/z < 710$. Assim como aconteceu com o óleo de abacate, quando TFANa foi adicionado (vermelho), houve o surgimento de um sinal intenso em m/z 655,961, porém não houve aumento considerável na intensidade dos demais sinais.

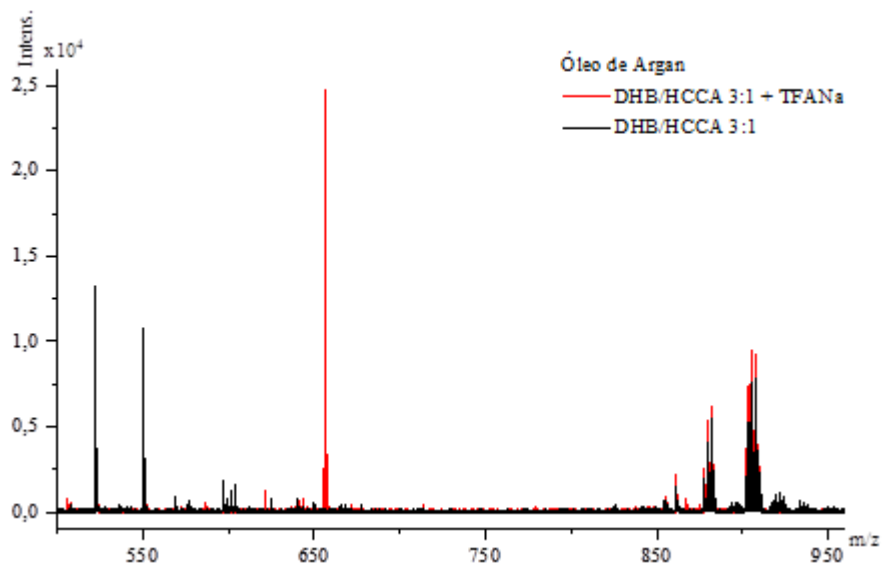


Figura 28. Espectro de MALDI-TOF-MS no óleo de argan de na região de m/z 580-1.080, sendo em preto a análise somente do óleo utilizando DHB como matriz e em vermelho a análise do óleo, DHB e trifluoroacetato de sódio. Fonte: Autoria própria.

Já o espectro de massas do óleo de coco (**Figura 29**) não apresentou sinais na região de m/z acima de 750, apenas da região de m/z <750. Houve o surgimento do sinal em m/z 655,926, mas também não houve aumento significativo dos demais sinais que justificassem o uso de TFANa no preparo da matriz.

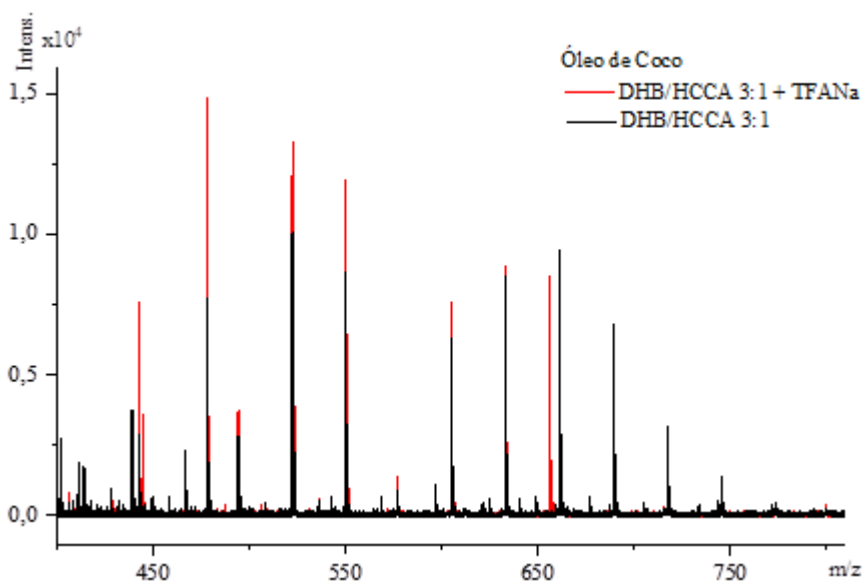


Figura 29. Espectro de MALDI-TOF-MS do óleo de coco de na região de m/z 450-800, sendo em vermelho a análise somente do óleo e a matriz e em preto a análise do óleo, DHB e trifluoroacetato de sódio. Fonte: Autoria própria.

Devido a pouca diferença na melhora da ionização, que pode ser observada pela intensidade semelhante dos espectros na região de interesse para os três óleos, optou-se por não utilizar o TFANa nas análises.

4.7 Análise dos fios de cabelo por MALDI-TOF-MS

Inicialmente, testou-se os fios após tratamento com os óleos com e sem a etapa de limpeza. Buscou-se compreender a influência dessa etapa na análise, já que havia uma preocupação sobre o processo de limpeza retirar compostos incorporados ao fio.

Os espectros dos fios após tratamento com três óleos não mostraram indícios de que a etapa de limpeza retira componentes incorporados a fibra capilar. É possível observar na **Figura 30**, que apresenta os espectros com e sem a etapa de lavagem após tratamento com o óleo de abacate, que a lavagem das amostras possibilitou o aumento da intensidade de alguns sinais. Uma hipótese para isso pode ser devido a retirada de interferentes que causam a supressão iônica devido a competição durante a ionização.

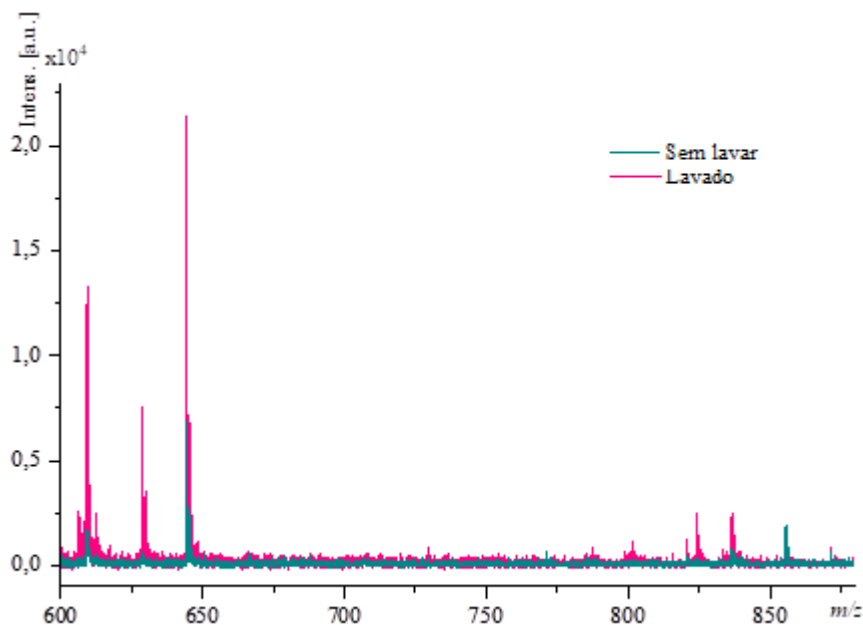


Figura 30. Espectros MALDI-TOF-MS dos fios de cabelo tratados com óleo de abacate sem etapa de limpeza (verde) e após etapa de limpeza (rosa), na região de m/z entre 600 e 880. Fonte: Autoria própria.

Para garantir que os sinais observados após o tratamento com os óleos não são vindos de resíduo do óleo aplicado a superfície do fio, optou-se por continuar o preparo das amostras com a etapa de lavagem com LESS, assegurando que os sinais obtidos são advindos de compostos incorporados ao fio.

4.7.1 Avaliação dos tipos de cabelo

Utilizando os parâmetros ajustados, disponibilizados na **Tabela 4**, espectros dos fios de cabelo seccionados foram obtidos, nos quais buscou-se indícios de que os óleos foram incorporados ao fio.

Inicialmente, três tipos de cabelo foram selecionados para as análises: liso natural, liso descolorido e cacheado descolorido. Buscou-se avaliar se, entre eles, existiria diferença na incorporação dos óleos. A **Tabela 8** mostra os dados obtidos para os três tipos de fio distintos, submetidos ao mesmo tratamento com os óleos de argan, abacate e coco.

É possível observar que, para os cabelos lisos naturais e descoloridos, não foi possível visualizar sinais diferentes do controle após o tratamento com os três óleos. Já no cabelo cacheado descolorido, foi possível observar diversos sinais que não estavam presentes no espectro do controle que estão destacados em azul claro na **Tabela 8**.

Sabe-se o que fio fica fragilizado após o processo de descoloração, consequência do processo de oxidação a qual esse cabelo foi submetido, o que explica a maior incorporação dos óleos nos fios descoloridos. Apesar disso, o fio liso e descolorido não apresentou sinais após o tratamento com os óleos vegetais. Como o cabelo cacheado e descolorido apresentou a maior quantidade de sinais que diferem do controle ele foi selecionado para o restante das análises.

Tabela 8. Sinais obtidos nos espectros de MALDI-TOF-MS para os três tipos de cabelo (liso descolorido, liso natural e cacheado descolorido) seccionados após tratamento com os óleos de argan, abacate e coco e o controle (sem tratamento), com destaque em azul para os sinais que não aparecem no controle.

Trat.	Cabelo liso descolorido				Cabelo liso natural				Cabelo cacheado descolorido				
	Argan	Abacate	Coco	Controle	Argan	Abacate	Coco	Controle	Argan	Abacate	Coco	Controle	
Sinais (m/z)	-	364,099	-	364,077	-	-	-	-	364,092	364,12	364,191	-	
	-	367,916	-	367,899	-	-	-	-	367,894	-	367,156	-	
	368,544	368,533	368,562	368,502	368,494	368,528	368,525	368,496	368,518	368,539	368,422	368,588	
	379,247	379,214	379,208	379,169	379,197	379,194	379,218	379,169	379,213	379,223	379,243	379,26	
	382,076	382,14	382,154	382,096	382,134	382,073	382,143	382,129	382,114	382,137	382,226	382,198	
									388,505				
	417,095	417,16	417,187	417,141	417,113	417,119	417,18	417,141	417,155	417,177	417,268	417,276	
										420,124			
	441,194	441,175	441,202	441,136	441,08	441,104	441,181	441,139	441,183	441,191	441,215	-	
	-	443,181	-	443,14	-	-	443,188	443,139	443,2	443,197	443,215	-	
	-	-	-	-	494,752	-	494,773	494,734	-	-	-	-	
									501,264	501,264			
	522,74	522,815	522,86	-	522,797	522,787	522,812	522,781	-	522,83	-	-	
									536,292	536,299			
	550,805	550,869	550,921	-	550,846	550,839	550,87	550,836	-	550,892	-	-	
									571,333	571,341	571,361		
									574,246	574,281			
										606,379			
	609,457	609,51	609,338	609,52	-	-	-	-	609,284	609,312	609,691	-	
										612,25	612,373		
									628,713				
644,343	644,316	644,377	644,292	644,318	644,252	644,35	644,301	644,331	644,362	644,47	644,476		
									823,989				
								836,479	836,483	836,615			
								855,522	855,505				
										1.025,681			
										1.028,72			
-	1.060,635	1.060,785	-	-	-	1.060,674	1.060,684	1.060,653	1.060,689	1.060,731	1.060,861		

4.7.2 Comparação dos tipos de fixação

As amostras também foram avaliadas pela fixação na lâmina ITO com fita de alumínio (pela extremidade do fio) e com a fita ARclad® (sobre os fios), já que as duas apresentaram resultados satisfatórios. Os sinais obtidos para ambas as análises, considerando a região de m/z entre 350 e 1.100, estão dispostos na **Tabela 9**.

Tabela 9. Sinais obtidos nos espectros de MALDI-TOF-MS dos fios de cabelo tratados com os óleos de argan, abacate e coco e do controle (fio sem tratamento), fixados nas extremidades com fita de alumínio e sob os fios com fita ARclad®.

Fitas	Alumínio				ARclad®			
	Argan	Abacate	Coco	Controle	Argan	Abacate	Coco	Controle
Sinais (m/z)	364,092	364,120	364,191	-	363,530	363,615	363,558	363,519
	367,894	-	367,156	-	367,317	-	367,340	367,312
	368,518	368,539	368,422	368,588	367,937	-	-	-
	379,213	379,223	379,243	379,260	378,640	378,694	378,673	378,617
	382,114	382,137	382,226	382,198	381,547	381,635	381,577	381,549
	388,505							
	417,155	417,177	417,268	417,276	416,593	416,682	416,633	416,590
		420,124			419,518	419,575	419,558	
					438,602	438,652	438,641	
	441,183	441,191	441,215	-	440,600	440,686	440,645	440,581
	443,200	443,197	443,215	-	442,605	442,696	442,653	442,590
			454,646				454,650	
	501,264	501,264						
	-	522,830	-	-	522,214	522,335	-	-
	536,292	536,299				535,839		
	-	550,892	-	-	550,270	550,391	-	-
	571,333	571,341	571,361		570,719	570,869	570,772	
	574,246	574,281			573,635		573,702	
		606,379						
	609,284	609,312	609,691	-	608,668	608,773	608,742	608,670
		612,250	612,373					
		628,713			627,719	627,875		
	644,331	644,362	644,470	644,476	643,711	643,876	643,791	643,687
						649,899	649,812	
					665,712	665,888	665,792	
							681,8765	
					803,754		803,879	
						819,986	819,861	
		823,989						
	836,479	836,483	836,615		835,743	835,979	835,843	
					838,792		838,918	
	855,522	855,505			854,769	855,016	854,899	
					870,733	870,999	870,872	
		1.025,681						
		1.028,720						
1.060,653	1.060,689	1.060,731	1.060,861	-	1.060,046	-	-	

Apesar do uso das duas fitas apresentarem resultados semelhantes, já que diversos sinais são observados através dos dois métodos de fixação, alguns diferem, aparecendo apenas em um método. Por isso, foi realizada uma análise de componentes principais (PCA) a fim de verificar a correlação dos espectros, considerando todos os pontos do espectro na região de m/z entre 350 e 1.200 com intensidade maior que 1.000 para alguma das amostras. Os resultados da PCA se encontram na **Figura 31**.

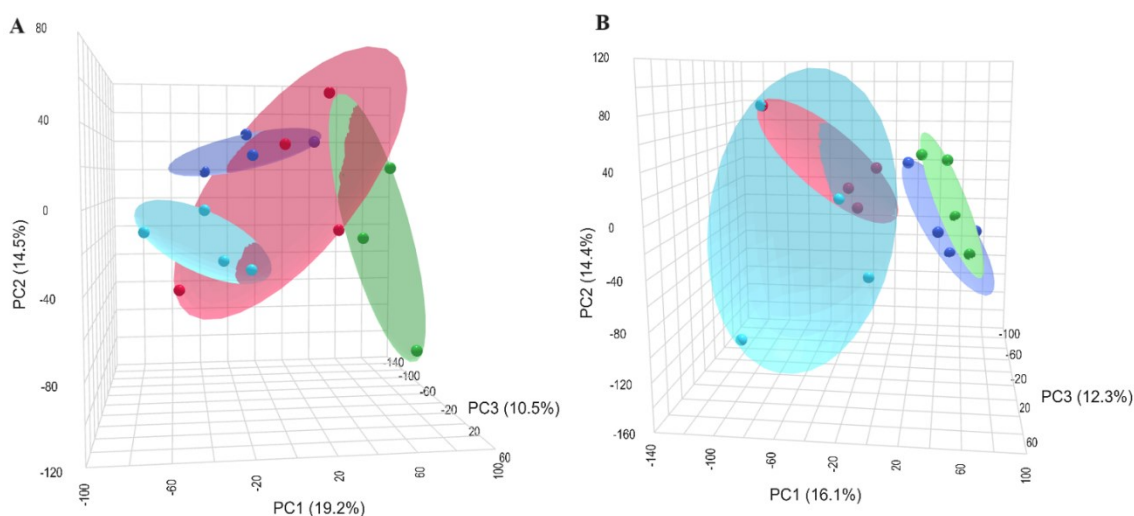


Figura 31. PCA dos espectros MALDI-TOF-MS (m/z 350–1.200; intensidade >1.000 u.a.) dos cabelos tratados com os óleos de argan (vermelho), abacate (verde), coco (azul escuro) e o controle (azul claro), sendo A) fixados com fita de alumínio e B) fixados com fita ARclad. Fonte: Autoria própria.

É possível observar que os fios de cabelo após o tratamento com os óleos de abacate (verde) e coco (azul escuro) não apresentaram resultado semelhante ao controle (azul claro), em ambas as análises, mostrando que houve influência do tratamento com o óleo nas hastas capilares. Já para o tratamento com o óleo de argan (vermelho), algumas amostras apresentaram resultados semelhantes ao controle, mostrando que o óleo penetra menos no fio de cabelo quando comparado aos outros tratamentos, fator que pode ser explicado pela composição do óleo de argan.

Quando a fita de alumínio é usada (A) os dados ficam mais discrepantes, mostrando uma maior variabilidade de resposta e, portanto, influência no resultado da

análise. Esse aumento da variabilidade de resposta era esperado já que a fixação pela extremidade pode gerar uma leve curvatura dos fios, acarretando uma diferença na distância dos fios com relação a lâmina ITO.

Foram realizadas 10 repetições para o tratamento com óleo de abacate, a fim de verificar se há grandes variações em função na m/z para um mesmo tratamento. A **Tabela 10** apresenta três sinais (início, meio e fim) do espectro e os desvios padrões para seus respectivos valores de m/z .

Tabela 10. Sinais do início, meio e final da faixa de m/z do espectro de MALDI-TOF-MS para as 10 repetições do tratamento com óleo de abacate, as médias de m/z de cada sinal e seus respectivos desvios padrões (DP), para fixação dos fios com fita de alumínio e ARclad.

Rep.	Alumínio			Arclad®		
a	283,966	644,043	855,160	283,793	643,745	854,831
b	283,957	644,046	855,304	283,787	643,724	854,798
c	283,963	644,099	855,204	283,775	643,754	854,836
d	283,960	644,053	855,204	283,817	643,789	854,869
e	283,952	644,022	855,215	283,791	643,752	854,832
f	283,970	644,057	855,230	283,792	643,804	854,850
g	283,953	644,021	855,146	283,827	643,876	855,016
h	283,946	644,028	855,176	283,811	643,805	854,920
i	284,041	644,174	855,410	283,800	643,805	854,915
j	283,972	644,063	855,208	283,768	643,773	854,864
Média	283,968	644,061	855,226	283,796	643,783	854,873
DP	0,027	0,046	0,078	0,018	0,043	0,063

Os desvios aumentam para m/z maiores, como é possível observar em ambas os métodos de fixação dos fios. O desvio foi maior para fita de alumínio, o que era esperado devido a fixação pela extremidade deixar os fios menos uniformes, porém para ambas o desvio não ultrapassou 0,08 unidades de m/z . A **Figura 32** mostra os espectros de 10 fios de cabelo tratados com óleo de abacate na região de m/z entre 643,5 e 650,5, na qual é possível observar alguns sinais, como o sinal próximo de m/z 644, usado no cálculo dos desvios, e o sinal próximo a m/z 650, um dos sinais que indicam a incorporação do óleo

no cabelo, sendo em A o espectro com fixação pela fita de alumínio e em B o espectro com fixação pela fita Arclad®.

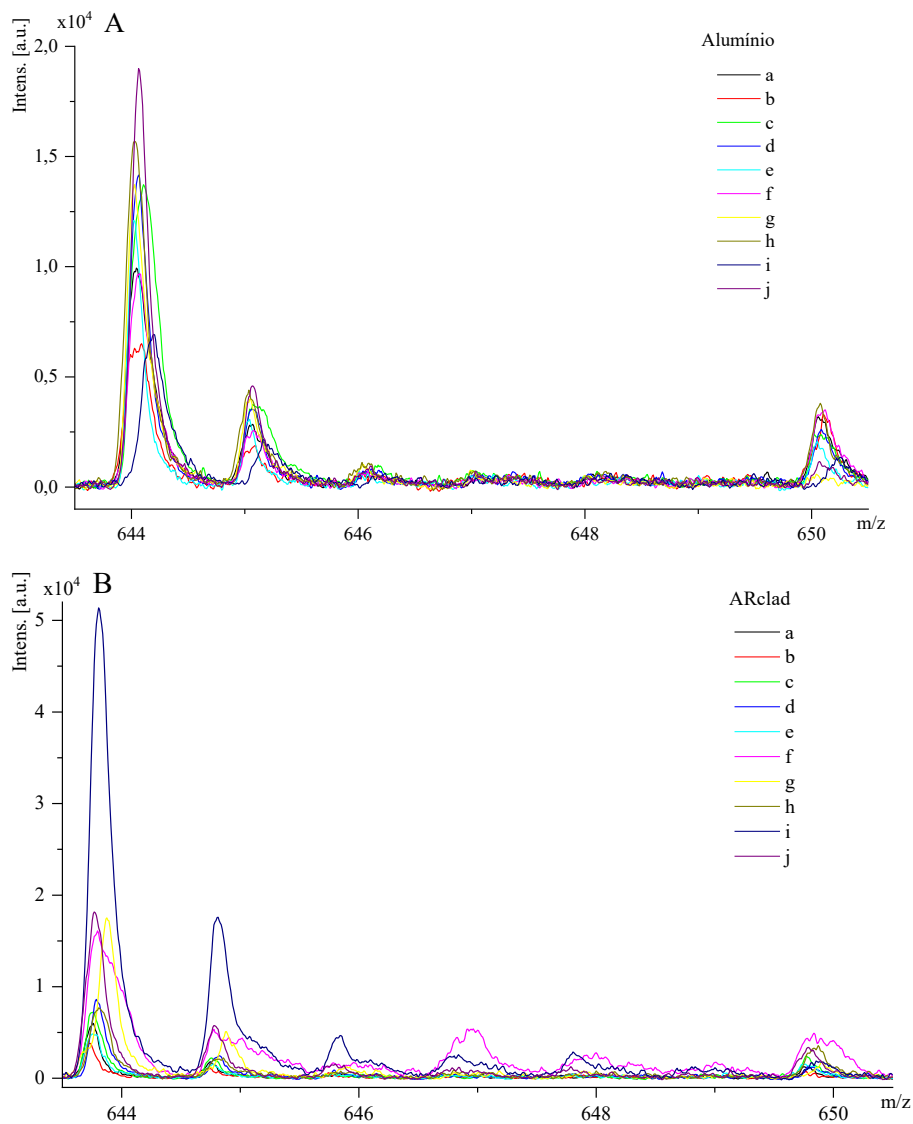


Figura 32. Espectro MALDI-TOF-MS de 10 fios de cabelo tratados com óleo de abacate na região de m/z entre 643,5 e 650,5 A) fixados com fita de alumínio e B) fixados com fita ARclad®, para visualização dos desvios com relação a m/z entre as repetições do tratamento. Fonte: Autoria própria.

Quando comparamos os sinais com relação a intensidade, é possível observar que ela é muito semelhante para os espectros obtidos pelos dois métodos de fixação. Os

espectros nos quais utilizou-se a ARclad® mostram sinais de baixa intensidade mais proeminentes do que com a fita de alumínio, porém a intensidade de um dos espectros (repetição i) foi muito maior quando comparado aos outros espectros.

Apesar dos valores serem muito próximos e as duas fitas serem consideradas boas para análise, podem ocorrer discrepâncias entre os espectros de um mesmo tratamento, principalmente com relação a intensidade, fator que deve ser observado com cautela durante a aquisição dos dados.

4.7.3 Comparação entre os fios tratados e óleos vegetais

O tratamento em fibras cacheadas e descoloridas com óleo de argan foi o que apresentou menores diferenças com relação ao controle. Isso ocorre pois o óleo de argan é composto principalmente por ácidos graxos monoinsaturados (oleico) e poli-insaturados (linoleico). As poli-insaturações modificam a estrutura terciária das moléculas, deixando-as mais apolares, com menor atividade, resultando em uma tendência aumentada a ocorrência de impedimento estérico (RIBEIRO, 2021). A **Figura 33** ilustra o espectro MALDI-TOF-MS de uma fibra capilar cortada longitudinalmente e descolorida, descolorida tratada com óleo de argan e do óleo de argan e os sinais obtidos na região de m/z entre 350 e 1.200 estão dispostos na **Tabela 11**.

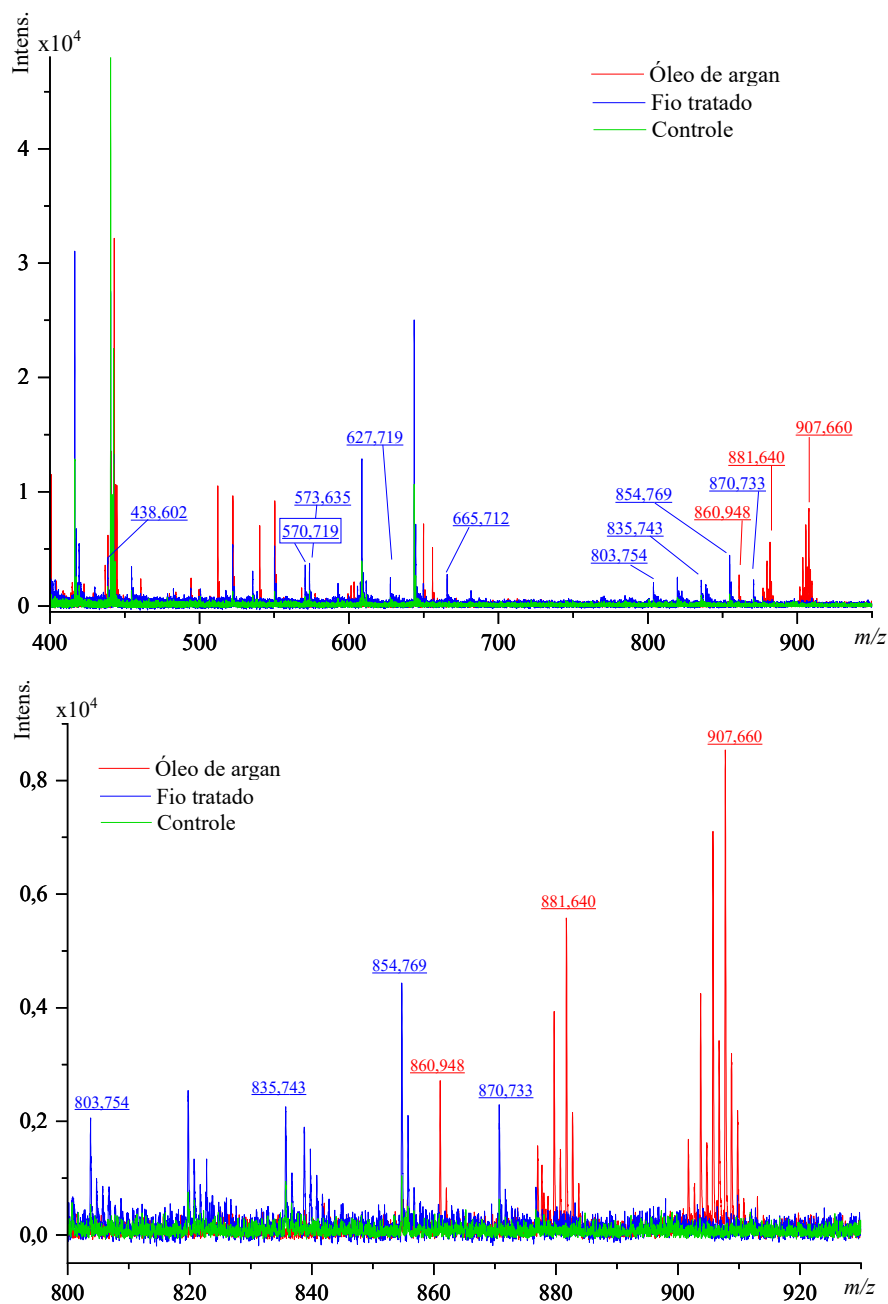


Figura 33. Espectro MALDI-TOF-MS do córtex de fibras capilares descoloridas sem tratamento (verde), tratada com óleo de argan (azul) e do óleo de argan (vermelho) na faixa de m/z entre 400 e 950 (A) e na região aproximada de m/z entre 800 e 930 (B).
 Fonte: Autoria própria.

Tabela 11. Lista de massas (m/z entre 350 e 1.100) dos espectros de MALDI-TOF-MS do óleo de argan, do córtex e da superfície dos fios tratados com o óleo de argan.

	Óleo de argan	Tratado	Controle
		363,530	363,519
		367,317	367,312
	368,079	367,937	-
	378,763	378,640	378,617
		381,547	381,549
	400,759		
	416,747	416,593	416,590
		419,518	
	436,907		
	438,743	438,602	
	440,733	440,600	440,581
	442,963	442,605	442,590
	444,755		
	494,320		
	512,263		
	522,370	522,214	-
	540,310		
	550,418	550,270	-
		570,719	
		573,635	
Sinais (m/z)	603,382		
		608,668	608,670
		627,719	
		643,711	643,687
	649,878		
	665,871	665,712	
		803,754	
		835,743	
		838,792	
		854,769	
	860,948		
		870,733	
	876,914		
	879,618		
	881,640		
	901,604		
	903,615		
	905,637		
	907,660		

Mesmo com essa tendência ao impedimento estérico aumentada, os resultados indicaram que o tratamento com o óleo de argan provocou algumas alterações no córtex do fio de cabelo indicando que ocorrem interações entre o córtex e os compostos presentes nos óleos. Os sinais de m/z 419,518; 570,719; 573,635; 627,719; 803,754; 835,743; 838,792; 854,769 e 870,733 não estavam presentes no fio não tratado, mas também não

foram encontrados diretamente nos óleos. Já os sinais m/z 438,602 e 665,712 foram encontrados no óleo de argan e no córtex do fio após tratamento com o óleo, indicando compostos do óleo que podem ter sido incorporados a fibra capilar.

O óleo de abacate é composto principalmente por ácidos graxos monoinsaturados (oleico e palmitoleico) e saturados (palmítico), apesar de possuir 9,8% do ácido linoleico, que é poli-insaturado e pode aumentar a tendência de impedimento estérico, dificultando a incorporação à fibra capilar. A **Figura 34** ilustra o espectro MALDI-TOF-MS de uma fibra capilar cortada longitudinalmente e descolorida sem tratamento (verde), tratada com óleo de abacate (azul) e do óleo de abacate (vermelho).

Os valores de m/z 419,575; 535,839; 570,869; 819,986; 835,979; 870,999; destacados em azul claro na **Tabela 12**, foram encontrados apenas no córtex do cabelo que foi tratado com o óleo de abacate, ou seja, não estavam presentes no córtex do fio controle, mas também não foram encontrados diretamente no óleo de abacate, apresentando indícios de que o tratamento com o óleo de abacate provocou mudanças no córtex capilar. Além disso, encontrou-se os sinais em m/z 438,652; 649,899; 668,888; 855,016; que corresponde sinais presentes no óleo de abacate que não são encontrados no controle, indicando compostos que são incorporados do óleo na fibra capilar durante o tratamento.

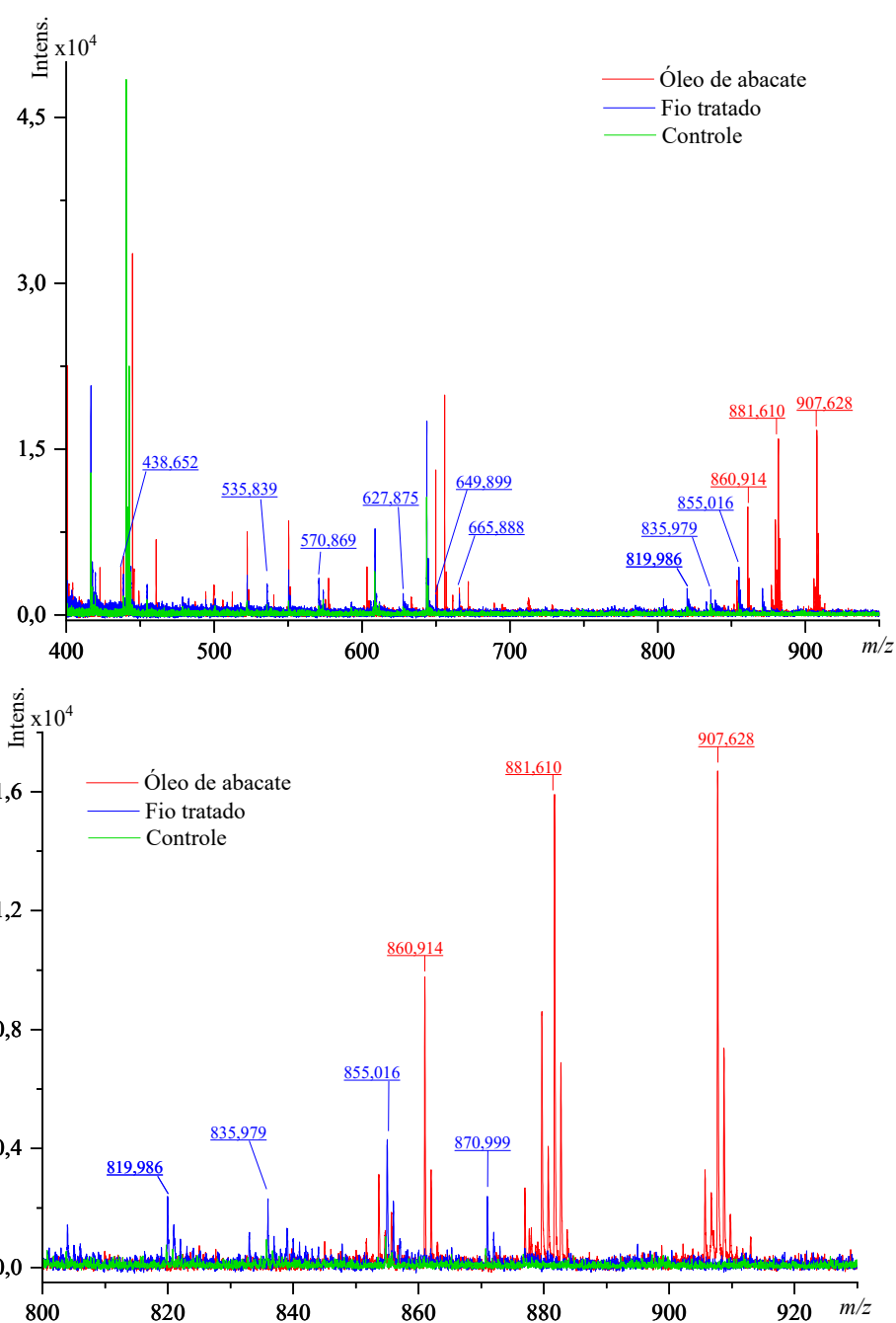


Figura 34. Espectro MALDI-TOF do córtex de fibras capilares descoloridas e sem tratamento (verde), tratada com óleo de abacate (azul) e do óleo de abacate (vermelho), na faixa de m/z entre 400 e 950 (A) e na região aproximada de m/z entre 800 e 930 (B).
 Fonte: Autoria própria.

Tabela 12. Lista de massas (m/z entre 350 e 1.100) dos espectros de MALDI-TOF do óleo de abacate, do córtex dos fios tratados com o óleo de abacate e do controle, com destaque em azul para os sinais encontrados apenas no fio tratado e em vermelho para os sinais encontrados no óleo e do cabelo após tratamento.

	Óleo de abacate	Fios tratados com óleo de abacate	Controle
		363,615	363,519
		-	367,312
	368,073	-	-
	378,744	378,694	378,617
		381,635	381,549
	400,743		
		416,682	416,590
		419,575	
	422,745		
	438,724	438,652	
	440,719	440,686	440,581
	442,720	442,696	442,590
	444,744		
	460,731		
	522,353	522,335	-
	-	535,839	
	550,398	550,391	-
	-	570,869	
	577,321		
	603,346		
	-	608,773	608,670
		627,875	
		643,876	643,687
	649,858	649,899	
	655,875		
	665,833	665,888	
	671,854		
		819,986	
		835,979	
	853,577		
	855,595	855,016	
	860,914		
		870,999	
	876,883		
	879,586		
	881,610		
	905,613		
	907,628		
	-	1.060,046	-

O óleo de coco apresenta ácidos graxos saturados de cadeia mais curta, sendo o ácido láurico, o mirístico, o palmítico e o caprílico os ácidos graxos majoritários, em

ordem do maior para o de menor concentração. Isso diminui a tendência de impedimento estérico com relação aos outros óleos e, portanto, espera-se que a incorporação ao fio seja facilitada. A **Figura 35** ilustra o espectro de MALDI-TOF do córtex de um fio de cabelo descolorido sem tratamento (verde), tratado com óleo de coco (azul) e do óleo de coco (vermelho).

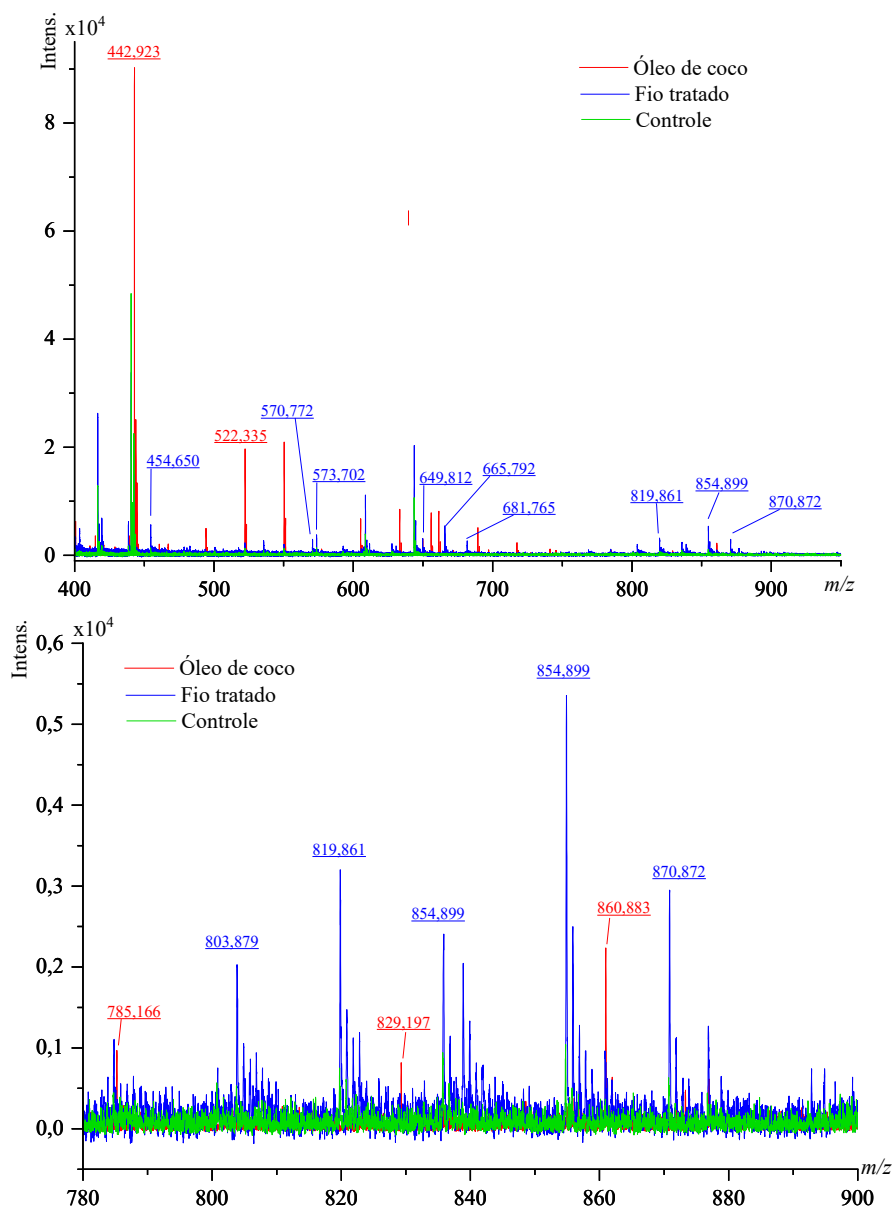


Figura 35. Espectros MALDI-TOF de fibras capilares descoloridas, sendo em verde o controle (fibra sem tratamento), em azul tratada com óleo de coco e em vermelho espectro do óleo de coco, na faixa de m/z entre 400 e 950 (A) e na região aproximada de m/z entre 780 e 900. Fonte: Autoria própria.

Os espectros obtidos das fibras capilares cortadas e tratadas com óleo de coco apresentaram indícios de que o tratamento com o óleo de coco provocou mudanças no córtex capilar como é possível observar pela **Tabela 13**, como os sinais destacados em azul claro, com m/z 419,558; 438,641; 454,650; 573,702; 649,812; 681,765; 838,918; que não estavam presentes no fio não tratado, mas não são encontrados diretamente no óleo de coco. Além disso, encontrou-se os sinais em m/z 438,641; 570,772 e 665,792 que corresponde sinais presentes no óleo de coco que não são encontrados no controle, indicando compostos que são incorporados do óleo de coco na fibra capilar durante o tratamento.

Os sinais em m/z próximos 438,641 e 665,792 foram encontrados nos três óleos e no córtex dos três fios, indicando a incorporação de compostos em comum entre os óleos. O sinal em m/z 570 foi encontrado apenas no óleo de coco, mas ocorre no espectro dos três fios tratados com os diferentes óleos, indicando um composto que pode passar por alguma modificação ao penetrar o cabelo. Os sinais em m/z 649,9 e 855,0 foram encontrados apenas no óleo de abacate e nos fios tratados com o mesmo óleo, indicando que são compostos presentes apenas no óleo de abacate e que penetram na fibra capilar.

Ademais, o óleo de argan foi o que apresentou menos sinais novos no córtex após o tratamento, o que pode ser explicado pelo impedimento estérico maior devido a composição do óleo ser majoritariamente de ácidos graxos insaturados de cadeia com mais de 16 carbonos.

Tabela 13. Lista de massas (m/z entre 350 e 1.100) dos espectros de MALDI-TOF do óleo de coco, do córtex dos fios tratados com o óleo de coco e do controle, com destaque em azul para os sinais encontrados apenas no fio tratado e em vermelho os sinais referentes ao óleo encontrados no fio após tratamento.

	Óleo de coco	Fio tratado com óleo de coco	Controle
Sinais (m/z)		363,558	363,519
		367,340	367,312
	368,055	-	-
	378,733	378,673	378,617
	382,968	381,577	381,549
	400,730		
	416,682	416,633	416,590
	420,780	419,558	
	438,704	438,641	
	440,699	440,645	440,581
	442,923	442,653	442,590
		454,650	
	494,289		
	522,335	-	-
	550,391	-	-
	570,869	570,772	
		573,702	
	605,257		
	608,829	608,742	608,670
	633,298		
	643,876	643,791	643,687
		649,812	
	661,339		
	665,888	665,792	
		681,765	
	661,339		
	689,377		
	717,411		
	785,166		
		803,879	
		819,861	
	829,197		
	835,843		
	838,918		
	854,899		
860,883			
	870,872		
876,866			

Os espectros também foram obtidos para as fibras capilares intactas, a fim de verificar a interação do óleo com a cutícula, já que grande parte do efeito de hidratação e proteção dos óleos é explicado pela sua deposição na superfície do fio. A **Tabela 14**

mostra os sinais que foram observados na cutícula dos fios após o tratamento com os três óleos.

Tabela 14. Sinais obtidos através dos espectros de MALDI-TOF da superfície dos fios de cabelo intactos tratados com óleo de argan, abacate, coco e o controle, fixados com fita de alumínio.

Trat.	Argan	Abacate	Coco	Controle
		364,598		-
	367,973			-
	368,507	368,844	368,917	368,751
	379,153	379,523	379,571	379,478
	382,13	382,45	382,486	382,403
		404,301		
	417,154	417,493	417,541	-
		420,432		
	439,099	439,568		439,456
	441,135	441,437	441,519	-
	443,154	-	443,542	-
	455,101		455,665	
	466,620			
Sinais (<i>m/z</i>)	494,694	-	495,13	494,917
	522,742	523,119	523,197	522,971
	550,799	551,175	551,268	551,026
		574,816	574,590	
	609,487	609,853	609,782	-
		612,678		
	644,228	644,665	644,739	-
		666,668		
			820,879	
	836,324	836,937	836,777	
	855,242	855,748		
	-	-	-	861,675
		871,743		
	-	-	-	877,672
	1.060,541	1.060,869	-	-

Foi possível observar sinais dos três óleos na superfície dos fios após tratamento, indicando que os tratamentos provocaram alterações na superfície do cabelo, ou seja, ocorrem interações entre a cutícula e os compostos presentes nos óleos. O fio tratado com óleo de abacate foi o que apresentou maior número de sinais diferentes do controle após o tratamento.

Os sinais de *m/z* 404,301 e 612,678 encontrados do fio intacto tratado com óleo de abacate e o sinal de *m/z* 466,620 do fio intacto tratado com óleo de argan foram

encontrados apenas na superfície do fio, os demais sinais foram encontrados tanto na superfície quanto no córtex do fio tratado, indicando que são vindos de substâncias que são formadas tanto na cutícula quanto no córtex capilar após o tratamento com os óleos.

A fim de verificar se o tempo entre o final do tratamento e a análise influenciam nos resultados, já que pode ocorrer degradação dos compostos incorporados ao fio após algum tempo do tratamento, fios foram analisados após 1, 5 e 10 dias do término do tratamento com óleo de abacate. Esse óleo foi escolhido já que foi o que demonstrou maior incorporação pela fibra capilar.

A **Figura 36** mostra a PCA dos espectros MALDI-TOF (m/z 350–1200; intensidade >1000 u.a.) dos fios de cabelo tratados com o óleo de abacate, enquanto na **Figura 37** é possível observar um exemplo de espectros MALDI-TOF dos fios de cabelo tratados com o óleo de abacate, sendo 1 dia (verde), 5 dias (vermelho) e 10 dias (azul) após o fim do tratamento.

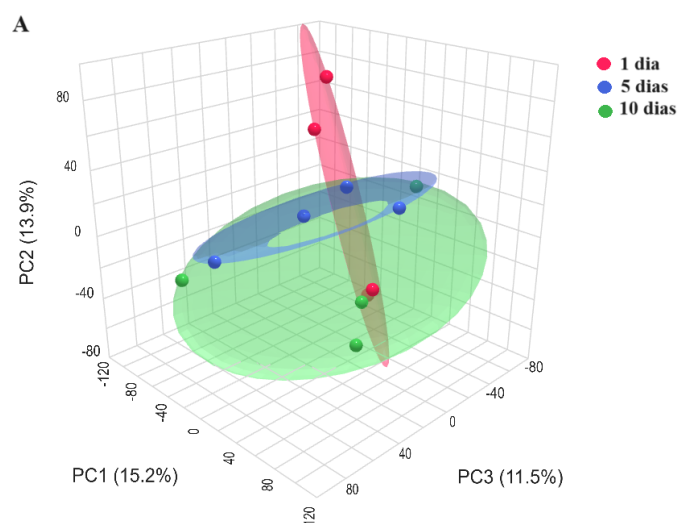


Figura 36. PCA dos espectros MALDI-TOF (m/z 350–1200; intensidade >1000 u.a.) dos fios de cabelo tratados com o óleo de abacate 1 dia (verde), 5 dias (vermelho) e 10 dias (azul) após o fim do tratamento. Fonte: Autoria própria.

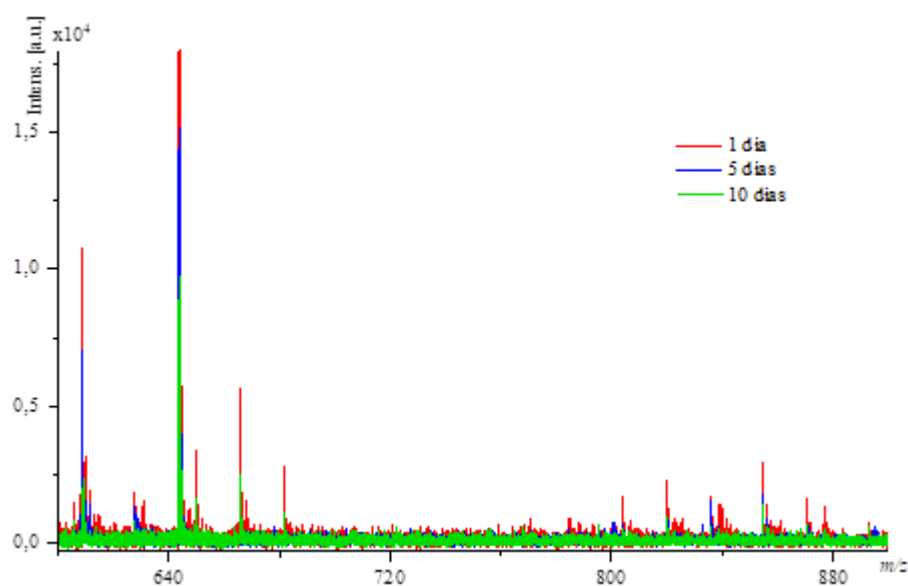


Figura 37. Espectro MALDI-TOF (m/z 350–1200; intensidade >1000 u.a.) dos fios de cabelo tratados com o óleo de abacate 1 dia (verde), 5 dias (vermelho) e 10 dias (azul) após o fim do tratamento. Fonte: Autoria própria.

É possível verificar que os grupos 1 dia, 5 dias e 10 dias apresentam resultado semelhante, não mostrando grandes diferenças na PCA após o tempo avaliado. Apesar disso, é possível observar no espectro da **Figura 36** que os sinais na região de maior interesse (de DAGs e TAGs) apresentam intensidades menores após 5 dias e ainda menores após 10 dias, indicando que mesmo com similaridade demonstrada pela análise estatística, é aconselhável que a análise seja feita o mais próximo possível do tratamento.

Um fator importante para a discussão dos resultados é entender o que ocorre no cabelo no processo de descoloração, já que ele precede o tratamento com os óleos. A epicutícula consiste em uma monocamada lipídica composta principalmente de ácido 18-metileicosanoico (18-MEA) ligado à proteínas via ligação tioéster. O clareamento danifica a epicutícula causando a clivagem da ligação tioéster e a formação do grupo ácido cisteico, como mostra a **Figura 38** o que gera um aumento da carga negativa na superfície do cabelo (KOJIMA, 2015).

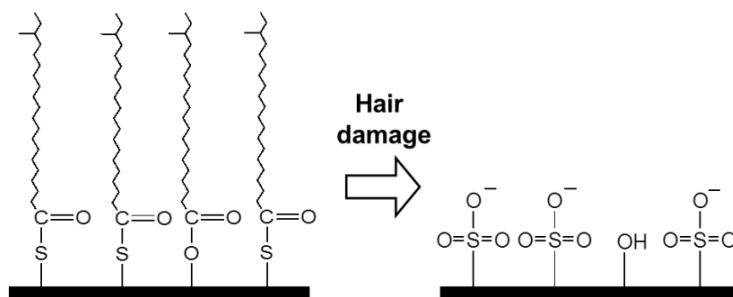


Figura 38. Diagrama esquemático da superfície do cabelo antes e após o processo de clareamento. Fonte: Adaptado de KOJIMA, T.; 2015.

Durante o tratamento com os óleos, há interações dos compostos presentes nos óleos com a superfície do cabelo. Essas interações são comprovadas quando comparamos os espectros dos cabelos sem tratamento com o espectro dos fios tratados. O surgimento de sinais na região estudada comprova que há alterações na superfície do fio após o tratamento. Sinais compatíveis também aparecem nos espectros da parte interna no fio, indicando que ocorre alterações no córtex capilar após o tratamento com os óleos. Apesar de não ser possível até o momento identificar os compostos que são formados, e de suas m/z não serem compatíveis com os sinais presentes nos óleos, podemos afirmar que há nítidas diferenças quando comparamos os fios tratados aos não tratados, indicando que os óleos causam modificações internas e externas nos fios.

4.8 Análises por LIFT MALDI-TOF/TOF e ESI-MS/MS

O intuito de avaliar os óleos através das duas técnicas de fragmentação foi comparar diretamente os espectros a fim de verificar se a identificação dos íons seria possível por ambas, ou complementar as informações obtidas por cada técnica. Já é amplamente discutido na literatura a caracterização da composição óleos vegetais por técnicas de MS/MS, principalmente usando ESI. A **Figura 39** ilustra como foi feito o processo de identificação para a análise de ESI-MS/MS, com fragmentação por CID, para dois TAG: o POO (1-hexadecanoil-2,3-di-(9Z-octadecenoil)-glicerol) e o OOO (1,2,3-tri-(9Z-octadecanol)-glicerol).

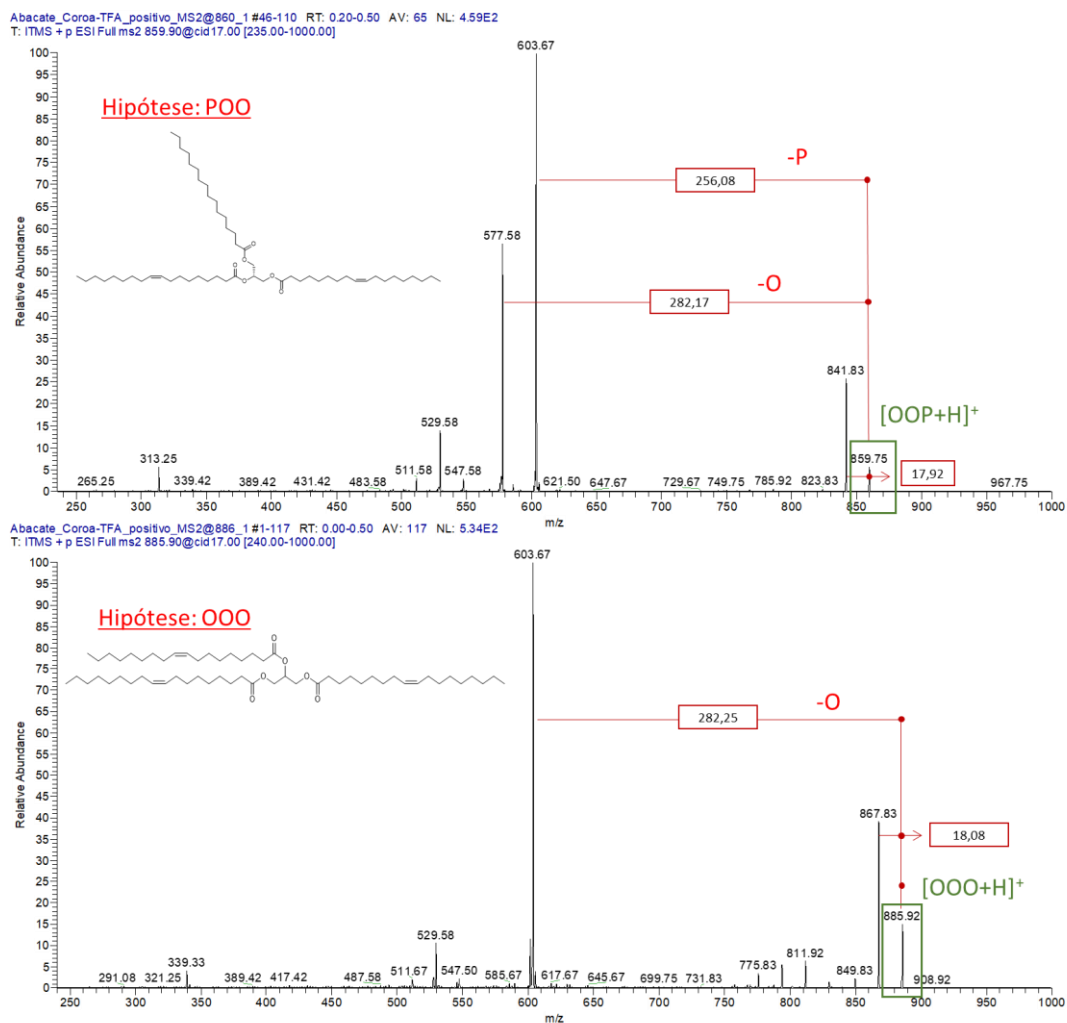


Figura 39. Espectros de fragmentação por ESI-MS² e hipóteses de identificação de TAG.

Fonte: Autoria própria.

Para verificar a possibilidade de identificação dos compostos diretamente no MALDI, foi realizado um experimento utilizando a fragmentação por LIFT TOF/TOF, no qual os fragmentos metaestáveis formados na ionização são re-acelerados e tem a energia aumentada.

A fragmentação dos óleos de argan, abacate e coco por MALDI-TOF/TOF mostrou um perfil de fragmentação diferente no obtido por ESI-MS². Um exemplo é a fragmentação do íon de m/z 881,710 do óleo de abacate. Considerando que o método empregado no ESI possibilita a formação apenas dos íons $[M+H]^+$, enquanto no MALDI pode haver a formação, majoritariamente, dos íons $[M+H]^+$ ou $[M+Na]^+$, foram avaliados os espectros considerando essas hipóteses.

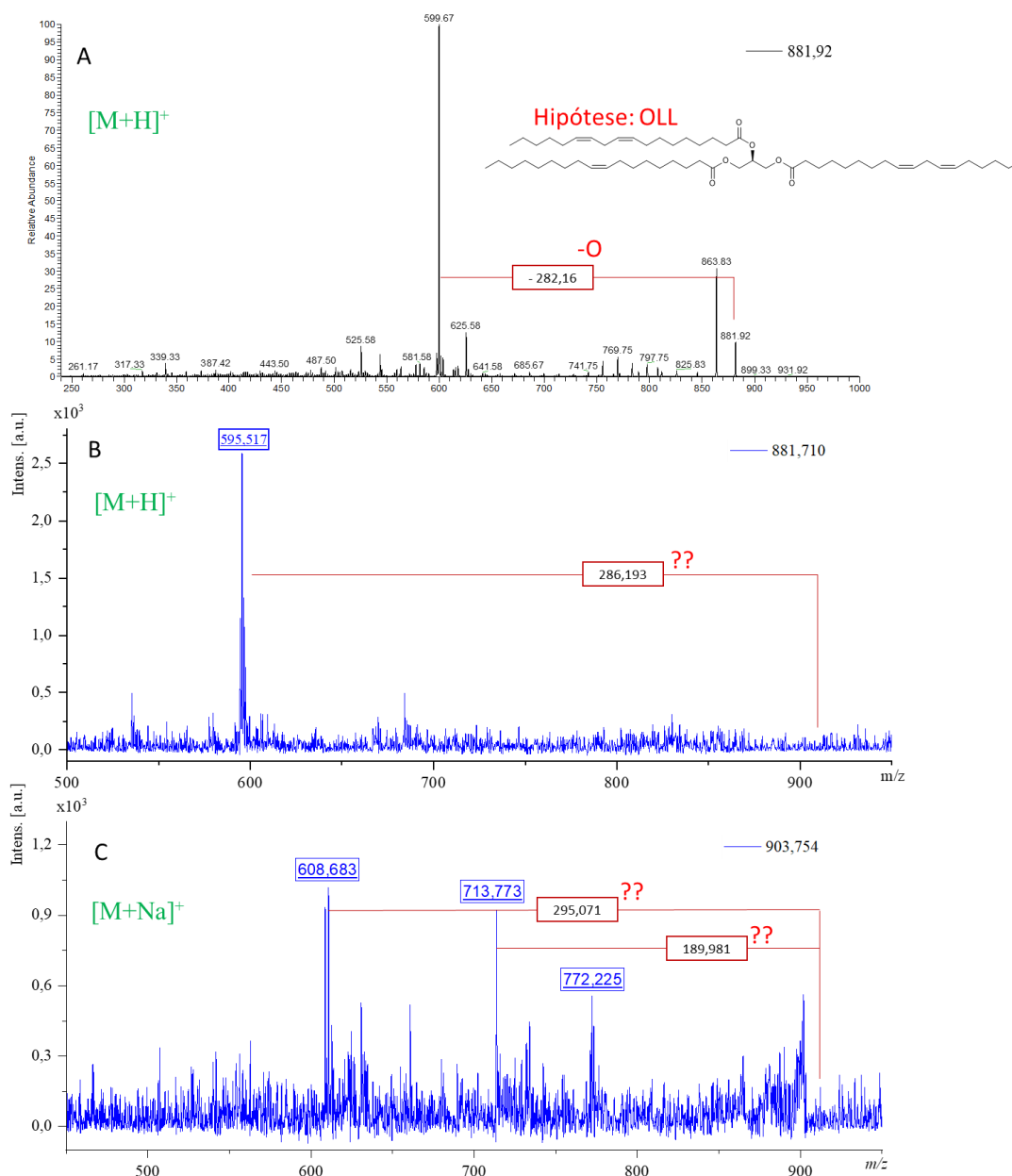


Figura 40. Espectros de fragmentação por ESI-MS² para a hipótese do íon (A) $[M+H]^+$ em m/z 881,92 e LIFT MALDI-TOF/TOF para a hipótese do íon (B) $[M+H]^+$ em m/z 881,710 e (C) $[M+Na]^+$ em 903,754. Fonte: Autoria própria.

A fragmentação difere quando comparamos os dois equipamentos, portanto, não é possível afirmar se são os mesmos compostos. Não foi possível obter espectros com perfil que indicasse os compostos encontrados nos óleos, como já publicados extensivamente.

Ademais, durante a tentativa de fragmentação por LIFT em MALDI-TOF/TOF dos sinais encontrados nos fios de cabelo, utilizando a lâmina de imageamento, foi possível observar que os fragmentos formados podem estar deslocados com relação a m/z . O íon aproximado em m/z 609,3 foi avaliado em três fios de cabelo distintos e foi possível observar um desvio padrão de 1,05 entre as três repetições, como pode-se observar na **Figura 41**. Isso impede a identificação dos compostos, já que essa variação aumenta consideravelmente o número de hipóteses do analito.

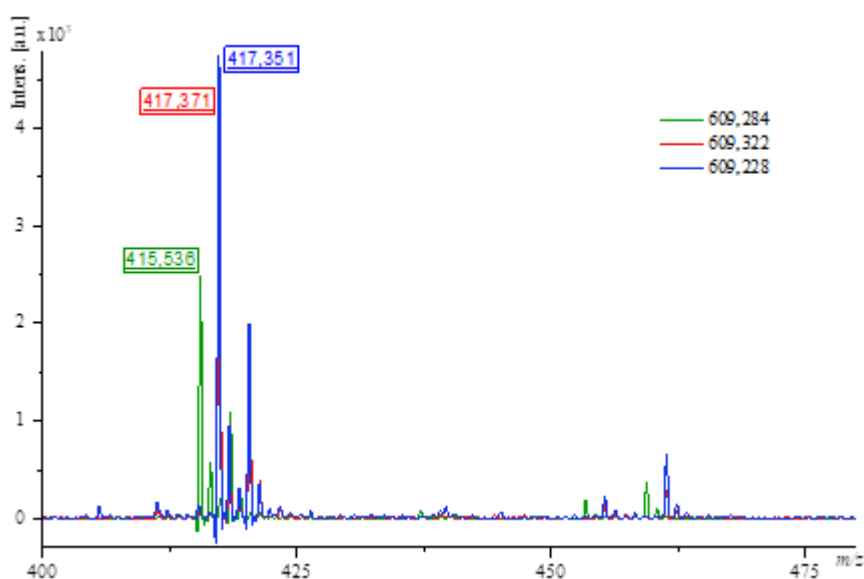


Figura 41. Espectros de fragmentação por LIFT MALDI-TOF/TOF para o íon de m/z 609,284 (verde), m/z 609,322 (vermelho) e m/z 609,228 (azul) para fios de cabelo distintos tratados com óleo de abacate. Fonte: Autoria própria.

Devido a esse desvio nos dados, não foi possível identificar os compostos por LIFT e comparar com a identificação por ESI-MS². Alternativas são analisar os compostos incorporados ao fio de cabelo realizando um processo de extração e posterior análise por ESI-MS² ou realizar os experimentos por MALDI-TOF/TOF com fragmentação por CID, o que pode ser efetuado em trabalhos posteriores.

4.9 Imageamento por MALDI-TOF

Um dos objetivos do trabalho era formar uma imagem na qual fosse possível observar a distribuição dos compostos de interesse no interior dos fios de cabelo. A imagem foi realizada utilizando a fixação pela fita ARclad® e os parâmetros dispostos na **Tabela 4**. A aquisição dos dados foi realizada pelo software flexImaging (Bruker Daltonics), no qual os dados também foram tratados.

Após a aquisição dos dados em uma região selecionada, um espectro médio de toda a região é formado, como pode-se observar na **Figura 42**. Ele mostra que a intensidade média dos sinais de interesse é muito baixa, ou seja, eles não aparecem no espectro médio geral da região.

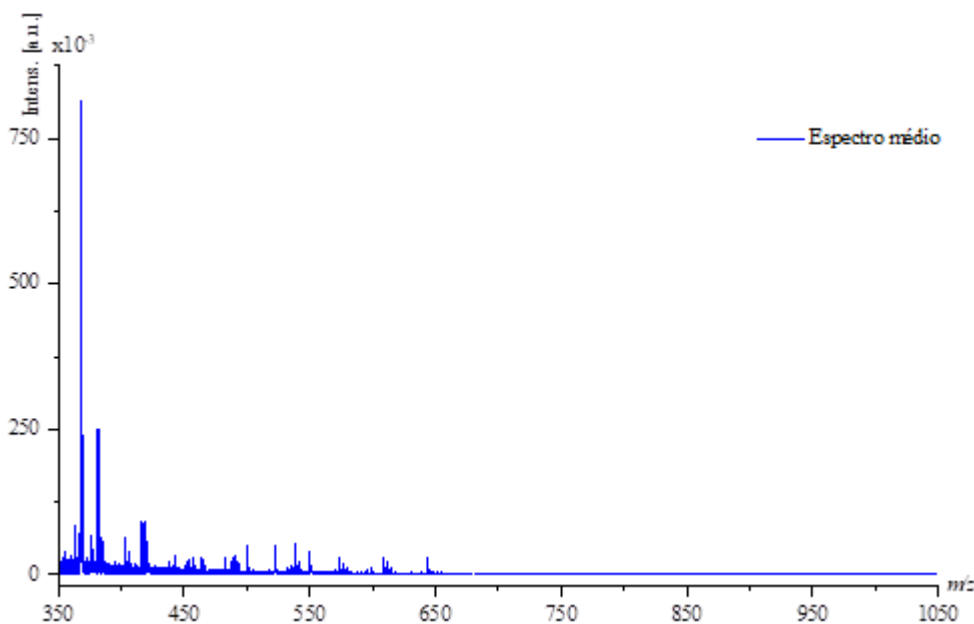


Figura 42. Espectro de massas médio geral de MALDI-TOF-MS da região selecionada para aquisição das imagens para os três fios tratados e o controle. Fonte: Autoria própria.

Apesar disso, a massa dos sinais de interesse foi filtrada e selecionada a fim de verificar sua distribuição, com base na intensidade do sinal. A **Figura 43** apresenta uma imagem gerada por MALDI-TOF dos fios de cabelo tratados com óleo de argan (1), abacate (2) e coco (3) e o controle (4), cortados longitudinalmente.

O primeiro fator importante a ser citado é que os dados foram obtidos em uma área retangular que continha os quatro fios, incluindo os espaços entre eles. Na região dos fios é possível observar sinais em toda a faixa de m/z selecionada, enquanto na área em que se encontra apenas a fita ARclad® (espaço entre os fios) não é possível observar sinais.

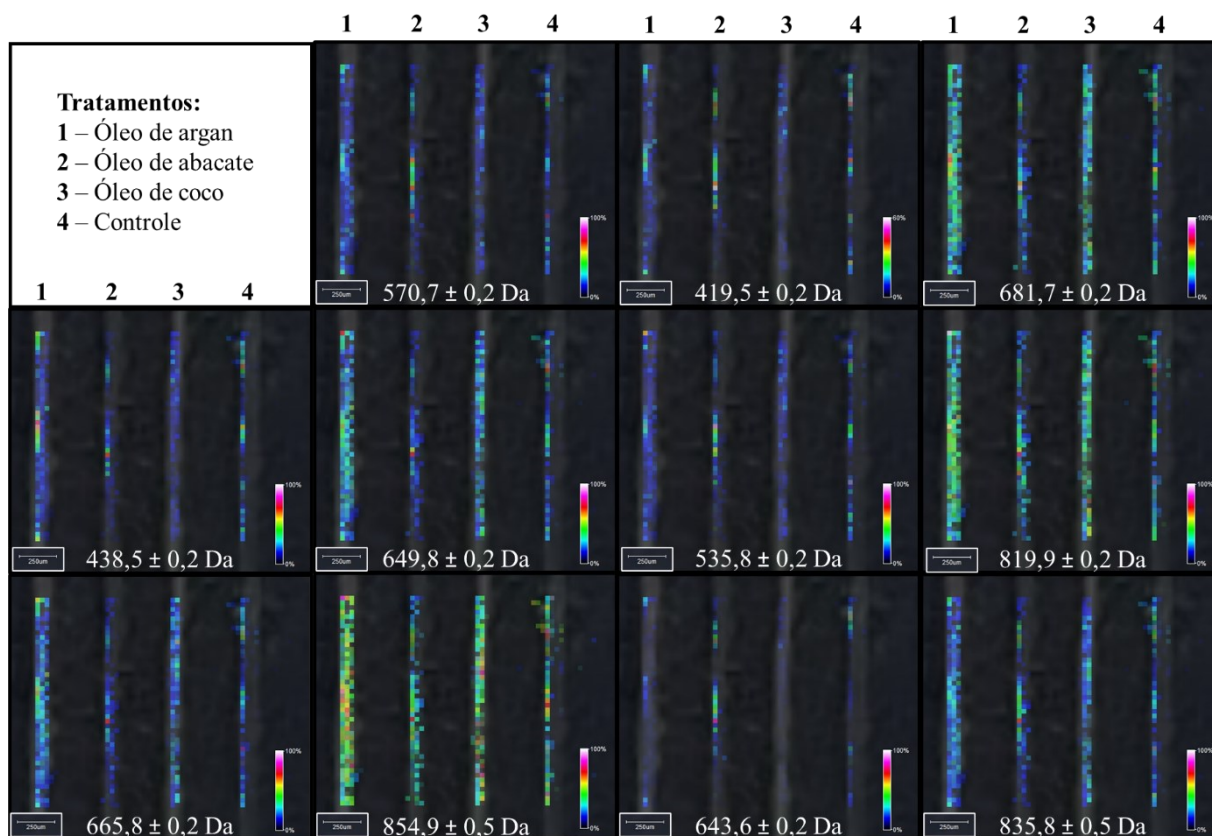


Figura 43. Imagens de MALDI-TOF nas seções longitudinais de amostras de cabelo tratadas com óleo de argan (1), abacate (2) e coco (3) e do fio de cabelo sem tratamento (controle, 4). Fonte: Autoria própria.

Os íons de m/z $438,5 \pm 0,2$ Da e $665,8 \pm 0,2$ Da, à direita, são sinais que apareceram nos espectros dos fios após os três tratamentos e são encontrados nos espectros dos óleos também. O primeiro apresenta baixa intensidade para o tratamento com óleo de coco, menor até que o controle, enquanto os tratamentos com óleo de argan e abacate mostram uma região com maior intensidade, ou seja, o íon não é distribuído igualmente ao longo do comprimento do fio. O segundo é mais intenso para o tratamento

com argan, seguido do tratamento com coco e o controle pode ser comparável ao tratamento com óleo de abacate.

O íon $570,7 \pm 0,2$ Da, encontrado apenas no óleo de coco, porém nos três tratamentos, foi mais intenso para o tratamento com óleo de abacate. Já os íons $649,8 \pm 0,2$ Da e $854,9 \pm 0,5$ Da, presentes no óleo de abacate, também são encontrados distribuídos nos cabelos tratados com óleo de argan e de coco.

Os íons $419,5 \pm 0,2$ Da, $535,8 \pm 0,2$ Da, $643,6 \pm 0,2$ Da e $835,8 \pm 0,5$ Da são mais intensos no fio tratado com o óleo de abacate, indicando que o tratamento com esse óleo provocou mudanças mais expressivas com relação a esses íons, apesar de eles também estarem presentes no controle. Apesar disso, é possível perceber que ao longo do comprimento do fio a distribuição dos íons varia bastante, não apresentando uma distribuição homogênea. Já os íons $681,7 \pm 0,2$ Da, $819,9 \pm 0,2$ Da mostram uma distribuição mais homogênea ao longo do comprimento dos fios, mostrando intensidade maior no tratamento com o óleo de argan e com o óleo de coco.

Foi realizada uma tentativa de obter os dados apenas na região nos fios, excluindo a área da fita, porém devido ao pequeno tamanho da amostra e a altura do fio, que pode causar um sutil deslocamento no laser, pode-se perder dados importantes durante processo da coleta. A fim de diminuir os riscos de erros durante a aquisição dos dados, toda a região foi selecionada, como mostra o esquema da **Figura 44**.

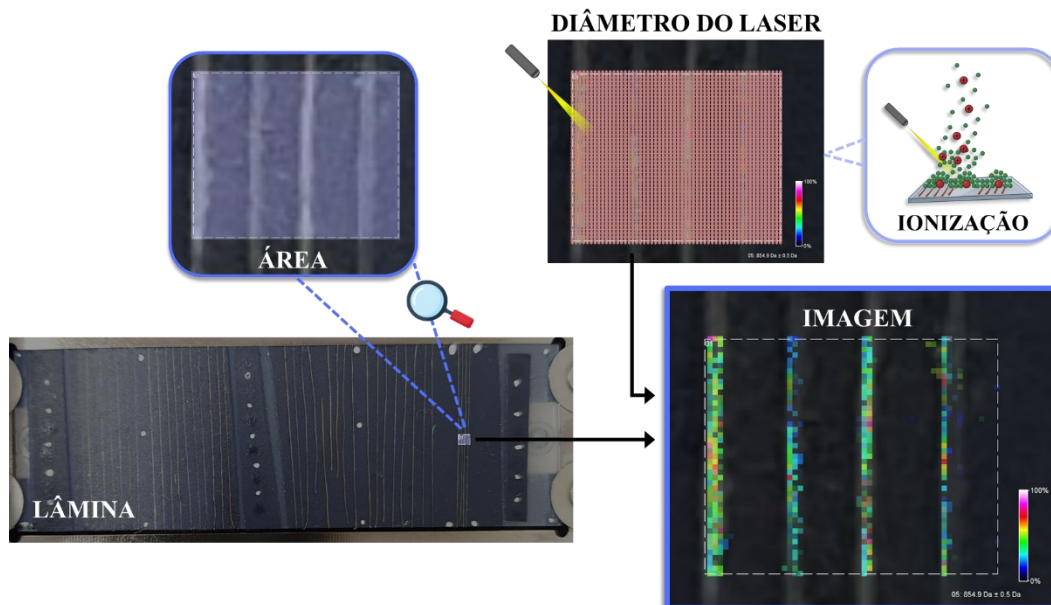


Figura 44. Esquema da aquisição de dados de imagem por MALDI-TOF. Fonte: Autoria própria.

A aquisição da imagem foi realizada em uma área pequena de cerca de 1 mm^2 durante cerca de 11 h. A distribuição dos íons de interesse foi verificada, trazendo mais uma confirmação de que os tratamentos com os óleos vegetais avaliados causam mudanças no córtex do fio de cabelo. Apesar de ser possível avaliar a distribuição dos compostos no interior dos fios, ainda é necessário aprimorar a aquisição dessas imagens para que possam ser realizadas em áreas maiores, ao longo do comprimento do fio.

5 Conclusões

Durante o estudo, a metodologia para análise de fios de cabelo por MALDI-TOF-MSI foi desenvolvida desde a etapa de coleta das amostras até o tratamento dos dados. Diversos cortes propostos na literatura foram testados para definir o melhor para os fios de cabelo. Apesar do corte com criostato ser citado diversas vezes como a melhor metodologia de corte para MSI, nesse estudo o corte por esse método não foi adequado já que não foi possível posicionar a lâmina contendo o fio de cabelo colado nos equipamentos disponíveis. Portanto, um método de corte foi proposto utilizando uma

placa metálica com ranhuras, na qual o cabelo é posicionado, fixado com fita adesiva e cortado com uma lâmina de micrótomo.

A mistura de matrizes DHB/HCCA 3:1 (m/m) com concentração de 8 mg/mL de solução de ACN 50% (v/v) foi selecionada para as análises, já que permitiu a maior intensidade dos sinais na região de interesse para TAGs. Os parâmetros instrumentais do MALDI-TOF-MS foram definidos e encontrou-se o melhor método de aquisição de dados em fios de cabelo na faixa de m/z de 200 a 2.000.

Com o método desenvolvido, as amostras capilares tratadas com óleos vegetais foram avaliadas visando observar a incorporação de substâncias pelo contato externo com o fio. Foi possível identificar íons que indicam modificações no córtex e na superfície do fio após o tratamento com os óleos vegetais de argan, abacate e coco. Alguns íons presentes nos óleos também foram encontrados no interior dos fios, indicando a incorporação desses compostos.

Foi possível verificar um maior número de compostos após o tratamento com o óleo de abacate quando comparado aos demais tratamentos, indicando que foi o tratamento mais efetivo. Em sequência o tratamento com óleo de coco, que também provocou íons que mostram a eficiência do tratamento.

Considerando o óleo de argan, era esperado que a permeação fosse menor devido a sua composição. Apesar do surgimento de alguns íons após o tratamento, que indicam alterações e incorporação do óleo, a PCA mostrou que fio após tratamento é similar ao fio controle, indicando que foi o tratamento menos efetivo.

Isso demonstra a eficiência do uso de óleos vegetais em formulações cosméticas e indicam que eles podem ser usados como veículos em tratamentos específicos, porém testes com ativos são necessários para comprovar a última aplicação.

A elaboração das imagens da distribuição espacial dos íons de interesse no córtex capilar forneceu uma nova perspectiva sobre os tratamentos, corroborando os resultados dos espectros que apontam modificações no córtex capilar e incorporação de compostos durante o tratamento com os três óleos. Ainda é necessário aprimorar a aquisição e apresentação dessas imagens, a fim de que possam ser realizadas em áreas maiores que demonstrem homogeneidade ao longo do comprimento do fio. O método desenvolvido foi

capaz de atingir a finalidade do trabalho, sendo qualificado para fornecer dados sobre a absorção e imagens da distribuição de compostos incorporados a haste capilar.

6 Referências Bibliográficas

ABELAN, U. S.; OLIVEIRA, A. C. DE; CACOCI, É. S. P.; MARTINS, T. E. A.; GIACON, V. M.; VELASCO, M. V. R.; LIMA, C. R. R. DE C. Potential use of essential oils in cosmetic and dermatological hair products: a review. **Journal of Cosmetic Dermatology**, Hoboken, v. 21, n. 4, p. 1407–1418, 2022.

ABIHPEC. **Panorama do setor de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos/novembro 2023**. São Paulo, 2023. Disponível em: <https://abihpec.org.br/publicacao/panorama-do-setor/>. Acesso em: 20 nov. 2023.

ADAV, S. S.; SUBBAIAIH, R. S.; KERK, S. K.; LEE, A. Y.; LAI, H. Y.; NG, K. W.; SZE, S. K.; SCHMIDTCHEN, A. Studies on the proteome of human hair - identification of histones and deamidated keratins. **Scientific Reports**, London, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018.

ANTONIOSI FILHO, N. R. ; ZUPPA, T. O. Extração e análise cromatográfica de ácidos graxos e triacilglicerídeos dos óleos de copaíba e chichá. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 39., 1999, Goiânia. **Anais [...]**. Goiania: ABQ-GO, UFG, 1999.

BACIU, T.; BORRULL, F.; AGUILAR, C.; CALULL, M. Recent trends in analytical methods and separation techniques for drugs of abuse in hair. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 856, p. 1–26, 2015.

BEASLEY, E.; FRANCESE, S.; BASSINDALE, T. Detection and mapping of cannabinoids in single hair samples through rapid derivatization and matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 88, n. 20, p. 10328–10334, 2016.

BEDNAŘÍK, A.; BÖLSKER, S.; SOLTWISCH, J.; DREISEWERD, K. An on-tissue paternò–büchi reaction for localization of carbon–carbon double bonds in phospholipids and glycolipids by matrix-assisted laser-desorption–ionization mass-spectrometry imaging. **Angewandte Chemie International Edition**, Weinheim, v. 57, n. 37, p. 12092–12096, 2018.

BIEN, T.; HAMBLETON, E. A.; DREISEWERD, K.; SOLTWISCH, J. Molecular insights into symbiosis—mapping sterols in a marine flatworm–algae–system using high spatial resolution MALDI-2-MS imaging with ion mobility separation. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 413, n. 10, p. 2767–2777, 2021.

BLANC, L.; LENAERTS, A.; DARTOIS, V.; PRIDEAUX, B. Visualization of mycobacterial biomarkers and tuberculosis drugs in infected tissue by MALDI-MS imaging. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 90, n. 10, p. 6275–6282, 2018.

BOUGHTON, B. A.; THINAGARAN, D. Mass spectrometry imaging (MSI) for plant metabolomics. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 1778, p. 241–252, 2018.

BOUSCHEN, W.; SCHULZ, O.; EIKELY, D.; SPENGLER, B. Matrix vapor deposition/recrystallization and dedicated spray preparation for high-resolution scanning microprobe matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry (SMALDI-MS) of tissue and single cells. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, London, v. 24, n. 3, p. 355–364, 2010.

BRUKER. **Instructions for use tools for MALDI imaging**. [S. l.], [20--?]. Disponível em: <https://www.bruker.com>. Acesso em: 5 out. 2022.

BUCK, A.; LY, A.; BALLUFF, B.; SUN, N.; GORZOLKA, K.; FEUCHTINGER, A.; JANSSEN, K. P.; KUPPEN, P. J.; VAN DE VELDE, C. J.; WEIRICH, G.; ERLMEIER, F.; LANGER, R.; AUBELE, M.; ZITZELSBERGER, H.; AICHLER, M.; WALCH, A. High-resolution MALDI-FT-ICR MS imaging for the analysis of metabolites from formalin-fixed, paraffin-embedded clinical tissue samples. **The Journal of Pathology**, London, v. 237, n. 1, p. 123–132, 2015.

CAIRNS, T.; HILL, V.; SCHAFFER, M.; THISTLE, W. Removing and identifying drug contamination in the analysis of human hair. **Forensic Science International**, Lausanne, v. 145, n. 2–3, p. 97–108, 2004.

CAO, G.; HONG, Y.; WU, H.; CHEN, Z.; LU, M.; CAI, Z. Visual authentication of edible vegetable oil and used cooking oil using MALDI imaging mass spectrometry. **Food Control**, Guildford, v. 125, n. 107966, 7 p., 2021.

CAPRIOLI, R. M.; FARMER, T. B.; GILE, J. Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 69, n. 23, p. 4751-4760, 1997.

CASADONTE, R.; KRIEGSMANN, M.; ZWEYNERT, F.; FRIEDRICH, K.; BARETTON, G.; OTTO, M.; DEININGER, S. O.; PAAPE, R.; BELAU, E.; SUCKAU, D.; AUST, D.; PILARSKY, C.; KRIEGSMANN, J. Imaging mass spectrometry to discriminate breast from pancreatic cancer metastasis in formalin-fixed paraffin-embedded tissues. **Proteomics**, Weinheim, v. 14, n. 7–8, p. 956–964, 2014.

CHEN, J.; XIE, P.; DAI, Q.; WU, P.; HE, Y.; LIN, Z.; CAI, Z. Spatial lipidomics and metabolomics of multicellular tumor spheroids using MALDI-2 and trapped ion mobility imaging. **Talanta**, Oxford, v. 265, n. 124795, 2023.

CHEN, Y.; HU, D.; ZHAO, L.; TANG, W.; LI, B. Unraveling metabolic alterations in transgenic mouse model of Alzheimer's disease using MALDI MS imaging with 4-aminocinnoline-3-carboxamide matrix. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 1192, n. 339337, 2022.

COLE, L. M. **Imaging mass spectrometry: methods and protocols**. New York: Humana Press, 2017. (Methods in Molecular Biology, 1618).

- CONE, E. J. Mechanisms of drug incorporation into hair. **Therapeutic Drug Monitorin**, New York, v. 18, n. 4, p. 438–443, 1996.
- CUYPERS, E.; FLINDERS, B.; BOONE, C. M.; BOSMAN, I. J.; LUSTHOF, K. J.; ASTEN, A. C. VAN; TYTGAT, J.; HEEREN, R. M. A. Consequences of decontamination procedures in forensic hair analysis using metal-assisted secondary ion mass spectrometry analysis. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 88, n. 6, p. 3091–3097, 2016.
- DAVE, K. A.; HEADLAM, M. J.; WALLIS, T. P.; GORMAN, J. J. Preparation and analysis of proteins and peptides using MALDI TOF/TOF mass spectrometry. **Current Protocols in Protein Science**, Hoboken, v. 63, n. 1, p. 16.13.1–16.13.21, 2011.
- BORDIN, D. C. M; MONEDEIRO, F. F. S. S.; CAMPOS, E. G.; ALVES, M. N. R.; BUENO, L. H. P.; MARTINIS, B. S. Técnicas de preparo de amostras biológicas com interesse forense. **Scientia Chromatographica**, São Carlos, v. 7, n. 2, p. 125–143, 2015.
- DENTI, V.; ANDERSEN, M. K.; SMITH, A.; MARY BOFIN, A.; NORDBORG, A.; MAGNI, F.; MOESTUE, A. S.; GIAMPÀ, M. Reproducible lipid alterations in patient-derived breast cancer xenograft FFPE tissue identified with MALDI MSI for pre-clinical and clinical application. **Metabolites**, Basel, v. 11, n. 9, p. 577, 2021.
- DIAS, M. F. R. G. Hair cosmetics: an overview. **International Journal of Trichology**, Mumbai, v. 7, n. 1, p. 2–15, 1 2015.
- DJAMBAZOVA, K. V.; ARDENNE, J. M. VAN; SPRAGGINS, J. M. Advances in imaging mass spectrometry for biomedical and clinical research. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 169, n. 117344, 11 p., 2023.
- ERNE, R.; BERNARD, L.; STEUER, A. E.; BAUMGARTNER, M. R.; KRAEMER, T. Hair analysis: contamination versus incorporation from the circulatory system- investigations on single hair samples using time-of-flight secondary ion mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 91, n. 6, p. 4132–4139, 2019.
- FERREIRA, J. A.; SANTOS, J. M.; BREITKREITZ, M. C.; FERREIRA, J. M. S.; LINS, P. M. P.; FARIAS, S. C.; MORAIS, D. R. DE; EBERLIN, M. N.; BOTTOLI, C. B. G. Characterization of the lipid profile from coconut (*Cocos nucifera* L.) oil of different varieties by electrospray ionization mass spectrometry associated with principal component analysis and independent component analysis. **Food Research International**, Ottawa, v. 123, p. 189–197, 2019.
- FLINDERS, B.; BASSINDALE, T.; HEEREN, R. M. A. Recent technological developments in MALDI-MSI based hair analysis. *In*: EMERGING technologies for the analysis of forensic traces. Cham: Springer, 2019. p. 133–149.
- FLINDERS, B.; BEASLEY, E.; VERLAAN, R. M.; CUYPERS, E.; FRANCESE, S.; BASSINDALE, T.; CLENCH, M. R.; HEEREN, R. M. A. Optimization of sample preparation and instrumental parameters for the rapid analysis of drugs of abuse in hair

samples by MALDI-MS/MS Imaging. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, New York, v. 28, n. 11, p. 2462–2468, 2017.

FLINDERS, B.; CUYPERS, E.; PORTA, T.; VARELIO, E.; HOPFGARTNER, G.; HEEREN, R. M. A. Mass spectrometry imaging of drugs of abuse in hair. *In*: COLE, L., (ed.). **Imaging mass spectrometry**. New York: Humana Press, 2017. p. 137–147. (Methods in molecular biology, 1618)

FLINDERS, B.; CUYPERS, E.; ZEIJLEMAKER, H.; TYTGAT, J.; HEEREN, R. M. A. Preparation of longitudinal sections of hair samples for the analysis of cocaine by MALDI-MS/MS and TOF-SIMS imaging. **Drug Testing and Analysis**, Chichester, v. 7, n. 10, p. 859–865, 2015.

FRIESEN, W. L.; SCHULTZ, B. J.; DESTINO, J. F.; ALIVIO, T. E. G.; STEET, J. R.; BANERJEE, S.; WOOD, T. D. Two-dimensional graphene as a matrix for MALDI imaging mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, New York, v. 26, p. 1963–1966, 2015.

GOMES, M. J.; MARTINS, S.; FERREIRA, D.; SEGUNDO, M. A.; REIS, S. Lipid nanoparticles for topical and transdermal application for alopecia treatment: development, physicochemical characterization, and in vitro release and penetration studies. **International Journal of Nanomedicine**, Auckland, v. 9, n. 1, p. 1231–1242, 2014.

GROSS, J. H. **Mass Spectrometry**. 3. ed. Heidelberg: Springer, 2017.

GUAN, M.; ZHANG, Z. LI, S.; LIU, J.; LIU, L.; YANG, H.; ZHANG, Y.; WANG, T.; ZHAO, Z. Silver nanoparticles as matrix for MALDI FTICR MS profiling and imaging of diverse lipids in brain. **Talanta**, Oxford, v. 179, p. 624–631, 2018.

GUMMER, C. L. Elucidating penetration pathways into the hair fiber using novel microscopic techniques. **Journal of Cosmetic Science**, New York, v. 52, n. 2, p. 265–280, 2001.

HAN, J.; PERMENTIER, H.; BISCHOFF, R.; GROOTHUIS, G.; CASINI, A.; HORVATOVICH, P. Imaging of protein distribution in tissues using mass spectrometry: an interdisciplinary challenge. **Trend in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 112, p. 13–28, 2019.

HENDERSON, G. L. Mechanisms of drug incorporation into hair. **Forensic Science International**, Lausanne, v. 63, n. 1–3, p. 19–29, 1993.

HERMANN, J.; NOELS, H.; THEELEN, W.; LELLIG, M.; ORTH-ALAMPOUR, S.; BOOR, P.; JANKOWSKI, V.; JANKOWSKI, J. Sample preparation of formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections for MALDI-mass spectrometry imaging. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 412, n. 6, p. 1263–1275, 2020.

HINDS, G.; THOMAS, V. D. Malignancy and cancer treatment-related hair and nail changes. **Dermatologic Clinics**, Philadelphia, v. 26, n. 1, p. 59–68, 2008.

HORATZ, K.; GIAMPÀ, M.; KARPOV, Y.; SAHRE, K.; BEDNARZ, H.; KIRIY, A.; VOIT, B.; NIEHAUS, K.; HADJICHRISTIDIS, N.; MICHELS, D. L.; LISSEL, F. Conjugated polymers as a new class of dual-mode matrices for MALDI mass spectrometry and imaging. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 140, n. 36, p. 11416–11423, 2018.

HUANG, X.; ZHAN, L.; SUN, J.; JINJUAN, X.; LIU, H.; XIONG, C.; NIE, Z. Utilizing a mini-humidifier to deposit matrix for MALDI imaging. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 90, p. 8309-8313, 2018.

IBGE. **Produção de abacate**. São Paulo, 2023. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/abacate/br>. Acesso em: 29 out. 2023.

KAMATA, T.; SHIMA, N.; SASAKI, K.; MATSUTA, S.; TAKEI, S.; KATAGI, M.; MIKI, A.; ZAITSU, K.; NAKANISHI, T.; SATO, T.; SUZUKI, K.; TSUCHIHASHI, H. Time-course mass spectrometry imaging for depicting drug incorporation into hair. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 87, n. 11, p. 5476–5481, 2015.

KEMPSON, I. M.; KIRKBRIDE, P. A method for the longitudinal sectioning of single hair samples near infrared laser dyes for latent fingerprint detection view project transformation of gunshot residue evidence view project. **Journal of Forensic Sciences**, v. 47, n. 4, p. 889–892, 2002.

KHARBACH, M.; YU, H.; KAMAL, R.; BARRA, I.; MARMOUZI, I.; CHERRAH, Y.; ALAOU, K.; BOUKLOUZE, A.; HEYDEN, Y. VANDER. New insights into the Argan oil categories characterization: chemical descriptors, FTIR fingerprints, and chemometric approaches. **Talanta**, Oxford, v. 225, n. 122073, 10 p., 2021.

KOJIMA, T. **Studies on the effects of hair cosmetics on human hair by secondary ion mass spectrometry**. [S. l.]: Semantic Scholar, 2015. Disponível em: <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:4849813>. Acesso em: 20 abr. 2023.

KOSYAKOV, D. S.; ANIKEENKO, E. A.; UL'YANOVSKII, N. V.; KHOROSHEV, O. Y.; SHAVRINA, I. S.; GORBOVA, N. S. Ionic liquid matrices for MALDI mass spectrometry of lignin. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 410, p. 7429–7439, 2018.

LEE, S. W.; JUHASZ, M.; MOBASHER, P.; EKELEM, C.; MESINKOVSKA, N. A. A systematic review of topical finasteride in the treatment of androgenetic alopecia in men and women. **Journal Drugs Dermatology**, New York, v. 17, n. 4, p. 457–463, 2018.

LOLLI, F.; PALLOTTI, F.; ROSSI, A.; FORTUNA, M. C.; CARO, G.; LENZI, A.; SANSONE, A.; LOMBARDO, F. Androgenetic alopecia: a review. **Endocrine**, Basingstoke, v. 57, p. 9–17, 2020.

MACCARRONE, G.; NISCHWITZ, S.; DEININGER, S. O.; HORNUNG, J.; KÖNIG, F. B.; STADELMANN, C.; TURCK, C. W.; WEBER, F. MALDI imaging mass spectrometry analysis - a new approach for protein mapping in multiple sclerosis brain lesions. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 1047, p. 131–140, 2017.

MALLAH, K.; QUANICO, J.; TREDE, D.; KOBEISSY, F.; ZIBARA, K.; SALZET, M.; FOURNIER, I. Lipid changes associated with traumatic brain injury revealed by 3D MALDI-MSI. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 90, p. 10568-10576, 2018.

MANTINIEKS, D.; GEROSTAMOULOS, D.; WRIGHT, P.; DRUMMER, O. The effectiveness of decontamination procedures used in forensic hair analysis. **Forensic Science, Medicine and Pathology**, Totowa, v. 14, p. 349–357, 2018.

MANZANARES-MEZA, L. D.; GUTIÉRREZ-ROMÁN, C. I.; MEDINA-CONTRERAS, O. MALDI imaging: beyond classic diagnosis. **Boletín Médico del Hospital Infantil de México**, Ciudad de México, v. 74, n. 3, p. 212–218, 2017.

MIKI, A.; KATAGI, M.; KAMATA, T.; ZAITSU, K.; TATSUNO, M.; NAKANISHI, T.; TSUCHIHASHI, H.; TAKUBO, T.; SUZUKI, K. MALDI-TOF and MALDI-FTICR imaging mass spectrometry of methamphetamine incorporated into hair. **Journal of Mass Spectrometry**, Chichester, v. 46, n. 4, p. 411–416, 2011.

MIKI, A.; KATAGI, M.; SHIMA, N.; KAMATA, H.; TATSUNO, M.; NAKANISHI, T.; TSUCHIHASHI, H.; TAKUBO, T.; SUZUKI, K. Imaging of methamphetamine incorporated into hair by MALDI-TOF mass spectrometry. **Forensic Toxicology**, London, v. 29, n. 2, p. 111–116, 2011.

MIRNEZAMI, R.; SPAGOU, K.; VORKAS, P. A.; LEWIS, M. R.; KINROSS, J.; WANT, E.; SHION, H.; GOLDIN, R. D.; DARZI, A.; TAKATS, Z.; HOLMES, E.; CLOAREC, O.; NICHOLSON, J. K. Chemical mapping of the colorectal cancer microenvironment via MALDI imaging mass spectrometry (MALDI-MSI) reveals novel cancer-associated field effects. **Molecular Oncology**, Amsterdam, v. 8, n. 1, p. 39–49, 2014.

NAKANISHI, T.; NIRASAWA, T.; TAKUBO, T. Quantitative mass barcode-like image of nicotine in single longitudinally sliced hair sections from long-term smokers by matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry imaging. **Journal of Analytical Toxicology**, Oxford, v. 38, n. 6, p. 349–353, 2014.

NIEHAUS, M.; SOLTWISCH, J.; BELOV, M. E.; DREISEWERD, K. Transmission-mode MALDI-2 mass spectrometry imaging of cells and tissues at subcellular resolution. **Nature Methods**, New York, v. 16, n. 9, p. 925–931, 2019.

NYE, L. C.; HITZENBERGER, J. F.; ROUBELAKIS, M. M.; ORFANOPOULOS, M.; DREWELLO, T. Chemistry at the rim: differentiation of isomeric open-cage fullerenes by MALDI-LIFT and ESI-MS/MS. **International Journal of Mass Spectrometry**, Amsterdam, v. 436, p. 59–64, 2019.

O'ROURKE, M. B.; DJORDJEVIC, S. P.; PADULA, M. P. A non-instrument-based method for the analysis of formalin-fixed paraffin-embedded human spinal cord via matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Chichester, v. 29, n. 19, p. 1836–1840, 2015.

PAGLIUCA, G.; BOZZI, C.; GALLO, F. R.; MULTARI, G.; PALAZZINO, G.; PORRÀ, R.; PANUSA, A. Triacylglycerol “hand-shape profile” of Argan oil. Rapid and simple UHPLC-PDA-ESI-TOF/MS and HPTLC methods to detect counterfeit Argan oil and Argan-oil-based products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 150, p. 121–131, 2018.

PHILIPSEN, M. H.; HAXEN, E. R.; MANAPRASERTSAK, A.; MALMBERG, P.; HAMMARLUND, E. U. Mapping the chemistry of hair strands by mass spectrometry imaging-a review. **Molecules**, v. 26, n. 24, 2021.

PIETROWSKA, M.; GAWIN, M.; POLAŃSKA, J.; WIDŁAK, P. Tissue fixed with formalin and processed without paraffin embedding is suitable for imaging of both peptides and lipids by MALDI-IMS. **Proteomics**, Weinheim, v. 16, n. 11–12, p. 1670–1677, 2016.

POETZSCH, M.; BAUMGARTNER, M. R.; STEUER, A. E.; KRAEMER, T. Segmental hair analysis for differentiation of tilidine intake from external contamination using LC-ESI-MS/MS and MALDI-MS/MS imaging. **Drug Testing and Analysis**, Oxford, v. 7, n. 2, p. 143–149, 2015.

PRAGST, F.; BALIKOVA, M. A. State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 370, n. 1–2, p. 17-49, 2006.

RANDALL, V. A. Androgens and hair growth. **Dermatologic Therapy**, Copenhagen, v. 21, n. 5, p. 314–328, 2008.

REDLER, S.; MESSENGER, A. G.; BETZ, R. C. Genetics and other factors in the aetiology of female pattern hair loss. **Experimental Dermatology**, Copenhagen, v. 26, n. 6, p. 510–517, 2017.

RIBEIRO, A. C. ; J. D. A. ; S. V. M. **Tricologia e cosmética capilar**. São Paulo: Companhia Farmacêutica de Publicações Ltda, 2021. 312 p.

RONCI, M.; SHARMA, S.; CHATAWAY, T.; BURDON, K. P.; MARTIN, S.; CRAIG, J. E.; VOELCKER, N. H. MALDI-MS-imaging of whole human lens capsule. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 10, n. 8, p. 3522–3529, 2011.

RYAN, D. J.; SPRAGGINS, J. M.; CAPRIOLI, R. M. Protein identification strategies in MALDI imaging mass spectrometry: a brief review. **Current Opinion in Chemical Biology**, London, v. 48, p. 64–72, 2019.

RZAGALINSKI, I.; KOVAČEVIĆ, B.; HAINZ, N.; MEIER, C.; TSCHERNIG, T.; VOLMER, D. A. Toward higher sensitivity in quantitative MALDI imaging mass spectrometry of CNS drugs using a nonpolar matrix. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 90, n. 21, p. 12592–12600, 2018.

RZAGALINSKI, I.; VOLMER, D. A. Quantification of low molecular weight compounds by MALDI imaging mass spectrometry – a tutorial review. **Biochimica et Biophysica Acta. Proteins and Proteomics**, Amsterdam, v. 1865, ed. 7, p. 726-739, 2017.

SANTOS, J. D. **Caracterização de fios de cabelo antes e após tratamentos químicos e físicos por espectroscopias Raman e no infravermelho e microscopia eletrônica**. 2017. 82 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2017.

SANTOS, J. D.; PINTO, P. F.; EDWARDS, H. G. M.; CAPPA DE OLIVEIRA, L. F. Characterization by Raman and infrared spectroscopy and fluorescence microscopy of human hair treated with cosmetic products. **Spectrochimica Acta Part A: molecular and biomolecular spectroscopy**, Oxford, v. 280, n. 121577, 9 p., 2022.

SHEN, M.; XIANG, P.; SHI, Y.; PU, H.; YAN, H.; SHEN, B. Mass imaging of ketamine in a single scalp hair by MALDI-FTMS forensic toxicology. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 406, n. 19, p. 4611–4616, 2014.

SHIMA, N.; SASAKI, K.; KAMATA, T.; MATSUTA, S.; WADA, M.; KAKEHASHI, H.; NAKANO, S.; KAMATA, H.; NISHIOKA, H.; SATO, T.; TSUCHIHASHI, H.; MIKI, A.; KATAGI, M. Incorporation of zolpidem into hair and its distribution after a single administration. **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v. 45, n. 3, p. 286–293, 2017.

SIMAKOU, T.; BUTCHER, J. P.; REID, S.; HENRIQUEZ, F. L. Alopecia areata: a multifactorial autoimmune condition. **Journal of Autoimmunity**, London, v. 98, p. 74–85, 2019.

SIO, G. DE; SMITH, A. J.; GALLI, M.; GARANCINI, M.; CHINELLO, C.; BONO, F.; PAGNI, F.; MAGNI, F. A MALDI-Mass Spectrometry Imaging method applicable to different formalin-fixed paraffin-embedded human tissues. **Molecular BioSystems**, Cambridge, v. 11, n. 6, p. 1507–1514, 2015.

SOCIETY OF HAIR TESTING. Recommendations for hair testing in forensic cases. **Forensic Science International**, Lausanne, v. 145, p. 83–84, 2004.

SOLTWISCH, J.; KETTLING, H.; VENS-CAPPELL, S.; WIEGELMANN, M.; MÜTHING, J.; DREISEWERD, K. Mass spectrometry imaging with laser-induced postionization. **Science**, New York, v. 348, n. 6231, p. 211–215, 2015.

SOMMELLA, E.; SALVIATI, E.; CAPONIGRO, V.; GRIMALDI, M.; MUSELLA, S.; BERTAMINO, A.; CACACE, L.; PALLADINO, R.; MAURO, G. D.; MARINI, F.; D'URSI, A. M.; CAMPIGLIA, P. MALDI mass spectrometry imaging highlights specific metabolome and lipidome profiles in salivary gland tumor tissues. **Metabolites**, Basel, v. 12, n. 6, p. 530, 2022.

SPENGLER, B.; HUBERT, M.; KAUFMANN, R. LAMMA 2000: a new scanning UV-laser microprobe for ion imaging and confocal microscopy. *In*: ASMS CONFERENCE ON MASS SPECTROMETRY AND ALLIED TOPICS, 42., 1994, Illinois. **Proceedings** [...]. Illinois: ASMA, 1994.

STARACE, M.; ORLANDO, G.; ALESSANDRINI, A.; PIRACCINI, B. M. Female androgenetic alopecia: an update on diagnosis and management. **American Journal of Clinical Dermatology**, Auckland, v. 21, n. 1, p. 69–84, 2020.

STOECKLI, M.; FARMER, T. B.; CAPRIOLI, R. M. Automated mass spectrometry imaging with a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight instrument. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, New York, v. 10, n. 1, 1999.

STOLP, L. J.; KODALI, D. R. Naturally occurring high-oleic oils: avocado, macadamia, and olive oils. *In*: FLIDER, F. J. **High oleic oils: development, properties, and uses**. Oxford: Elsevier, 2022. Cap 2, p. 7–52.

STURTEVANT, D.; LEE, Y. J.; CHAPMAN, K. D. Matrix assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry imaging (MALDI-MSI) for direct visualization of plant metabolites in situ. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 37, p. 53–60, 2016.

SUCKAU, D.; RESEMANN, A.; SCHUERENBERG, M.; HUFNAGEL, P.; FRANZEN, J.; HOLLE, A. A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 376, n. 7, p. 952–965, 27 ago. 2003.

TINOCO, A.; MARTINS, M.; CAVACO-PAULO, A.; RIBEIRO, A. Biotechnology of functional proteins and peptides for hair cosmetic formulations. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 40, n. 5, p. 591–605, 2022.

TONIN, A. P. P.; RIBEIRO, M.; MORAES SILVA, V. DE; OLIVEIRA, C. C.; SARAGIOTTO, M. H.; EBERLIN, M. N.; MEURER, E. C. 8-Crown-6 spiking in direct infusion ESI-MS analysis of complex mixtures: “One ion per analyte” relationship facilitating ion assignments and eliminating isobaric interferences. **International Journal of Mass Spectrometry**, Amsterdam, v. 418, p. 37–40, 2017.

TSANACLIS, L.; ANDRAUS, M.; WICKS, J. Hair analysis when external contamination is in question: a review of practical approach for the interpretation of results. **Forensic Science International**, Lausanne, v. 285, p. 105–110, 2018.

UEKI, R.; FUKUSAKI, E.; SHIMMA, S. History of hair analysis by mass spectrometry imaging. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 133, n. 2, p. 89–97, 2022.

UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. **Guidelines for testing drugs under international control in hair, sweat and oral fluid**. Viena: UNODC, 2014. 96 p.

VAREJÃO, C. S.; BORGES, G. G.; NUNES, L. M. P.; SILVINO, Z. R.; SANTO, F. H. E.; CHRISTOVAM, B. P. Terapêutica oncológica para enfermeiros e farmacêuticos. **Revista de Enfermagem UFPE on line**, Recife, v. 8, n. 12, p. 4406–4407, 2014.

- WANG, H.; WANG, Y. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric imaging for the rapid segmental analysis of methamphetamine in a single hair using umbelliferone as a matrix. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 975, p. 42–51, 2017.
- WANG, J.; LU, Z.; L-S AU, J. Protection against chemotherapy-induced alopecia. **Pharmaceutical Research**, New York, v. 23, n. 11, p. 2505–2514, 2006.
- WANG, J.; YANG, E.; CHAURAND, P.; RAGHAVAN, V. Visualizing the distribution of strawberry plant metabolites at different maturity stages by MALDI-TOF imaging mass spectrometry. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 345, n. 128838, 9 p., 2021.
- WANG, X. N.; SONG, Y.; TANG, W.; LI, P.; LI, B. Integration of fluorescence and MALDI imaging for microfluidic chip-based screening of potential thrombin inhibitors from natural products. **Biosensors and Bioelectronics**, Amsterdam, v. 237, n. 115527, 8 p., 2023.
- WOŁOWIEC, P.; MICHALAK, I.; CHOJNACKA, K.; MIKULEWICZ, M. Hair analysis in health assessment. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 419, p. 139–171, 2013.
- WUTTIKUL, K.; SAINAKHAM, M. In vitro bioactivities and preparation of nanoemulsion from coconut oil loaded *Curcuma aromatica* extracts for cosmeceutical delivery systems. **Saudi Journal of Biological Sciences**, Amsterdam, v. 29, n. 103435, 9 p., 2022.
- YANG, E.; KIM, J. H.; TRESSLER, C. M.; SHEN, X. E.; BROWN, D. R.; JOHNSON, C. C.; HAHM, T. H.; BARMAN, I.; GLUNDE, K. RaMALDI: enabling simultaneous Raman and MALDI imaging of the same tissue section. **Biosensors and Bioelectronics**, Amsterdam, v. 239, n. 115597, 2023.
- ZHANG, Y. X.; ZHANG, Y. D.; SHI, Y. P. A reliable and effective sample preparation protocol of MALDI-TOF-MSI for lipids imaging analysis in hard and dry cereals. **Food Chemistry**, Oxford, v. 398, p. 133911, 2023.

Anexo I

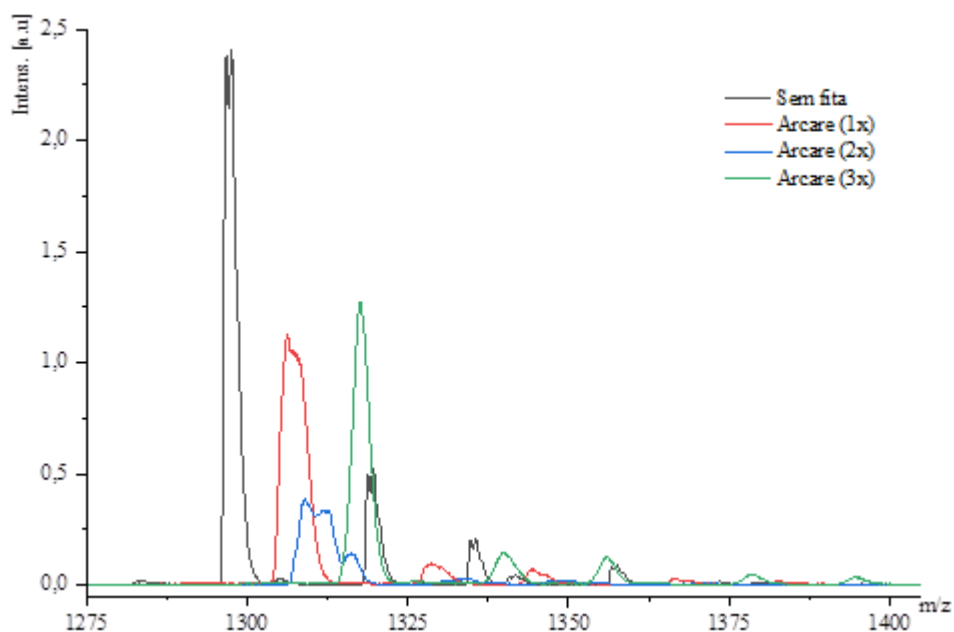


Figura I. Espectro MALDI-TOF do padrão de Angiotensina I aplicado diretamente na lâmina ITO sem fita (preto) e sobre fita Arcare, sendo uma camada da fita em vermelho, duas camadas da fita em azul e três camadas da fita em verde, na região de m/z entre 1.275 e 1.405. Fonte: Autoria própria.

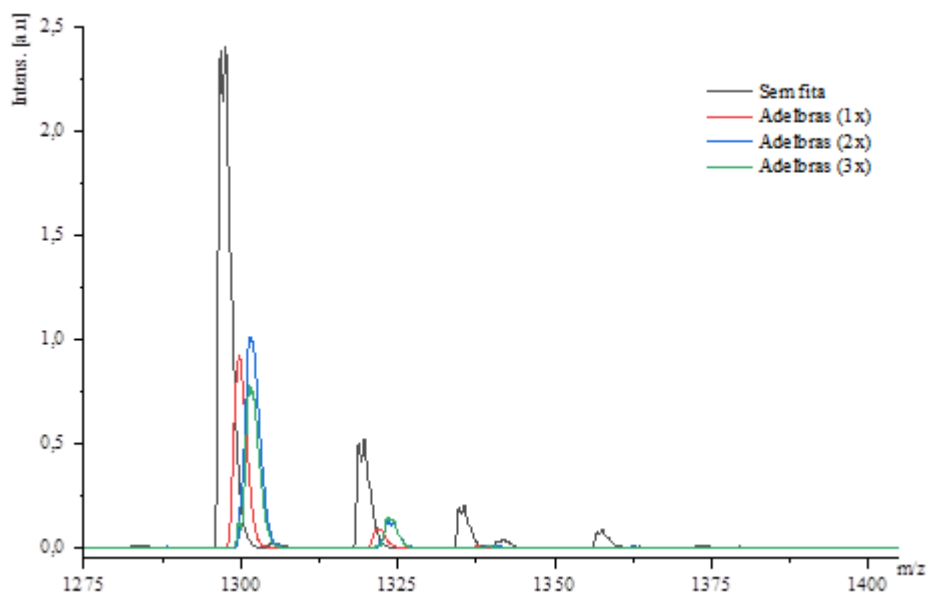


Figura II. Espectro MALDI-TOF do padrão de Angiotensina I aplicado diretamente na lâmina ITO sem fita (preto) e sobre fita Adelbras, sendo uma camada da fita em vermelho, duas camadas da fita em azul e três camadas da fita em verde, na região de m/z entre 1.275 e 1.405. Fonte: Autoria própria.

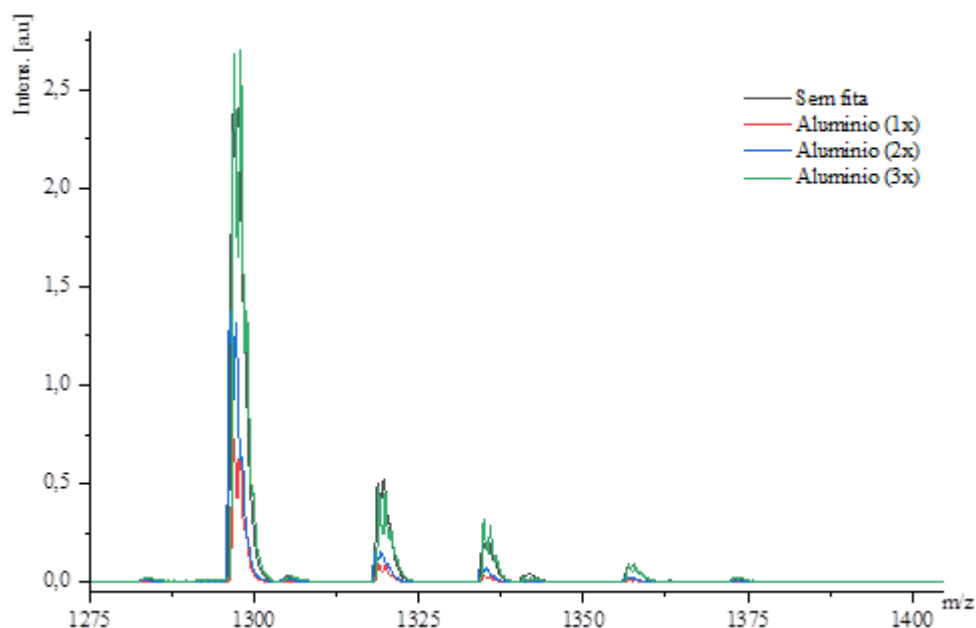


Figura III. Espectro MALDI-TOF do padrão de Angiotensina I aplicado diretamente na lâmina ITO sem fita (preto) e sobre fita de alumínio, sendo uma camada da fita em vermelho, duas camadas da fita em azul e três camadas da fita em verde, na região de m/z entre 1.275 e 1.405. Fonte: Autoria própria.

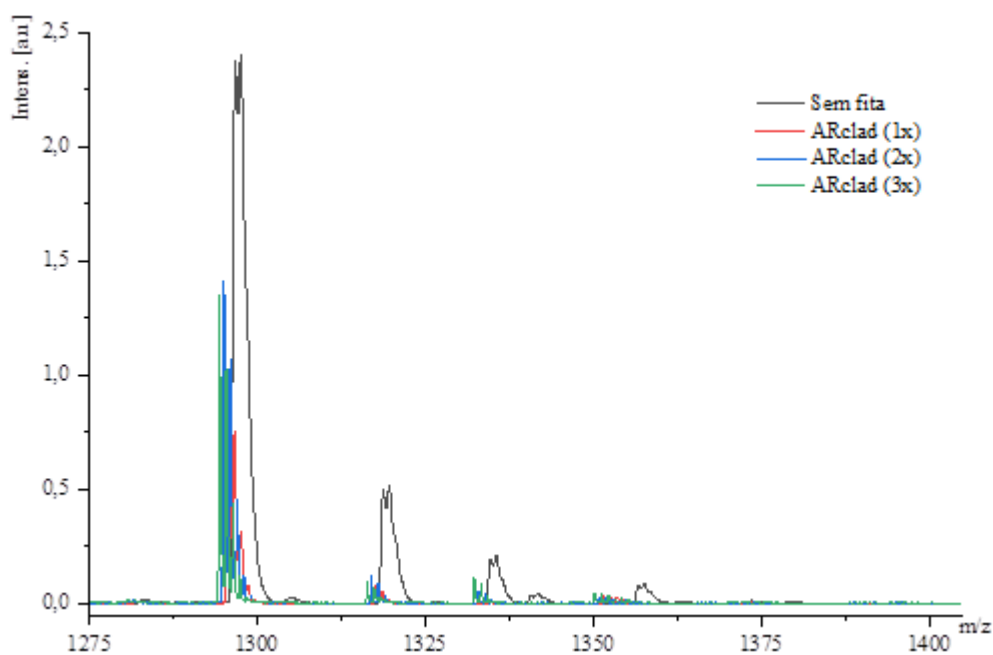


Figura IV. Espectro MALDI-TOF do padrão de Angiotensina I aplicado diretamente na lâmina ITO sem fita (preto) e sobre fita ARclad®, sendo uma camada da fita em vermelho, duas camadas da fita em azul e três camadas da fita em verde, na região de m/z entre 1.275 e 1.405. Fonte: Autoria própria.