



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
LICENCIATURA EN CIENCIA FORENSE**



Facultad de Medicina



**CIENCIA
FORENSE
UNAM**

**“Desarrollo de un método de extracción y
cuantificación de melaninas en muestras de
cabello con aplicación forense.”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN CIENCIA FORENSE**

P R E S E N T A:

CÁRDENAS ALVAREZ SAMARA ISABEL

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. MARÍA ELENA BRAVO GÓMEZ

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.,
2020**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
MARCO TEÓRICO	4
MELANINA.	4
<i>Propiedades químicas</i>	4
<i>Biosíntesis</i>	5
I. Eumelanina.	7
II. Feomelanina.	9
<i>Pigmentación humana</i>	11
<i>Color del cabello</i>	11
FENOTIPOS DE PIGMENTACIÓN.	13
<i>Variación fenotípica del color del cabello</i>	13
<i>Estudios de predicción fenotípica</i>	14
IDENTIFICACIÓN DE LAS MELANINAS POR MÉTODOS QUÍMICOS.	16
<i>Cromatografía líquida de alta resolución</i>	18
a. Fundamento teórico	18
b. Identificación y cuantificación de las melaninas.....	19
<i>Espectrofotometría ultravioleta</i>	20
a. Fundamento teórico.....	20
b. Consideraciones técnicas.....	22
c. Identificación y cuantificación de las melaninas.....	23
<i>Método de Ozeki y cols., 1996</i>	23
<i>Ley de Aditividades</i>	24
<i>Método de adición de estándar</i>	26
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	27
OBJETIVOS	28
OBJETIVO GENERAL.	28

OBJETIVOS PARTICULARES.....	28
JUSTIFICACIÓN	29
MATERIALES.....	31
REACTIVOS Y SOLUCIONES.....	31
INSTRUMENTOS Y EQUIPO	31
MUESTRAS BIOLÓGICAS.....	32
METODOLOGÍA Y RESULTADOS	33
PREPARACIÓN DE LAS SUSTANCIAS DE REFERENCIA.	33
IDENTIFICACIÓN DE LAS SUSTANCIAS DE REFERENCIA.	36
<i>I. Espectroscopía infrarroja.....</i>	<i>36</i>
I. Eumelanina.	37
II. Feomelanina.	39
<i>II. Espectrofotometría ultravioleta.</i>	<i>41</i>
<i>III. Solubilidad.....</i>	<i>43</i>
<i>Condiciones óptimas para la extracción y determinación por</i>	
<i>espectrofotometría UV-vis de melaninas sintéticas.</i>	<i>49</i>
ELECCIÓN DE LAS LONGITUDES DE ONDA DE TRABAJO.....	50
REPRODUCIBILIDAD DE LOS ESPECTROS DE MELANINA DE DIFERENTES SÍNTESIS.	51
ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS DE CABELLO.....	54
<i>Extracción de las melaninas.....</i>	<i>55</i>
CUANTIFICACIÓN DE LAS MELANINAS DEL CABELLO POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV. .	57
<i>Cuantificación por la Ley de Aditividades</i>	<i>57</i>
I. Curvas de calibración.....	58
II. Medición de la proporción de las melaninas en el cabello.	61
III. Recobro.....	63
<i>Cuantificación por adición estándar.</i>	<i>65</i>
I. Curva de calibración.....	66
II. Recobro.....	69
ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	70

CONCLUSIONES	78
PERSPECTIVAS	79
BIBLIOGRAFÍA	80
APÉNDICES	86
1. ASIGNACIÓN DEL COLOR DEL CABELLO.	87
2. CÁLCULO DE LA CONCENTRACIÓN DE MELANINAS.....	91
<i>a. Ley de Aditividades</i>	<i>91</i>
<i>b. Método de adición estándar.</i>	<i>93</i>
3. CÁLCULOS DEL PORCENTAJE DE RECOBRO DE LAS MELANINAS.....	95
<i>a. Ley de Aditividades</i>	<i>95</i>
<i>b. Método de adición estándar.</i>	<i>96</i>
4. FICHA DE DATOS DE SEGURIDAD DEL SOLUENO®.....	97

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA MELANINA NATURAL.....	4
FIGURA 2. FORMACIÓN CELULAR DE LA MELANINA.....	6
FIGURA 3. SÍNTESIS BIOQUÍMICA DE LA MELANINA	7
FIGURA 4. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL POLÍMERO DE LA EUMELANINA.....	7
FIGURA 5. SÍNTESIS DE LA EUMELANINA.....	8
FIGURA 6. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL POLÍMERO DE LA FEOMELANINA.....	9
FIGURA 7. BIOSÍNTESIS DE LA FEOMELANINA.....	10
FIGURA 8. ESQUEMA DE UN FOLÍCULO PILOSO.	11
FIGURA 9. ESTRUCTURA DEL CABELLO.	12
FIGURA 10. REPRESENTACIÓN DE LA RELACIÓN DE LOS PIGMENTOS DE MELANINA SEGÚN EL TIPO DE CABELLO, CONSIDERANDO QUE LOS PUNTOS ROJOS REPRESENTAN LA FEOMELANINA, Y LOS NEGROS Y CAFÉS A LA EUMELANINA.....	13
FIGURA 11. VARIACIÓN DEL COLOR DEL CABELLO EN LAS DIFERENTES POBLACIONES.....	14
FIGURA 12. EJEMPLO DE UN PERFIL GENÉTICO GENERADO A PARTIR DE MUESTRAS DE ADN...	15
FIGURA 13. DIAGRAMA DE LOS COMPONENTES DE UN ESPECTROFOTÓMETRO CON UN DETECTOR.....	22
FIGURA 14. EJEMPLO DE UNA GRÁFICA DE ADICIÓN PATRÓN	26
FIGURA 15. SOLUCIONES PREPARADAS DE 1) EUMELANINA Y 2) FEOMELANINA DESPUÉS DE LA INCUBACIÓN.	34
FIGURA 16. DIAGRAMA DE LA SÍNTESIS DE LA EUMELANINA.	35
FIGURA 17. DIAGRAMA DE LA SÍNTESIS DE LA FEOMELANINA.	35

FIGURA 18. ESPECTRO INFRARROJO DE LAS MELANINAS DEL CABELLO HUMANO ROJO Y OSCURO.....	37
FIGURA 19. ESPECTRO INFRARROJO DE LA EUMELANINA SINTETIZADA A PARTIR DE L-DOPA ..	38
FIGURA 20. ESPECTRO INFRARROJO OBTENIDO DE LA EUMELANINA SINTETIZADA.....	39
FIGURA 21. ESPECTRO INFRARROJO OBTENIDO DE LA FEOMELANINA SINTETIZADA.....	40
FIGURA 22. ESPECTRO UV-VIS DE LA MELANINA SINTETIZADA EN CEPAS MELANIZADAS DE ASPERGILLUS NIDULANS, DONDE A) CORRESPONDE AL ESPECTRO DE LA MELANINA EXTRAÍDA DEL MEDIO DE CULTIVO, EL B) A LA MELANINA EXTRAÍDA DEL MICELIO Y EL C) A LA MELANINA SINTÉTICA.	42
FIGURA 23. ESPECTROS UV-VIS OBTENIDOS DE LAS MELANINAS SINTÉTICAS EN UNA SOLUCIÓN DE NaOH 0.5 M, A UNA CONCENTRACIÓN FINAL APROXIMADA DE 0.5 MG/ML.....	43
FIGURA 24. ESPECTROS UV-VIS DE LA EUMELANINA SINTETIZADA (10 MG/ML) POR UN TIEMPO DE CUATRO HORAS Y A DIFERENTES TEMPERATURAS DE INCUBACIÓN.	47
FIGURA 25. DIAGRAMA DE LA EXTRACCIÓN Y MEDICIÓN DE LA MELANINA POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS.	49
FIGURA 26. ESPECTROS UV-VIS DE LAS MELANINAS SINTÉTICAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES.....	50
FIGURA 27. ESPECTROS UV-VIS DE LAS MELANINAS SINTÉTICAS, LUEGO DE REALIZAR DILUCIONES DE LAS MUESTRAS INICIALES.	51
FIGURA 28. ESPECTROS UV-VIS DE LAS REPETICIONES DEL MÉTODO DE SÍNTESIS DE LAS MELANINAS A UNA CONCENTRACIÓN APROXIMADA DE 1 MG/ML EN DIFERENTES DÍAS.	52
FIGURA 29. DIFERENTES MUESTRAS DE CABELLO SELECCIONADAS PARA SU ANÁLISIS.	54
FIGURA 30. ESPECTROS UV-VIS OBTENIDOS DE LAS MUESTRAS DE CABELLO ANALIZADAS.	56
FIGURA 31. GRÁFICA DE LA ABSORBANCIA VS LA CONCENTRACIÓN DE LA EUMELANINA SINTETIZADA A UNA LONGITUD DE ONDA DE 360 NM.	59

FIGURA 32. GRÁFICA DE LA ABSORBANCIA VS LA CONCENTRACIÓN DE LA EUMELANINA SINTETIZADA A UNA LONGITUD DE ONDA DE 700 NM.	59
FIGURA 33. GRÁFICA DE LA ABSORBANCIA VS LA CONCENTRACIÓN DE LA FEOMELANINA SINTETIZADA A UNA LONGITUD DE ONDA DE 360 NM.	60
FIGURA 34. GRÁFICA DE LA ABSORBANCIA VS LA CONCENTRACIÓN DE LA FEOMELANINA SINTETIZADA A UNA LONGITUD DE ONDA DE 700 NM.	60
FIGURA 35. GRÁFICA DE LOS ESPECTROS OBTENIDOS AL ADICIONAR UN VOLUMEN CONOCIDO A LA MUESTRA DE CABELLO.	64
FIGURA 36. GRÁFICA DE LA ABSORBANCIA VS LA CONCENTRACIÓN DE LA EUMELANINA EN CURVA DE ADICIÓN PATRÓN A 520 NM SOBRE LA MUESTRA 4.....	67
FIGURA 37. GRÁFICA DE LA ABSORBANCIA VS LA CONCENTRACIÓN DE LA FEOMELANINA EN CURVA DE ADICIÓN PATRÓN A 534 NM SOBRE LA MUESTRA 4.....	68
FIGURA 39. COLORACIÓN DEL EXTRACTO DE LA MUESTRA 4.	75

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. CARACTERÍSTICAS ESPECTRALES DE CROMÓFOROS ENCONTRADOS EN LAS PROTEÍNAS.....	23
TABLA 2. ANÁLISIS DE SOLUBILIDAD DEL PRECIPITADO DE LAS MELANINAS SINTETIZADAS.	44
TABLA 3. VOLUMEN TOMADO DE LA FASE SUPERIOR DE CADA MUESTRA.....	48
TABLA 4. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE REPETIBILIDAD DURANTE TRES DÍAS DIFERENTES EN LAS MUESTRAS DE EUMELANINA Y FEOMELANINA SINTETIZADAS.	53
TABLA 5. PREPARACIÓN DE LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN.	58
TABLA 6. RESULTADO DE LAS CONCENTRACIONES DE LAS MELANINAS OBTENIDAS DE LAS MUESTRAS DE CABELLO.....	62
TABLA 7. RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE RECOBRO OBTENIDO DE CADA MELANINA.	64
TABLA 8. CURVA DE CALIBRACIÓN CON ESTÁNDAR ADICIONADO PARA LA EUMELANINA.	66
TABLA 9. CURVA DE CALIBRACIÓN CON ESTÁNDAR ADICIONADO PARA LA FEOMELANINA.	66
TABLA 10. RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE RECOBRO OBTENIDO DE CADA MELANINA POR ADICIÓN ESTÁNDAR.....	69
TABLA 11. RESULTADOS DE LA ASIGNACIÓN DEL COLOR A PARTIR DE FOTOGRAFÍAS DE LAS DIFERENTES MUESTRAS DE CABELLO HECHA POR LOS DIFERENTES OPERADORES.....	87
TABLA 12. TABLA DE FRECUENCIAS DE LOS COLORES ASIGNADOS A CADA MUESTRA DE CABELLO A PARTIR DE UNA FOTOGRAFÍA.....	88
TABLA 13. RESULTADOS DE LA ASIGNACIÓN DEL COLOR A TRAVÉS DE UN MICROSCOPIO ESTEREOSCÓPICO DE LAS DIFERENTES MUESTRAS DE CABELLO HECHA POR LOS DIFERENTES OPERADORES.	89
TABLA 14. TABLA DE FRECUENCIAS DE LOS COLORES ASIGNADOS A CADA MUESTRA DE CABELLO A TRAVÉS DE UN MICROSCOPIO ESTEREOSCÓPICO.....	90

ABREVIATURAS

2-CysDopa	2-S-CisteinilDOPA
3-AT	3-Aminotirosina
3-AHP	3-amino-4-hidroxifenilalanina
4-AHP	4-amino-3-hidroxifenilalanina
5-CysDopa	5-S-CisteinilDOPA
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AHP	4-Amino-3-hidroxifenilalanina
ATR	Reflexión total atenuada
CLAR	Cromatografía líquida de alta resolución
DHI	5,6-Dihidroxiindol
DHICA	Ácido 5,6-Dihidroxiindol-2-carboxílico
HBTA	6-(2-amino-2-carboxietil)-4-hidroxi-1,3-benzotiazol
L-DOPA	L-3,4-Dihidroxifenilalanina
mM	Milimolar
PDCA	Ácido pirrol-2,3-dicarboxílico
PTCA	Ácido pirrol-2,3,5-tricarboxílico
RIA	Radioinmunoensayo
Rpm	Revoluciones por minuto
TDCA	Ácido tiazol-4,5-dicarboxílico
TRP-1	Proteína 1 relacionada con la tirosinasa
TRP-2	Proteína 2 relacionada con la tirosinasa o DOPAcromo tautomerasa
TTCA	Ácido tiazol-2,4,5-tricarboxílico
UV	Ultravioleta

RESUMEN

Mediante el uso de rasgos físicos, las ciencias forenses permiten clasificar e individualizar a las personas involucradas en un evento delictivo. Empleando diversos métodos o técnicas cualitativas y cuantitativas, que, con base en la identificación o reconocimiento de los rasgos distintivos de las personas, permiten obtener un “retrato hablado” a partir de características fenotípicas.

El color del cabello es una de las características fenotípicas más notables en los humanos, variando entre tonalidades que se pueden clasificar como negro, café, rubio y rojo. Esta diversidad es el resultado de la cantidad y proporción de las melaninas, que son los pigmentos naturales depositados en forma de gránulos en la médula del cabello y sintetizados en los melanocitos foliculares, en donde se diferencian en eumelaninas (color negro a café) y feomelaninas (color amarillo a rojizas).

Para estudiar la diversidad del color del cabello desde el punto de vista químico, existen diversos métodos analíticos para cuantificar los pigmentos, pudiendo identificar y cuantificar las melaninas (fenotipo "químico") presentes en los diferentes colores de cabello (fenotipo "visual").

En el presente trabajo se optimizó un método de síntesis de la eumelanina y feomelanina a partir de L-DOPA, cisteína y tirosinasa, permitiendo la obtención de ambas melaninas de forma aislada. Además, se logró la extracción de las melaninas del cabello empleando Solueno® como solvente de extracción.

Se desarrollaron dos métodos para la cuantificación de las melaninas por espectrofotometría ultravioleta, el primero basado en la Ley de Aditividades y el segundo mediante la cuantificación por adición estándar.

De los resultados obtenidos, se encontró que el método de adición estándar permitió obtener resultados prometedores para cuantificar la eumelanina y feomelanina de los melanocitos foliculares ya que este método que toma en cuenta el efecto matriz.

INTRODUCCIÓN

Los rasgos de pigmentación humana, como el color de la piel, los ojos y el cabello, pertenecen a los rasgos humanos más visibles y diferenciadores que han sido objeto de estudio científico durante varios años.

La pigmentación se explica principalmente por la presencia de melanina en la epidermis, el iris y el cabello. La variación fenotípica en los rasgos de pigmentación se determina por la cantidad, el tipo y la distribución de melanina dentro de células particulares, los melanocitos (Ortonne y Prota, 1993).

En estudios genéticos, los fenotipos de pigmentación se han medido categóricamente con base en un amplio consenso. A menudo, se accede a éstas a través de cuestionarios, ya sea preguntando directamente en cuál de las categorías de color de ojos o cabello cree una persona que se encuentra, o preguntando más indirectamente sobre la capacidad de bronceado relacionadas con el color de la piel. Sin embargo, es probable que tales fenotipos basados en la aplicación de cuestionarios sean propensos a errores debido a las diferencias individuales en la percepción de los colores y su clasificación en categorías, por ejemplo, para una misma muestra, la asignación del color hecha por varios individuos puede resultar en que el cabello se considere castaño, café, café oscuro o incluso negro. Resultado de la percepción en la asignación del color se tiene un gran problema, cuanto más similares son las muestras, más difícil resulta su categorización. Los fenotipos basados en cuestionarios también son propensos a errores sobre todo en los rasgos que cambian con la edad, como el color del cabello (Liu, Wen, y Kayser, 2013).

El uso de información categorizada simplifica los rasgos continuos, por lo que se ha enfatizado el uso del espectro completo de color de forma cuantitativa en estudios de los rasgos de pigmentación humana (Sulem y cols., 2007).

Actualmente, existen varias estrategias para estudiar la pigmentación humana de una manera cuantitativa basada en tecnologías de reflectancia, bioimagen o bioquímica, las cuales incluyen colorimetría, reflectometría de banda

(Parra, 2007), espectroscopía, fotografías digitales y cromatografía líquida de alto resolución (CLAR) .

De acuerdo con la literatura, los estudios futuros que exploren los fenotipos de pigmentación humana (el color del ojo, el cabello y de la piel), deben concentrarse en mejorar la precisión en la predicción del fenotipo de color mediante el empleo de métodos cuantitativos, en lugar de categorizar la información del fenotipo del color (Tistarelli y Champod, 2017).

En la Unidad de Investigación de la Licenciatura en Ciencia Forense de la UNAM, se busca establecer marcadores propios de la población mexicana, que puedan ser empleados para hacer predicciones y generar un “retrato hablado” a partir de características fenotípicas.

Por lo que, con el objetivo de contribuir desde el área química a la predicción fenotípica forense, el presente trabajo propone el desarrollo de un método analítico para la determinación cuantitativa del color del cabello, con la finalidad de evitar sesgos en la asignación del color.

MARCO TEÓRICO

Melanina.

La melanina es un pigmento ubicuo distribuido en todos los reinos biológicos y es poco conocida al tratarse de un biopolímero, sin una estructura bien definida, que es difícil de aislar y estudiar (Zonios y cols., 2008).

Propiedades químicas.

Su molécula (Figura 1) posee un peso molecular alto, es muy estable, amorfa, está cargada negativamente, es resistente a la degradación con ácidos, pero susceptible a la degradación con bases fuertes; hidrofóbica, insoluble en agua o disolventes orgánicos y se forma por la polimerización oxidativa de compuestos fenólicos o indólicos (Urán y Cano, 2008).

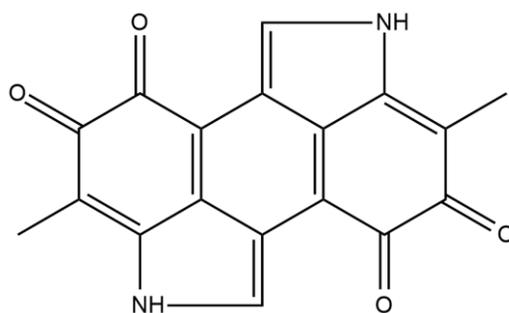


Figura 1. Estructura química de la melanina natural.

Es térmicamente estable hasta 30°C, sin mostrar transiciones estructurales, sin embargo, conforme se incrementa la temperatura comienza a degradarse su estructura molecular, perdiendo un peso aproximado al 11.9% al alcanzar los 106°C (Sawhney, 1994).

El polímero de melanina tiene muchas propiedades, como la amplia absorción espectral debido al alto grado de conjugación en la molécula. La oscuridad del pigmento es el resultado de que gran parte del espectro visible se absorbe, incluida la radiación con baja energía. Las melaninas también absorben en la región ultravioleta del espectro, lo que implica transiciones desde el enlace π a los orbitales del anti-enlace π^* , que se producen en los enlaces de carbono insaturados. Las melaninas con altos niveles de indol quinonas (eumelanina) son más oscuras, debido a la fuerte absorción en la parte roja del espectro. Esta absorción de luz de baja frecuencia se da mayormente a través de los carbonilos, mientras que las melaninas con menos grupos carbonilo son más pálidas y aparecen más amarillas o rojas, como las feomelaninas, ya que contienen altos niveles de azufre en forma de benzotiazoles.

Asimismo, las melaninas, especialmente las eumelaninas, muestran marcadas propiedades redox; además, la deslocalización electrónica entre *orto*-quinona y los restos catecólicos del polímero dan lugar a radicales libres de semiquinona, que pueden detectarse mediante espectroscopía de resonancia electrónica.

Las melaninas también tienen propiedades quelatantes de los cationes a través de los grupos aniónicos, como el carboxilo y los grupos hidroxilo desprotonados (Riley, 1997).

Biosíntesis.

La melanogénesis o síntesis de la melanina natural comienza con la oxidación del aminoácido tirosina en DOPAquinona, regulada por la enzima tirosinasa, una glucoproteína unida a la membrana glicosilada tipo I que contiene cobre. La tirosinasa es sintetizada por organelos especializados conocidos como melanosomas, que se encuentran en el retículo endoplásmico rugoso. La enzima es glicosilada dentro del aparato de Golgi para ser transportada a los melanosomas a través de vesículas recubiertas.

Los melanosomas con melanina se transfieren a queratinocitos vecinos, en donde pasan por cuatro etapas de maduración dependiendo de la estructura, tipo y cantidad de melanina producida (Figura 2).

Los melanosomas de etapa I son vacuolas esféricas carentes de actividad de la enzima tirosinasa y componentes estructurales internos; en la etapa II se elongan, contienen organelos fibrilares con tirosinasa y poca melanina, debido a que después de esta etapa comienza la síntesis de melanina; en la etapa III, el pigmento se deposita de forma uniforme en las fibras internas; y los melanosomas maduros o de etapa IV adquieren una forma elíptica y tienen una actividad de la tirosinasa mínima, además de que son altamente pigmentados debido a que son transferidos a las dendritas de los melanocitos a queratinocitos (Xiao-Peng, 2012).

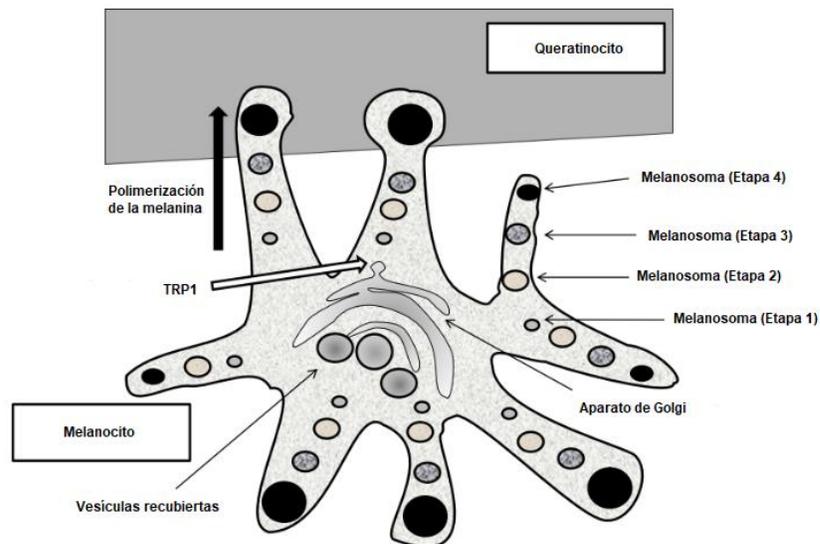


Figura 2. Formación celular de la melanina. Tomada y modificada de Xiao-Peng (2012).

La tirosinasa se encarga de catalizar dos reacciones de oxidación (Figura 3); primero la oxidación del monofenol (L-tirosina) a *o*-difenol (L-3,4-dihidroxifenilalanina o L-DOPA), y luego la L-DOPA se oxida a *o*-quinona (DOPAquinona). Posteriormente, sigue dos caminos diferentes dependiendo del tipo de melanina que se sintetizará.

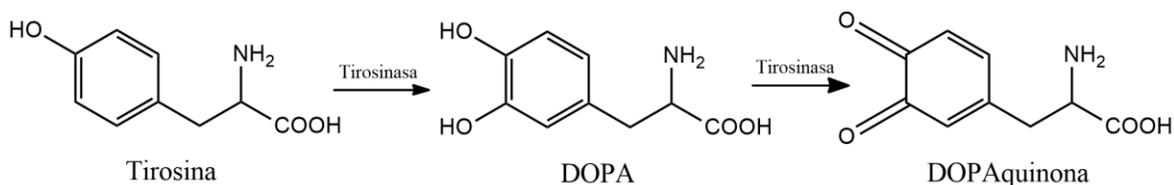


Figura 3. Síntesis bioquímica de la melanina. Tomada y modificada de Riesz (2007).

I. Eumelanina.

Las melaninas derivadas de la levodopa (L-3,4-dihidroxifenilalanina o L-DOPA) son llamadas eumelaninas (Figura 4) y característicamente son negras o café.

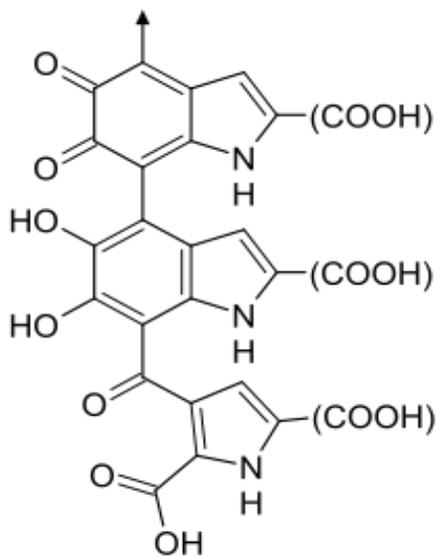


Figura 4. Estructura química del polímero de la eumelanina.

El proceso denominado eumelanogénesis (Figura 5) implica la proteína 1 relacionada con la tirosinasa (TRP-1) para metabolizar el DOPAcromo a través de su descarboxilación, reducción y polimerización hasta convertirla en 5,6-dihidroxiindol (DHI), mientras que el DOPAcromo tautomerasa (también conocido como TRP-2) convierte el DOPAcromo en ácido

5,6-dihidroxiindol-2-carboxílico (DHICA). Ambos dihidroxiindoles se oxidan de nuevo para producir los polímeros de eumelanina (Tsukamoto y cols., 1992).

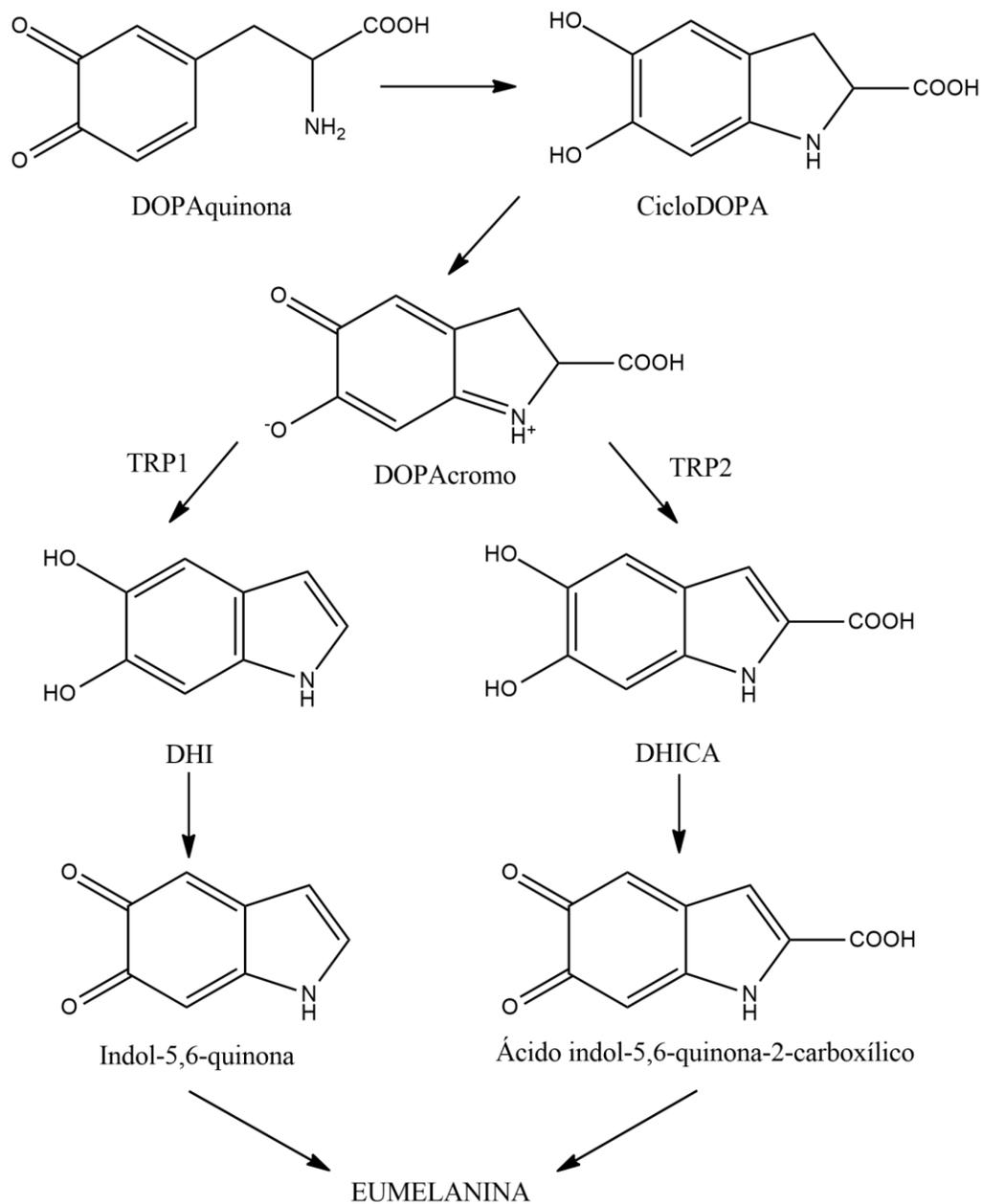


Figura 5. Síntesis de la eumelanina. Tomada y modificada de Riesz (2007).

II. Feomelanina.

Las melaninas amarillas a rojizas son llamadas feomelaninas (Figura 6), las cuales consisten en derivados de benzotiazina que contienen azufre.

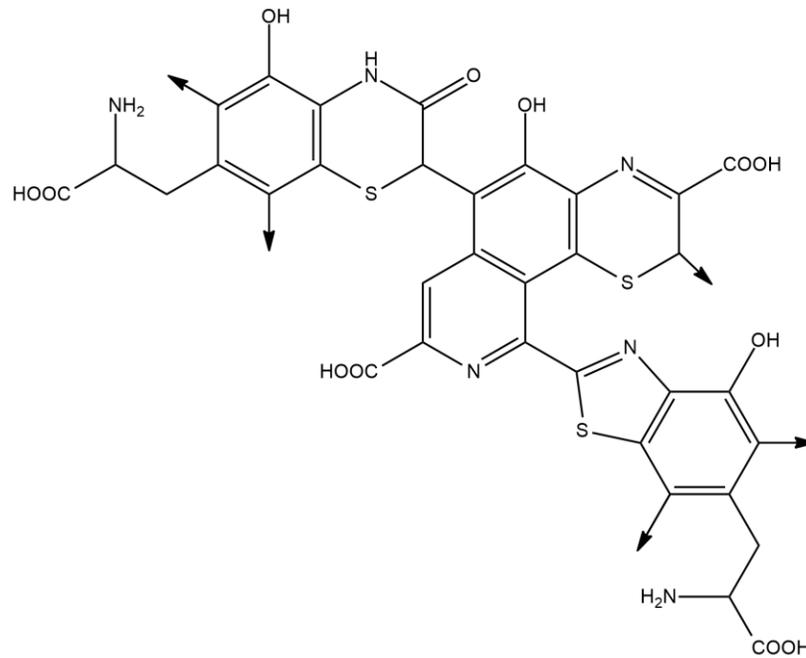


Figura 6. Estructura química del polímero de la feomelanina.

La feomelanogénesis (Figura 7) se refiere al proceso mediante el cual la DOPA quinona se conjuga con cisteínas que contienen tioles o glutationes, para producir rápidamente 5-Cisteinil-S-DOPA (5-CysDopa) y 2-Cisteinil-S-DOPA (2-CysDopa) en una relación de 5:1 (Ito y Prota, 1977). La oxidación de cisteinildopas a través de intermediarios de benzotiazina y benzotiazol da lugar a polímeros de feomelanina (Ito y cols., 2011)

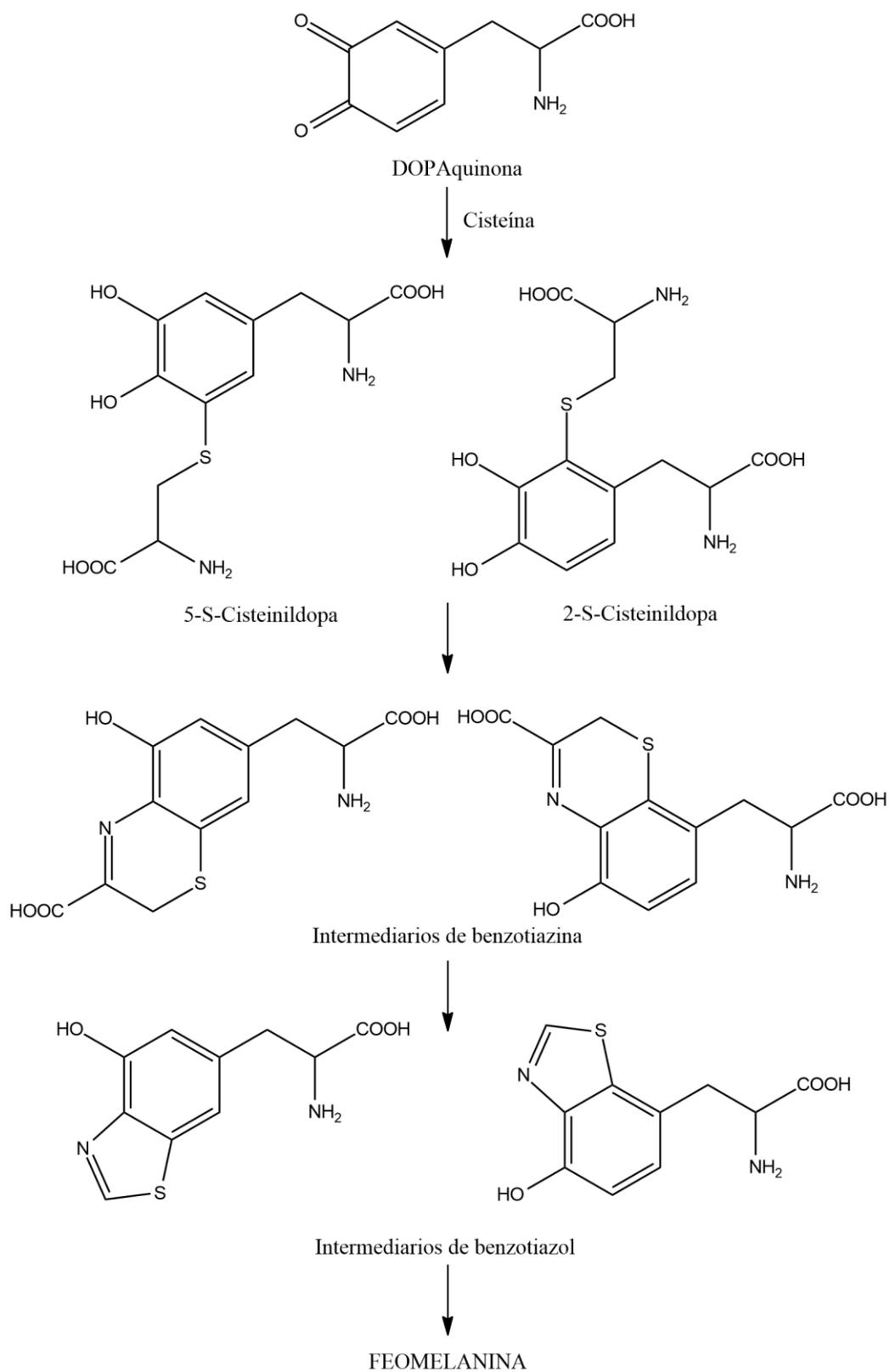


Figura 7. Biosíntesis de la feomelanina. Tomada y modificada de Riesz (2007).

Pigmentación humana.

La diversidad en el color de la piel, el cabello y los ojos está determinada principalmente por la producción de melanina: eumelanina (café a negro) y feomelanina (amarillo a café rojizo) (Ito y Wakamatsu, 2003).

Las melaninas naturales se encuentran localizadas en la capa basal de la epidermis, donde los melanocitos, que son las células precursoras, se encargan de sintetizarlas y transferir el pigmento producido vía dendrítica.

La pigmentación de los folículos capilares sigue secuencias de eventos idénticos a los observados en la epidermis. En los folículos pilosos (Figura 8 **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), los melanocitos se presentan característicamente en la pared del canal pilario (infundíbulo) y en la parte pigmentada del bulbo, cerca de la parte superior de la papila dérmica (Ortonne y Prota, 1993).

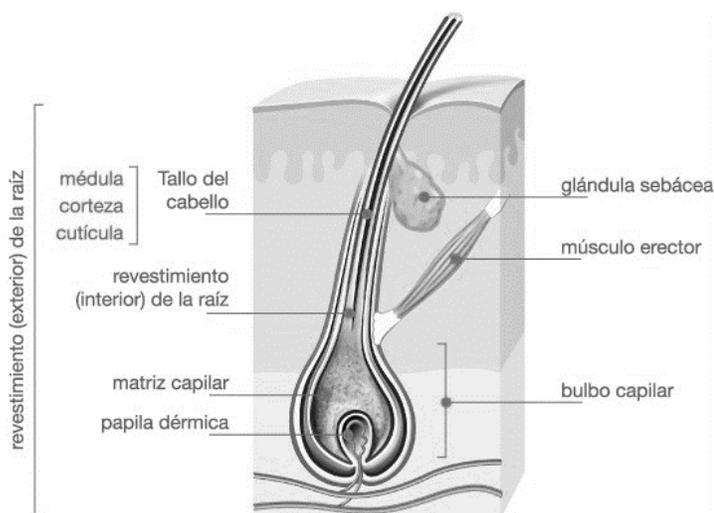


Figura 8. Esquema de un folículo piloso. Tomado y modificado de Nezirević (2009).

Color del cabello.

El cabello es un tejido complejo y un anexo de la piel, originado en el folículo piloso con un centro de germinación formado por células que se encuentran en

proliferación activa. En el tallo del cabello se localizan células queratinizadas con diferentes capas, incluidas la cutícula, la corteza y la médula (Figura 9; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Está compuesto de proteínas (65–95%, principalmente queratina), agua (15–35%), lípidos (1–9%) y minerales (hasta 1%) (Wennig, 2000).

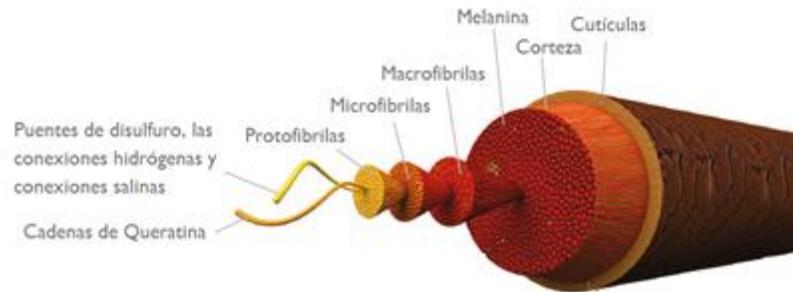


Figura 9. Estructura del cabello. Tomada de Chemyunion (2016).

En el cabello, la melanina se encuentra depositada en forma de gránulos en la médula, en el núcleo poroso de la fibra capilar y en la corteza que lo rodea; obteniendo su color por el contenido del pigmento en el tallo del cabello (Figura 10; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) (D'Ischia y cols., 2013).

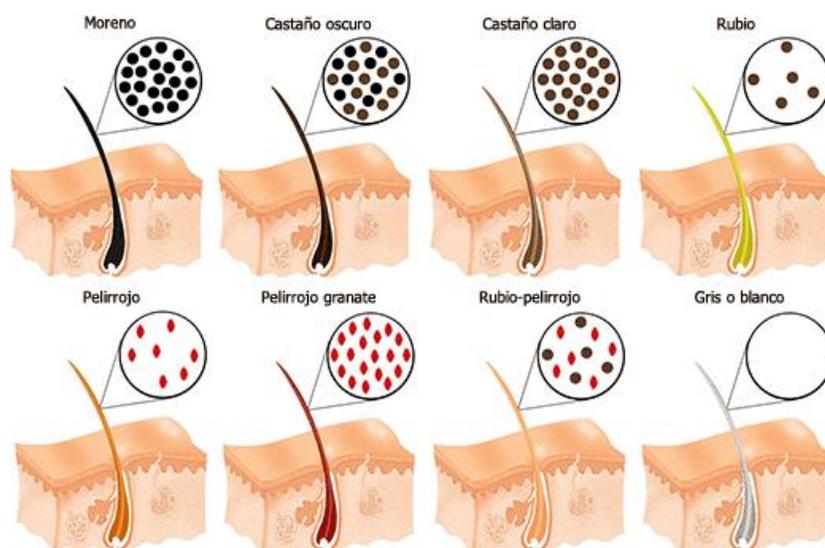


Figura 10. Representación de la relación de los pigmentos de melanina según el tipo de cabello, considerando que los puntos rojos representan la feomelanina, y los negros y cafés a la eumelanina.

Fenotipos de pigmentación.

Los rasgos de pigmentación humana, incluida la variación de color en la piel, los ojos y el cabello, pertenecen a los rasgos humanos más visibles y diferenciadores (Liu y cols., 2013).

La variación fenotípica en los rasgos de pigmentación entre individuos es causada por diferencias bioquímicas que afectan la cantidad de melanosomas producidos, el tipo de melanina sintetizada (ya sea la eumelanina de color negro-café o la feomelanina de color rojo-amarillo) y el tamaño y la forma de los melanocitos (Sulem y cols., 2007).

Variación fenotípica del color del cabello.

La pigmentación del cabello es un rasgo con alta variedad fenotípica al estar relacionada con la selección natural durante la evolución de los humanos, presentando una alta diferenciación entre las poblaciones, debido a que la coloración se encuentra influenciada por la exposición a la radiación ultravioleta (UV) y la herencia genética.

La mayor parte de la variación en la coloración del cabello se limita a los europeos (Figura 11), alcanzando su rango fenotípico máximo en un área centrada en el Báltico Oriental que se extiende sobre el norte y el este de Europa, presentando tonalidades que varían desde el negro más oscuro hasta el color más claro de rubio o blanco, con numerosas variaciones generalmente resumidas en categorías de color: negro, café, rubio y rojo, mientras que subcategorías como “moreno”, “café claro”, “castaño” y “rojo fresa” también son reconocidas. Fuera de Europa, el color del cabello es negro con algunas excepciones notables, como las poblaciones del oriente (Söchtig y cols., 2015).

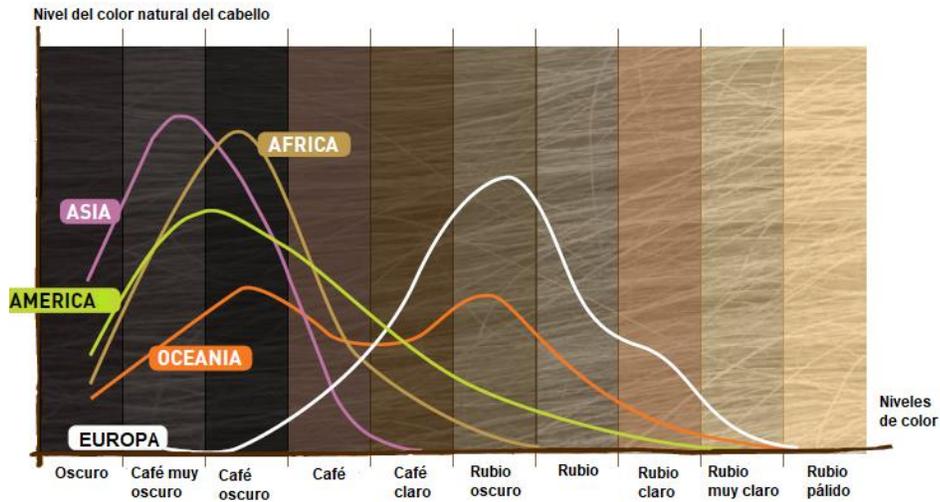


Figura 11. Variación del color del cabello en las diferentes poblaciones. Tomado y modificado de Panhard y cols. (2012).

Esta diversidad se debe a la influencia de los factores genéticos, quienes se encargan del 92% de esta variación, mientras que el resto se debe a la influencia ambiental (Mengel-From y cols., 2009).

Estos factores se han investigado ampliamente en estudios de vinculación en familias, y de asociación del genoma en poblaciones, identificando una alta heredabilidad, así como gran cantidad de genes que se encuentran asociados con la pigmentación del cabello. Las proteínas que codifican estos genes contribuyen al control de la producción de melanina y la maduración de los melanosomas en la melanogénesis, lo que determina la pigmentación humana.

Estudios de predicción fenotípica.

Los rasgos de pigmentación han sido objeto de estudios científicos durante varios años. Estudios de asociación en todo el genoma han identificado numerosas variantes genéticas que contribuyen a la pigmentación, las cuales se han usado para la creación de kits y softwares comerciales que permiten hacer la predicción fenotípica de manera rápida y orientativa de estos rasgos a partir de marcadores de ADN (Katsara y Nothnagel, 2019).

El *IrisPlex* es un kit que permite hacer la predicción del color de los ojos, su extensión *HirisPlex* se utiliza para pronosticar el color de los ojos y el cabello, mientras que el *HirisPlex-S*, para predecir los tres rasgos de pigmentación, el color de los ojos, el cabello y la piel; los cuales se basan en modelos de regresión logística multinomial, que muestran las probabilidades para cada categoría de color (rubio, café, rojo y negro) y para cada rasgo.

Algunos modelos alternativos desarrollados por Söchtig y cols. (2015) y Maroñas y cols. (2014), predicen el color del cabello y la piel, respectivamente, mediante una clasificación bayesiana ingenua iterativa para la diferenciación fenotípica por pares (Kayser y cols., 2018).

Por otra parte, *PARABON*® con algoritmos de aprendizaje especializados, desarrolló un sistema instantáneo de fenotipado forense (Figura 12), que mediante la lectura de variantes genéticas de una muestra, es capaz de predecir con una alta precisión rasgos como la ascendencia, el color de los ojos, cabello y piel, las manchas y la forma de la cara en individuos de diferentes razas, llegando a identificar la apariencia de una persona desconocida (Parabon NanoLabs, 2019).

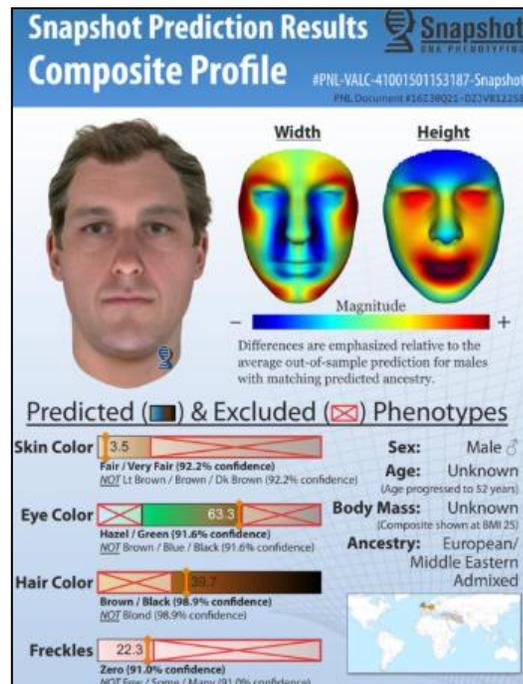


Figura 12. Ejemplo de un perfil genético generado a partir de muestras de ADN. Tomado de Parabon® (2019).

Sin embargo, dado que los rasgos fenotípicos son multifactoriales, es decir, que están determinados por una interacción compleja entre muchos marcadores genéticos y el ambiente, las predicciones realizadas por este tipo de programas son aproximaciones de la realidad, por lo que no se toman como definitivos, pues se encuentran basados en probabilidades (Samuel y Prainsack, 2018); por esto, las predicciones se presentan con una medida correspondiente de confianza, que refleja el grado en que dichos factores influyen en cada rasgo en particular.

Sin embargo, rasgos como el color de los ojos y el cabello, que son altamente hereditarios (es decir, no se ven muy afectados por factores ambientales), se predicen con mayor precisión y confianza; estas diferencias se muestran con métricas de confianza junto a cada predicción hecha por el programa.

Por otro lado, se ha descubierto que mediante diferentes métodos químicos es posible cuantificar los pigmentos que dan el color al cabello, piel y ojos, estudiando el fundamento químico de la diversidad del color al cuantificar las melaninas. Estos métodos permiten estimar la cantidad de cada melanina (fenotipo químico) en las diferentes tonalidades que presenta el cabello (fenotipo visual) (Shosuke y Wakamatsu, 2011).

Identificación de las melaninas por métodos químicos.

A lo largo de los años se han utilizado una gran cantidad de técnicas y métodos para estudiar de manera cualitativa y cuantitativa el pigmento de la melanina.

A través de los métodos cuantitativos es posible conocer los analitos de interés, medir sus propiedades físicas y químicas en relación con su concentración, y usarse para su cuantificación. Por otra parte, con los métodos cualitativos, es posible identificar compuestos desconocidos mediante la interpretación de datos espectrales obtenidos por técnicas avanzadas como la espectrometría de masas (Nezirević, 2009).

El principal uso de la melanina con fines forenses es la identificación de fármacos o sustancias de abuso en el cabello, debido al papel que juegan estas sustancias en la incorporación a esta matriz (Borges y cols., 2001).

Por otra parte, se ha descubierto que la medición de la proporción de las melaninas en muestras de tejido como el cabello humano de color negro, café, rubio y rojo (fenotipo "visual"), puede proporcionar información sobre el fenotipo "químico" de la muestra, por lo que se han desarrollado una gran cantidad de métodos para la estimación de la proporción de melaninas naturales (Borovanský, 1978).

Sin embargo, el estudio de las melaninas naturales presenta diferentes problemas al momento de estudiarlas, ya que no hay métodos adecuados que permitan aislar las melaninas del material biológico, su insolubilidad en un amplio rango de pH además de que muchos métodos de aislamiento afectan la estructura química del pigmento a estudiar. Además, de que al realizar estudios en matrices como el cabello, uno de los problemas más críticos es la interpretación de los resultados analíticos, debido a los efectos de la matriz proteica (Nezirević, 2009; Wennig, 2000).

Es por esto, que hasta el momento no hay métodos que permitan establecer una identificación confiable de las unidades monoméricas o del polímero total de la melanina, debido a que la estructura exacta de las melaninas no es completamente conocida por la incapacidad que existe de estudiarlas por cristalografía, ya que únicamente se tienen aproximaciones de los monómeros de ésta (Urán y Cano, 2008).

Los métodos utilizados para la cuantificación de melaninas en tejidos pigmentados requieren el aislamiento de melaninas. La mayoría de los estudios emplean métodos que degradan la matriz de queratina mediante tratamientos químicos agresivos como bases fuertes. Se sabe que los métodos que utilizan ácidos causan interferencias en el aislamiento de los pigmentos naturales de melanina, y los métodos alcalinos causan la degradación del pigmento melanina y la proteína asociada (Liu y cols., 2003).

En todos los casos, el desarrollo del método implica el uso de marcadores producto de la degradación e intermediarios de la melanina, de los cuales solo dos, el ácido pirrol-2,3,5-tricarboxílico (PTCA) y 3-amino-4-hidroxifenilalanina (3-AHP) están disponibles comercialmente, siendo necesario preparar la mayoría de ellos mediante procesos químicos simples

Existen numerosos informes sobre la determinación cuantitativa de melanina empleando técnicas como la espectrofotometría de fluorescencia, espectrometría de resonancia de espín electrónico (ESR) o de resonancia electrónica paramagnética (EPR) y la espectrofotometría de absorción, siendo la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) y la espectrofotometría ultravioleta los más usados (Watanabe y cols., 1997).

Cromatografía líquida de alta resolución.

a. Fundamento teórico.

La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) es un método físico de separación en columna (fase estacionaria) en el que por presión se hace pasar una mezcla de analitos en un sistema disolvente (fase móvil). La columna empleada es capaz de soportar altas presiones y es resistente a la degradación química de las fases móviles aplicadas. El tiempo que le toma a los componentes de la muestra recorrer la columna, va a variar dependiendo de las interacciones químicas o físicas que tengan con la fase estacionaria, la naturaleza del compuesto, la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil. Por lo que, entre más pequeña es el tamaño de las partículas de la columna, aumenta la relación de la fase estacionaria/fase móvil, lo que aumenta el tiempo empleado por la muestra inyectada en la fase estacionaria, mejorando la separación de los componentes del analito y obteniendo una mejor visualización de los picos en el cromatograma.

La cromatografía de líquidos se divide en subclases según la polaridad de las fases estacionarias y móviles, como la cromatografía de reparto, la cromatografía

de fase normal, la cromatografía de fase inversa, la cromatografía de exclusión por tamaño y la cromatografía de intercambio iónico.

Una vez que se inyecta la muestra en el equipo, la muestra pasa por la columna, en donde los analitos son separados y percibidos por un detector en línea, mostrando el resultado en forma de señales eléctricas, el cual se visualiza en un cromatograma. El tipo de detector utilizado depende de las características del soluto, la sensibilidad, la selectividad requeridas, y la conveniencia y versatilidad deseadas en el análisis a desarrollar; como el detector ultravioleta (UV), detector electroquímico (EQ), detector de matriz de fotodiodos (FDA) y detector de espectrometría de masas (MS), entre otros (Nezirević, 2009).

b. Identificación y cuantificación de las melaninas.

La degradación y los productos intermediarios de las melaninas se han determinado mediante CLAR; permitiendo determinar la composición del subtipo de melanina (eumelanina o feomelanina) en una variedad de muestras de cabello humano (Ito y Wakamatsu, 2003).

Los diferentes métodos desarrollados permiten caracterizar subtipos específicos de melanina (DHI y DHICA para la eumelanina, y 5-CysDopa y 2-CysDopa para la feomelanina), a partir de marcadores químicos derivados de diferentes productos de degradación.

Mediante la degradación química con peróxido de hidrógeno se pueden producir el PDCA (ácido tiazol-4,5-dicarboxílico) y el PTCA (ácido pirrol-2,3,5-tricarboxílico) como marcadores químicos de la eumelanina, y el TTCA (ácido tiazol-2,4,5-tricarboxílico), TDCA (ácido tiazol-4,5-dicarboxílico) y HBTA [6-(2-amino-2-carboxietil)-4-hidroxi-1,3-benzotiazol] para la feomelanina (Borges y cols., 2001), así como 4-AHP (4-amino-3-hidroxifenilalanina) y 3AT (3-aminotirosina) después de la hidrólisis con ácido yodhídrico (Ito y Wakamatsu, 2011).

Los productos de degradación que se determinan se cuantifican por medio de un detector UV en el caso de la eumelanina, y un detector electroquímico en el

caso de la feomelanina, pudiéndolos calcular teóricamente al multiplicar el valor de los productos de degradación por factores de conversión, los cuales se basan en el rendimiento de la melanina de referencia empleada. Estos rendimientos se calculan con base en una relación masa/masa de la cantidad de producto de degradación detectada sobre la cantidad de melanina degradada.

Esta técnica ofrece límites de cuantificación de 10 µg para DHI, 1 µg para DHICA, 240 ng para 2-CysDopa y 170 ng para 5-CysDopa; mientras que los límites de detección son 10 µg, 0.5 µg, 120 ng y 85 ng, respectivamente.

Con la información de rendimiento de producto de degradación, se ha determinado que el cabello humano negro promedio contiene aproximadamente 99% de eumelanina (60% de DHI y 40% de DHICA) y 1% de feomelanina (80% de 2-CysDopa y 20% de 5-CysDopa); el cabello castaño y rubio contienen 95% de eumelanina y 5% de feomelanina; y el cabello rojo contiene 67% de eumelanina y 33% de feomelanina. Estos resultados demuestran que los folículos del cabello humano, independientemente del color, contienen ambas melaninas (Borges y cols., 2001).

Espectrofotometría ultravioleta.

a. Fundamento teórico.

La radiación ultravioleta (UV) y visible comprende solo una pequeña parte del espectro electromagnético, que incluye otras formas de radiación. La radiación electromagnética se considera como una combinación de campos eléctricos y magnéticos alternos que viajan a través del espacio con un movimiento de onda. Cuando la radiación interactúa con la materia, pueden ocurrir varios procesos, como la absorción, para el caso de la medición del espectro UV-visible, debido a que las moléculas absorben energía luminosa, haciendo que éstas pasen de un estado basal a uno excitado.

Cuando la luz pasa a través de una muestra o se refleja en ella, la cantidad de luz absorbida es la diferencia entre la radiación incidente y la radiación transmitida. Mediante la espectrometría, es posible medir la cantidad de energía radiante absorbida por las moléculas de una muestra, en función de longitudes de onda específicas, debido a que la energía se aprovecha para que mediante métodos ópticos, electrónicos y matemáticos se puedan generar espectros.

Los espectros son representaciones gráficas de la extensión de la absorción o transmisión de la luz, en función de una longitud de onda específica. Esta relación, es susceptible de expresarse teóricamente mediante los principios de la Ley de Lambert-Beer:

$$A = \alpha * b * c$$

Donde:

A = Absorbancia

α = Coeficiente de extinción

b = Paso óptico (longitud de la celda que contiene la muestra) (cm)

c = Concentración (mg/mL)

El coeficiente de extinción (α) es característico de una sustancia dada en un conjunto de condiciones definidas con precisión, como la longitud de onda, el disolvente y la temperatura.

En la práctica, los valores predeterminados para el coeficiente de extinción generalmente no se utilizan para el análisis cuantitativo, debido a que se construye una curva de calibración para la sustancia a analizar utilizando una o más soluciones estándar con concentraciones conocidas del analito.

Para registrar los espectros se emplea un espectrofotómetro, el cual es un instrumento que permite medir la transmitancia o absorbancia de una muestra en función de la longitud de onda de la radiación electromagnética. Sus componentes (Figura 13) son una fuente que genera una banda ancha de radiación electromagnética, un dispositivo de dispersión que selecciona la banda ancha de la fuente una longitud de onda particular, un área de muestra, y uno o más detectores para medir la intensidad de la radiación (en un rango de longitud de onda de 180-820 nm) (Owen, 1996; Skoog y cols., 2015; Harris, 2006).

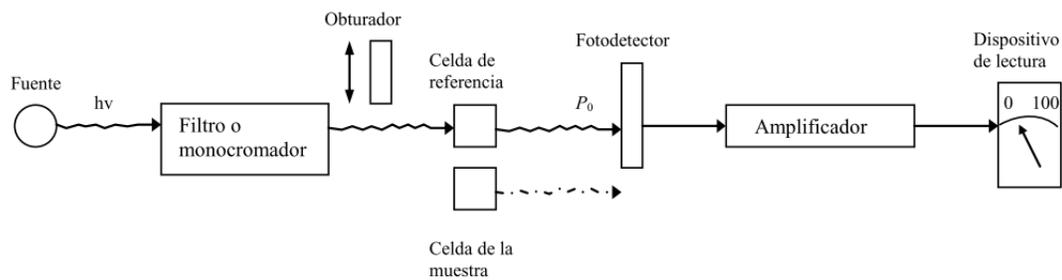


Figura 13. Diagrama de los componentes de un espectrofotómetro con un detector. Tomado de Skoog y West (1976).

b. Consideraciones técnicas.

Los tejidos queratinosos, como la piel y el cabello, contienen muchos cromóforos que dan señales en las regiones de radiación visible y ultravioleta (McMullen y cols., 2012).

La melanina presente en el cabello no se encuentra aislada, por lo que después de realizar una extracción, se tendrá una mezcla de sus componentes. Esta mezcla contiene proteínas como la queratina, el colágeno, la elastina y la fibrina, las cuales tienen un contenido elevado de aminoácidos aromáticos que absorben en longitudes de onda cercanas a los 280 nm (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

Tabla 1. Características espectrales de cromóforos encontrados en las proteínas.

Cromóforo	λ máx.
Triptófano	280 nm
Tirosina	275 nm
Fenilalanina	257 nm
Cistina	250 nm
Kinurenina	378 nm
Queratina	313 nm
Colágeno	340 nm
Elastina	380 nm
Fibrina	303 nm

Los espectros de absorción de las proteínas resultan en gran medida de la presencia de los aminoácidos aromáticos triptófano, tirosina y fenilalanina (Tang y cols., 2000). Además, se encuentra la kinurenina debido a que es un producto de degradación del triptófano (McMullen y cols., 2012); mientras que los grupos cistina son comunes en varias proteínas naturales tales como las queratina.

c. Identificación y cuantificación de las melaninas.

Método de Ozeki y cols., 1996

Debido a que la melanina es un material ópticamente denso que absorbe la radiación en longitudes de onda visibles y ultravioleta, se utiliza esta propiedad para su detección y cuantificación, tomando en cuenta que con el método espectrofotométrico no se mide la concentración sino la intensidad de la absorción del pigmento.

Sin embargo, es indispensable recordar que, en lugar de ser un solo pigmento, la melanina está compuesta de varios cromóforos con diferentes propiedades ópticas y físicas (Alaluf y cols., 2001); por lo que esta técnica no

permite cuantificar de forma independiente cada melanina presente en la matriz y en su lugar permite conocer las proporciones.

Tomando como base que la mayoría de los componentes del cabello absorben por debajo de 400 nm, Ozeki y cols. desarrollaron un método por espectrofotometría ultravioleta para cuantificar las melaninas presentes en muestras de cabello. El método consiste en leer la absorbancia de ambas melaninas en un rango de 400 a 800 nm, al colocarlas en Solueno® caliente en presencia de 10% de agua.

Partiendo de que la absorbancia a 500 nm (A_{500}) se puede utilizar para cuantificar la cantidad total de eumelanina y feomelanina combinadas, mientras que la relación (A_{650}/A_{500}) se utiliza como parámetro para estimar la relación de eumelanina/melanina total (Ozeki y cols., 1995).

Por esto, el color del cabello se puede diferenciar con base en el valor del cociente A_{650}/A_{500} , debido a que para cada color, la proporción cae en un rango específico: 0.12-0.14 para el rojo, 0.15-0.21 para el rubio, 0.19-0.26 para el café claro y 0.30-0.32 para el café al negro (Ozeki y cols., 1996).

Ley de Aditividades.

Los análisis de multicomponentes que utilizan espectros UV-visibles se han realizado durante tanto tiempo como los análisis de un solo componente. Estos métodos cuantitativos se basan en el principio de que la absorbancia en cualquier longitud de onda de una mezcla es igual a la suma de la absorbancia de cada componente en la mezcla en esa longitud de onda (Owen, 1996).

Como la melanina está compuesta de varios cromóforos con diferentes propiedades ópticas y físicas, es posible cuantificar la eumelanina y feomelanina del cabello por separado.

De acuerdo con la Ley de Lambert-Beer, la absorbancia es proporcional al número de moléculas que absorben la radiación en la longitud de onda especificada,

por lo que, este principio también se puede aplicar a un medio que contenga más de una clase de sustancias absorbentes (mezcla), siempre que no haya interacción entre las distintas especies, es decir, que no reaccionen entre sí (Skoog y cols., 2018).

La absorbancia de la mezcla en cada longitud de onda es la suma de la absorbancia de cada componente en esa longitud de onda, que a su vez depende del coeficiente de extinción y la concentración de cada componente. Así, la ecuación sería:

$$A_{Total} = A_1 + A_2 + \dots + A_n = \alpha_1 bc_1 + \alpha_2 bc_2 + \dots + \alpha_n bc_n$$

Donde los subíndices (1, 2, ..., n) se refieren a los distintos componentes absorbentes.

Las longitudes de onda elegidas generalmente son las de la absorbancia máxima de cada componente.

En estos métodos, para realizar la calibración, se mide la absorbancia de estándares de concentraciones conocidas de componentes puros para determinar el coeficiente de extinción para cada componente en cada longitud de onda seleccionada (Owen, 1996).

Si las mediciones fueran exactas, se podrían obtener resultados precisos incluso para mezclas complejas de componentes con espectros muy similares; sin embargo, siempre ocurren errores de medición, los cuales suelen afectar significativamente la precisión de los resultados cuando los espectros se superponen.

Método de adición de estándar.

La adición de un patrón externo es un método de análisis cuantitativo empleado cuando la muestra de interés tiene varios componentes que presentan efectos sobre la matriz, es decir, se utiliza para analizar muestras en las cuales la posibilidad de que aparezcan efectos de matriz es importante, por lo que se añaden componentes adicionales (patrón o estándar externo) que pueden reducir o aumentar la señal de la absorbancia del analito.

Este método ayuda a eliminar los efectos de la matriz de la medición al asumir que se afecta por igual a todas las soluciones.

Consiste en la adición de uno o más incrementos de una disolución patrón a las alícuotas de la muestra con volúmenes idénticos (adición de muestras); luego, cada disolución es diluida a un volumen fijo antes de tomar la medida.

La matriz es constante después de cada adición, cambiando la concentración del analito o reactivo; mientras que los demás constituyentes de la muestra son idénticos, ya que los patrones se preparan en alícuotas de la muestra (Figura 14) (Skoog y cols., 2018).

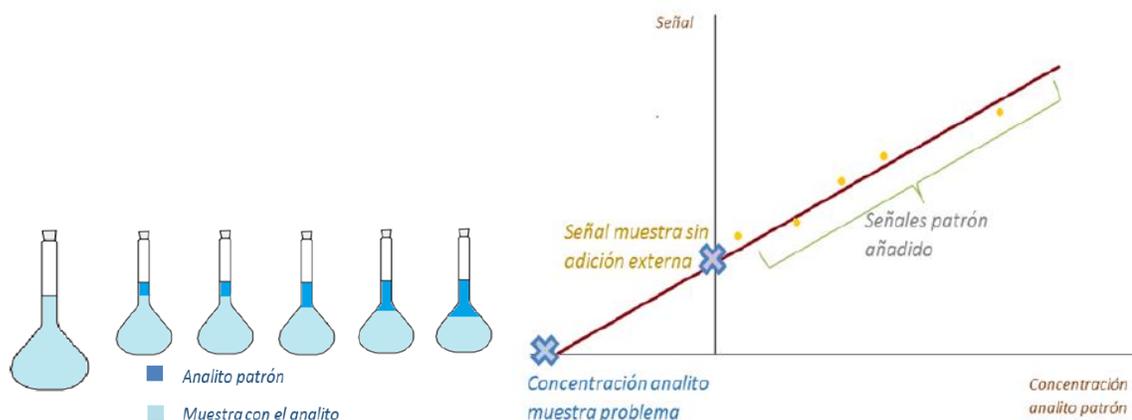


Figura 14. Ejemplo de una gráfica de adición patrón. Tomada de Espejo (2016).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La identificación visual es la forma más empleada para obtener información sobre los rasgos físicos de una persona con el fin de individualizarla, sin embargo, esto da lugar a sesgos debido a la subjetividad con la cual se asignan o determinan las características de dichos rasgos, como el color del cabello.

En este contexto, se han desarrollado kits comerciales que permiten hacer la predicción del color de cabello, clasificándolo en cuatro categorías de tipo cualitativo: negro, café, rojo y rubio; sin embargo, el espectro de color del cabello es mucho más amplio de lo que se puede describir en esas categorías.

Por lo que, para incrementar la confiabilidad con la cual se estima el color del cabello, y evitar interpretaciones ambiguas en la predicción fenotípica durante la investigación forense, esta se debe orientar hacia el pronóstico cuantitativo del color del cabello mediante el empleo de métodos objetivos. Actualmente, los estudios basados en valores cuantitativos del color aún son escasos por la dificultad que existe en la determinación.

Por lo que, con el objetivo de contribuir desde el área química a la determinación cuantitativa del color del cabello, el presente trabajo propone el desarrollo de un método de medición espectrofotométrica de la proporción de las melaninas para su determinación cuantitativa en muestras de cabello de población mexicana.

OBJETIVOS

Objetivo general.

Desarrollar un método de análisis químico que permita obtener la proporción de las melaninas presentes en muestras de cabello.

Objetivos particulares.

- Sintetizar mediante una reacción enzimática con tirosinasa: Eumelanina y Feomelanina.
- Implementar y optimizar el método de Ozeki y cols., (1996) para cuantificación de melaninas en cabello, analizando variables como el tiempo y la temperatura.
- Desarrollar dos métodos de cuantificación de melaninas empleando como estrategias la Ley de Aditividad y el método de adición estándar.
- Analizar los alcances y límites de las metodologías desarrolladas.

JUSTIFICACIÓN

En la investigación forense, los resultados del análisis del fenotipado de ADN pueden utilizarse como testigos biológicos y proporcionar información más precisa que los testigos oculares (Kayser, 2015).

Los pigmentos que le dan color al cabello se denominan melaninas, los cuales son sintetizados en los melanocitos foliculares y se transfieren a los queratinocitos, donde se diferencian en eumelaninas (color negro a café) y feomelaninas (color amarillo a rojizas); por lo que, la coloración del cabello estará determinada por la cantidad y proporción de estos pigmentos.

Se han desarrollado distintos métodos de análisis químico con la finalidad de medir la coloración del cabello de manera objetiva y cuantitativa. Un ejemplo de estos métodos analíticos es la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), que permite cuantificar la cantidad de eumelanina y feomelanina, con fundamento en la formación de productos de degradación específicos; otro método reportado es la espectrofotometría ultravioleta (UV), que permite evaluar la melanina folicular en el cabello a través de proporciones entre ambas melaninas (Ozeki y cols., 1996), obteniendo una alta correlación entre la proporción del fenotipo “químico” y el fenotipo “visual” expresado del ADN (Ito y Wakamatsu, 2011).

Los métodos químicos de cuantificación de eumelanina y feomelanina en el cabello humano no están completamente estandarizados debido a que no existen estándares analíticos comerciales para cada una de las melaninas naturales, por lo que, al no contar con estos, se emplean dos métodos: 1) síntesis de los estándares mediante reacciones enzimáticas; y 2) cuantificación de las melaninas a través de la cantidad de sus productos de degradación.

Con el presente trabajo se buscará obtener resultados cuantitativos del contenido de las melaninas del cabello, para relacionarlo con el color de este. Esta cuantificación resultará en la asignación de un color más objetivo, misma que pueda servir al grupo de genética de la Licenciatura en Ciencia Forense, para relacionarlo

con los marcadores genéticos involucrados en la síntesis de melaninas que pudiesen contribuir a la predicción de forma más precisa el color del cabello.

MATERIALES

Reactivos y soluciones

- Buffer de fosfato de sodio 10 mM pH 6.7
- Agua desionizada Milli-Q® Reference.
- Solueno® 350, Perkin Elmer.
- Ácido acético glacial 100%, Merck.
- Hidróxido de sodio 0.5 M (NaOH), Sigma.
- Tirosinasa de hongos, Sigma Aldrich.
- L-DOPA, Sigma Aldrich.
- L-Cisteína, Sigma Aldrich.

Instrumentos y equipo

- Espectrofotómetro UV-visible, Thermo Scientific™ Evolution 220.
- Microcelda de cuarzo 700 µL, paso óptico 10 mm.
- Espectrómetro FT-IR, Nicolet™ iS5 – ID5 ATR Diamond.
- Sonicador Branson Ultrasonics™ serie CPXH-952-138R.
- Centrifuga Thermo Scientific Sorvall ST8.
- Microcentrifuga Fisher Scientific accuSpin Micro 17R.
- Eppendorf ThermoMixer® C sin bloque térmico, 220 – 240 V/50 – 60 Hz.
- Balanza analítica Citizen® CX 320, máx.: 120 g, d: 0.1 mg.
- Parrilla de calentamiento y agitación, modelo IKA-3581201.
- Microscopio estereoscópico Zeiss®, modelo Stemi DV4.
- Homogeneizador de tejidos TenBrock Glass PYREX® 7 mL.
- Micropipetas Gilson PIPETMAN Classic™ de 2-20, 20-200 y 100-1000 µL.
- Medidor de pH 2700, Oakton®.
- Vórtex-mixer SCILOGEX MX-S Variable Speed.
- Refrigerador y congelador marca Mabe.

Muestras biológicas.

Se recolectaron muestras de cabello de 9 voluntarios que cumplieran con los criterios de selección necesarios para el presente trabajo; ser mexicanos, con su color de cabello natural y libre de tratamientos químicos y tintes.

Con ayuda de unas pinzas se les tomó una muestra de cabello a los voluntarios, cortando de 5 a 7 cabellos a un centímetro de la raíz en el caso de tratarse de cabello largo, y arrancándolo de raíz a quienes tuvieran el cabello corto.

Todas las muestras fueron colocadas en sobres de papel manila para ser embaladas y etiquetadas.

METODOLOGÍA Y RESULTADOS

A partir de la revisión bibliográfica, se seleccionó el método espectrofotométrico propuesto por Ozeki y cols. (1996), para realizar la determinación de las melaninas; se hicieron una serie de modificaciones para lograr las condiciones óptimas para realizar la determinación.

Preparación de las sustancias de referencia.

Ozeki establece que las condiciones para llevar a cabo la preparación de la melanina sintética parten de mezclar en 1 mL de buffer de fosfato de sodio 10 mM pH 6.8, L-DOPA 1 mM y L-Cisteína 1.25 mM, los cuales se oxidan al adicionar 20 mg de tirosinasa de hongos (≥ 1000 unidades/mg de sólido). Incubar por 4 horas a 37°C y agregar 100 μ L de ácido acético 1 M para detener la oxidación y precipitar la melanina. Posteriormente, centrifugar a 10,000 rpm por 10 minutos, lavar con 1 mL de ácido acético y finalmente suspender en 500 μ L de agua por sonicación.

Sin embargo, de acuerdo con la síntesis bioquímica de la melanina (Figura 3), y de acuerdo a lo señalado por Ito (1989), se observó que al saturar el sistema con L-cisteína, es posible desplazar el equilibrio y sintetizar de forma aislada cada una de las melaninas. Por lo que se propuso y empleó la siguiente metodología de síntesis:

Para la eumelanina, como señala Ozeki (1996), se mezclaron 19.7 mg de L-DOPA (1 mM) en 100 mL de buffer de fosfatos 10 mM, pH 6.8 y se agregaron 20 mg de tirosinasa de hongos. Se incubó por 4 horas a 37°C.

Para preparar la feomelanina, como refiere Ito (1989), se mezclaron en 100 mL de buffer de fosfatos 10 mM pH 6.8, 19.7 mg de L-DOPA (1 mM), 18.1 mg de L-cisteína (1.5 mM) y 10 mg de tirosinasa de hongos (≥ 1000 unidades/mg de sólido), respetando siempre el orden de adición. La mezcla de reacción se incubó por 4 horas a 37°C, y se dejó por una semana en refrigeración (4°C) hasta observar

un cambio de coloración, ya que de acuerdo a lo señalado por Ito (1989) se trata de una reacción lenta y requiere de un mayor tiempo de reacción.

Después de la incubación, se obtiene una solución de color negro para el caso de la eumelanina y de color rojizo para el caso de la feomelanina (Figura 15).

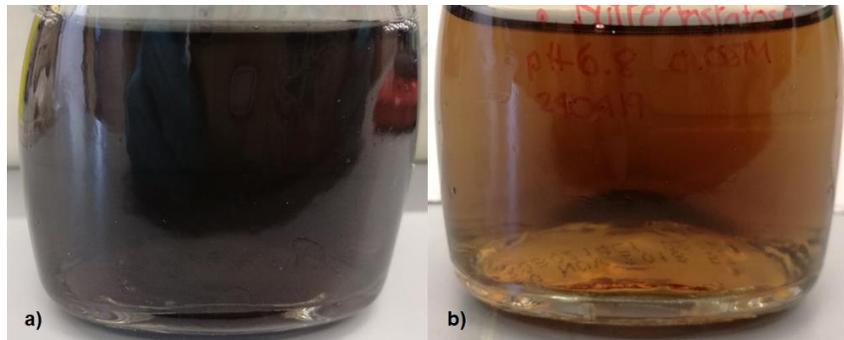


Figura 15. Soluciones preparadas de 1) eumelanina y 2) feomelanina después de la incubación.

Para detener la reacción y precipitar las melaninas se agregó ácido acético; para la eumelanina, se agregó 1 mL de ácido acético concentrado y la mezcla de reacción permaneció por 1 hora a temperatura ambiente; mientras que para la feomelanina, como señala Ito (1989), se agregó ácido acético concentrado hasta llegar a un pH = 3 y se dejó por el mismo lapso pero en refrigeración (4°C).

Para tomar el precipitado, la mezcla de reacción se centrifugó por 10 minutos a 4,500 rpm. Se lavó el precipitado con ácido acético y agua destilada. Finalmente, el precipitado se secó bajo flujo de nitrógeno como menciona Ito (1989) obteniendo un precipitado de color café oscuro para el caso de la eumelanina y de color rojizo para el caso de la feomelanina.

Las condiciones para sintetizar la eumelanina y feomelanina se muestran en las Figura 16 y Figura 17, respectivamente.

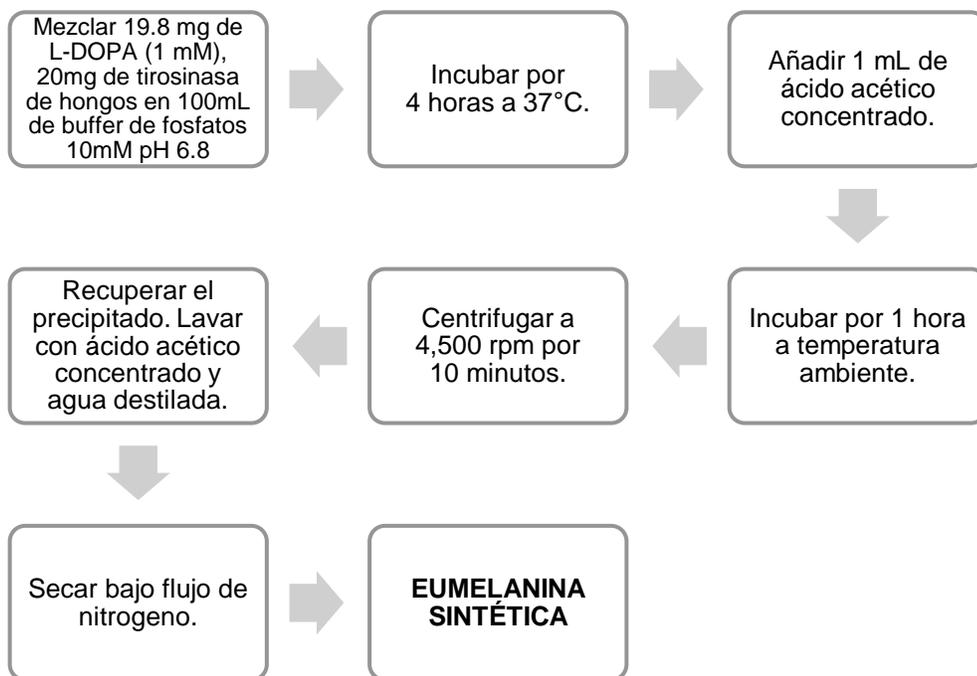


Figura 16. Diagrama de la síntesis de la eumelanina.

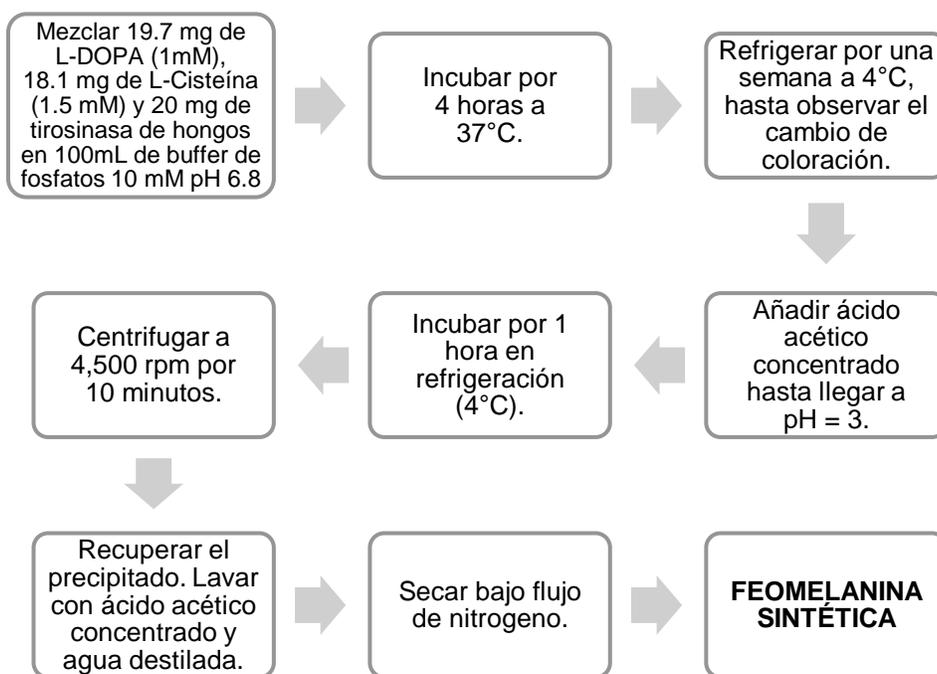


Figura 17. Diagrama de la síntesis de la feomelanina.

Identificación de las sustancias de referencia.

Al no existir una sustancia de referencia de tipo comercial para eumelanina y feomelanina por separado, con las cuales pudieran ser comparados los precipitados, fue necesario realizar una serie de análisis que permitieran asegurar que los precipitados obtenidos corresponden a la eumelanina y feomelanina.

Para lograr la correcta identificación de las sustancias de referencia, los resultados se compararon con los reportados en la literatura (Gonçalves y cols., 2012; Perna y cols., 2011; Stanic y cols., 2018), a través de métodos como: espectroscopía infrarroja, espectrofotometría UV y pruebas de solubilidad.

I. Espectroscopía infrarroja.

Perna y cols. (2011) estudiaron la estructura de las melaninas naturales obtenidas a partir de muestras de cabello oscuro y rojo, por medio de espectroscopía infrarroja, analizando su interacción con iones metálicos. Para esto, las muestras de cabello son lavadas con diferentes disolventes, hasta obtener un precipitado del cual se toman 2 mg de cada una, se mezclan con KBr y se registran los espectros de 900-4000 cm^{-1} (Figura 18).

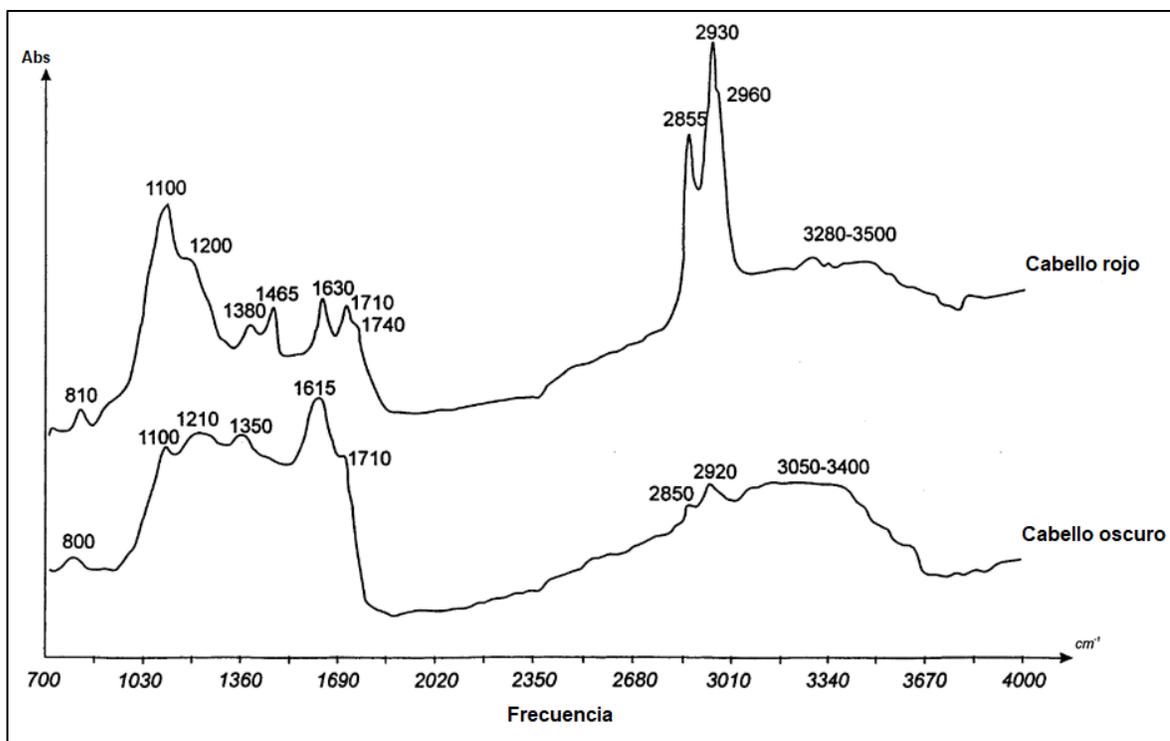


Figura 18. Espectro infrarrojo de las melaninas del cabello humano rojo y oscuro. Tomado y modificado de Bilińska (2001).

Para realizar el análisis por espectroscopía infrarroja, se obtuvieron los espectros de absorción, utilizando el ATR para evitar la preparación de la muestra y asegurar que en la medición no se obtuvieran interferencias. Los espectros se registraron en un rango de frecuencia de 900–4000 cm^{-1} , y se compararon con los existentes en la literatura (Figura 18). (Perna y cols., 2011).

I. Eumelanina.

En la eumelanina sintética (Figura 19), se tienen sistemas aromáticos ($\text{C}=\text{C}$ que se visualiza a aproximadamente 1620 cm^{-1}), anillos de indol ($\text{C}-\text{N}$ que se observa a aproximadamente 1360 cm^{-1} y $\text{N}-\text{H}$ que se ve a aproximadamente 3200 cm^{-1}) y grupos carboxilo ($\text{C}=\text{O}$ estiramiento asimétrico a aproximadamente 1710 cm^{-1} , $\text{C}=\text{O}$ estiramiento simétrico a aproximadamente 1400 cm^{-1} y el estiramiento $\text{C}-\text{OH}$ a aproximadamente 1280 cm^{-1}), así como la presencia de $\text{C}-\text{O}$

se observa a aproximadamente 1030 cm^{-1} . Ninguna contribución de los grupos alifáticos es evidente en la región espectral típica de las vibraciones de estiramiento de C-H ($2880\text{--}3020\text{ cm}^{-1}$) (Perna y cols., 2011).

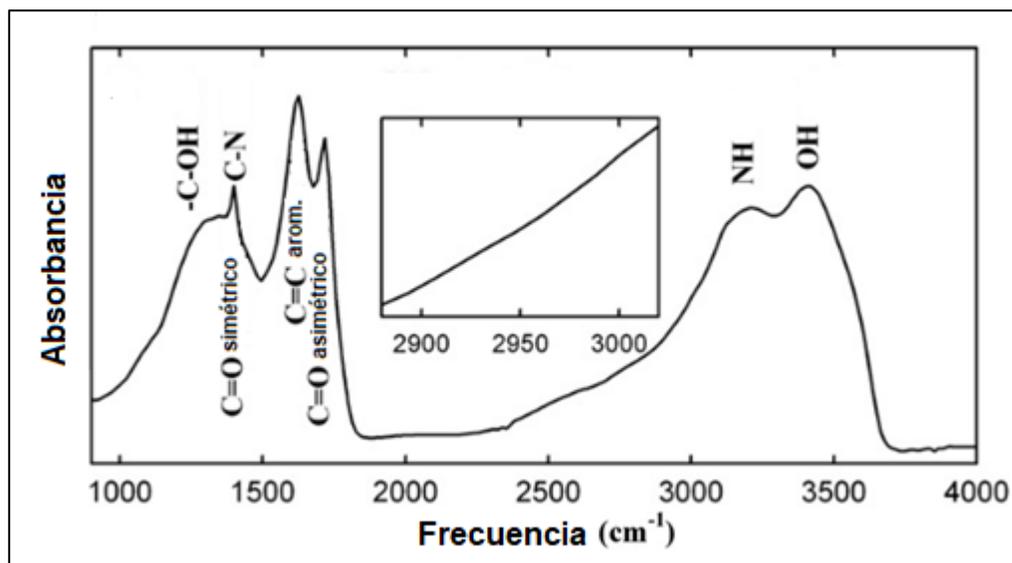


Figura 19. Espectro infrarrojo de la eumelanina sintetizada a partir de L-DOPA. Tomado y modificado de Perna y cols. (2011).

En el espectro obtenido de la eumelanina sintetizada (Figura 20), se observa una banda en 3205.12 cm^{-1} , la cual se puede atribuir al estiramiento de N-H; las bandas cerca de 2922.69 cm^{-1} se asignan al estiramiento de C-H en CH_2 y CH_3 ; la banda en 1704.50 cm^{-1} se atribuye al estiramiento asimétrico de C=O, mientras que el estiramiento simétrico aparece en 1399.12 cm^{-1} ; las vibraciones de estiramiento de los grupos aromáticos C=C se observan en 1613.89 cm^{-1} ; la banda en 1338.59 cm^{-1} corresponde al enlace C-N del anillo del indol; mientras que en 1291.04 cm^{-1} se observa el estiramiento C-OH y la banda cerca de 1059.81 cm^{-1} corresponde al C-O (Gonçalves y cols., 2012).

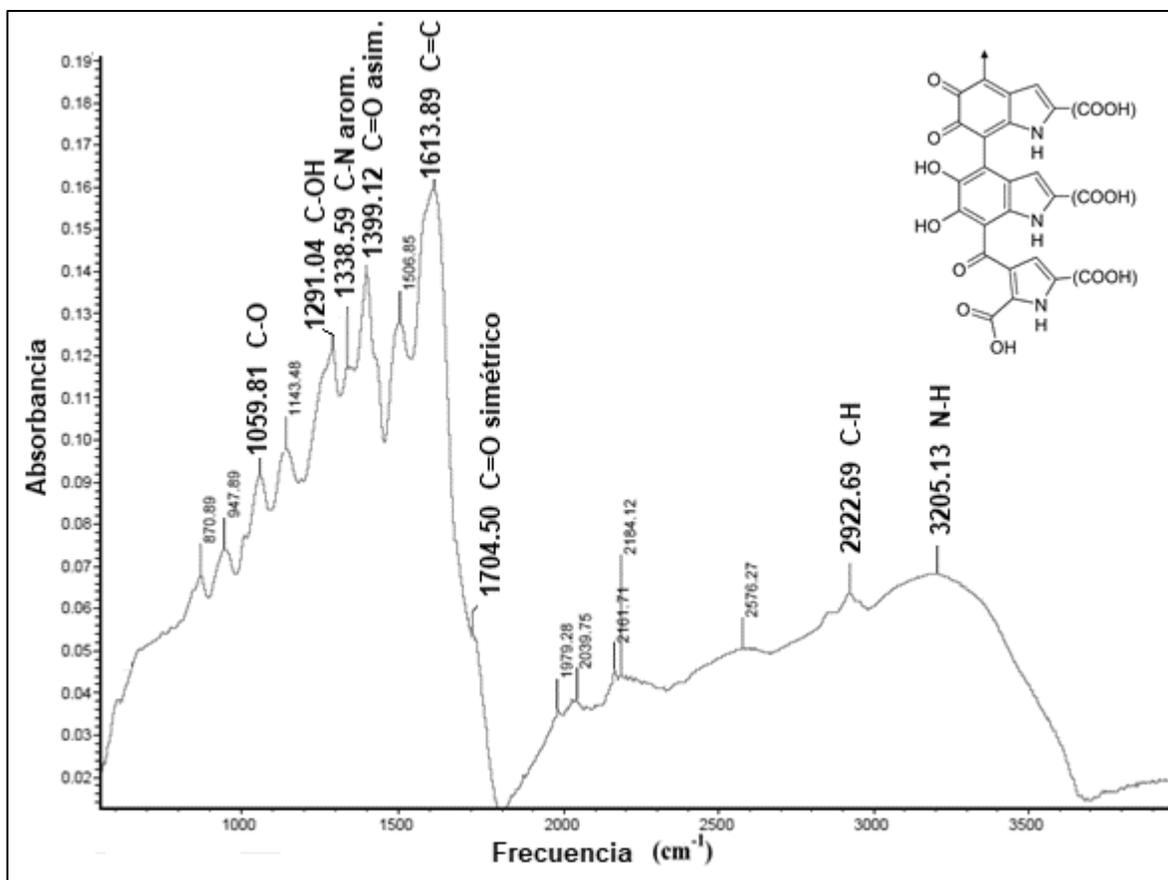


Figura 20. Espectro infrarrojo obtenido de la eumelanina sintetizada.

II. Feomelanina.

La región de 1000 cm^{-1} a 1300 cm^{-1} es característica de la feomelanina sintética; muestra bandas extremadamente intensas en 1124 cm^{-1} , 1172 cm^{-1} y 1213 cm^{-1} , que se atribuyen a la vibración del estiramiento simétrico S-O, generado por la oxidación de grupos sulfónicos presentes en la feomelanina; además de bandas muy intensas de fragmentos orgánicos alifáticos en la región de $2800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$, en específico a 2870 , 2930 y 2960 cm^{-1} , que corresponden a los enlaces C-H (Bilińska, 2001).

En el espectro obtenido de la feomelanina sintetizada (Figura 21), se observa una banda en 3216.40 cm^{-1} que corresponde al estiramiento N-H; en 2851.42 y 2922.49 cm^{-1} hay bandas que se pueden atribuir a los grupos C-H; las bandas

observadas entre 1558.65-1621.03 cm^{-1} se atribuyen a los estiramientos C=C; en 1338.84 cm^{-1} corresponde al enlace C-N del anillo fenólico; presenta bandas muy intensas en 1139.07 cm^{-1} y 1253 cm^{-1} , que se atribuyen a la vibración del estiramiento simétrico S-O.

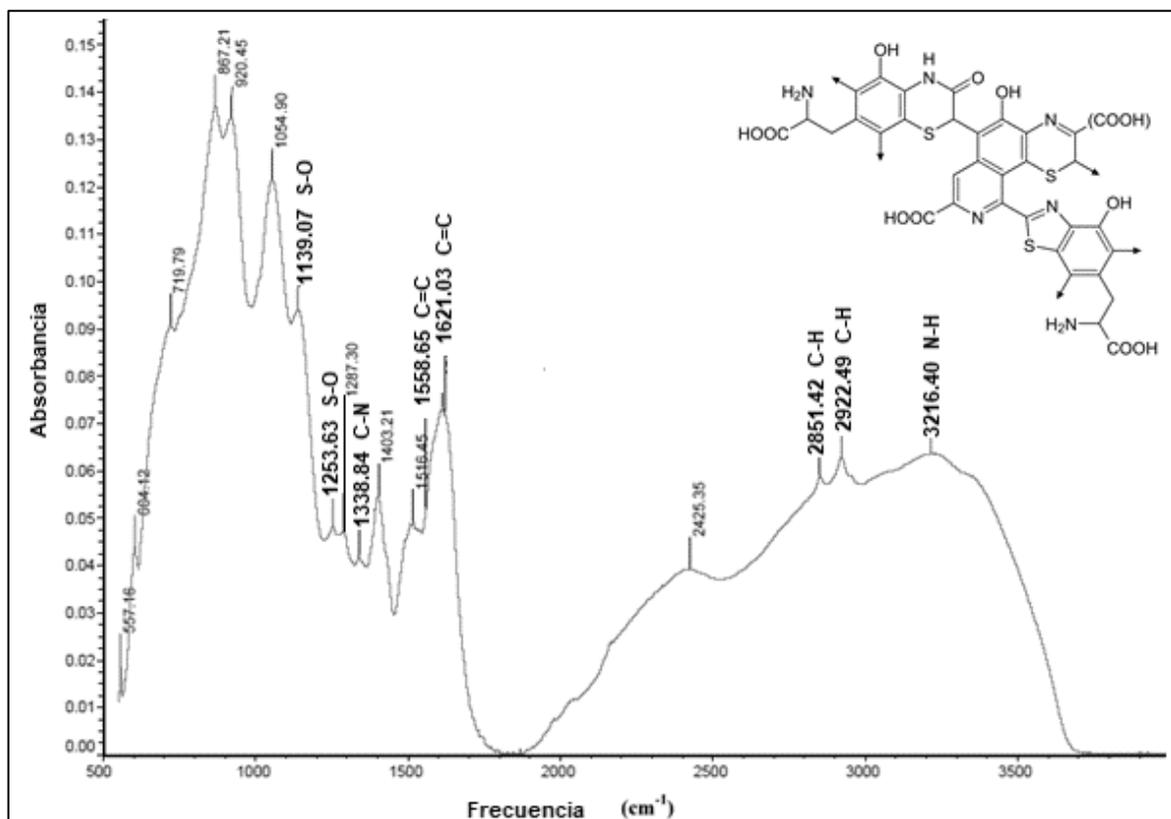


Figura 21. Espectro infrarrojo obtenido de la feomelanina sintetizada.

En el caso de los extractos de melanina a partir de cabello, puede haber presencia de pequeñas cantidades de proteínas del cabello, las cuales se observan en el ensanchamiento del pico a 1600 cm^{-1} , como resultados de las vibraciones de las amidas (1550 cm^{-1} y 1660 cm^{-1}) típicas de los grupos proteicos; así como una débil absorción en aproximadamente 2940 y 2970 cm^{-1} , relacionadas con las vibraciones de estiramiento CH, que confirman la inclusión de una pequeña cantidad

de proteínas en la muestra de melanina natural (Perna y cols., 2011), y que no se observaron en la muestra obtenida de forma sintética.

No es posible una superposición completa entre los espectros obtenidos y los reportados en la literatura, ya que los presentados por Perna y cols. (2011) así como por Bilińska (2001) se obtuvieron de las melaninas naturales del cabello y no de forma sintética como las de este trabajo; mientras que Gonçalves y cols. (2012) reportan los espectros de la mezcla de melaninas y no de forma aislada como se obtuvieron en el presente trabajo.

Los espectros de los productos obtenidos mediante este método de síntesis presentan las bandas de vibración de los grupos funcionales característicos de las melaninas, lo que permite asegurar la presencia de cada una de ellas (Figura 20 y Figura 21).

II. Espectrofotometría ultravioleta.

Las melaninas absorben en todas las longitudes de onda visibles, siendo esta característica la responsable del color del pigmento (Bell y Wheeler, 1986). Por lo que, al emplear espectrofotometría UV-visible, es posible obtener espectros con una absorción sin máximos o mínimos en los rangos visibles.

Gonçalves y cols. (2012) estudiaron el pigmento extraído de cepas altamente melanizadas de *Aspergillus nidulans*, para determinar el tipo de melanina presente en ese hongo. Ellos, solubilizan las melaninas en NaOH 0.5 M (0.5 mg/mL), obteniendo espectros UV que a continuación se muestran (Figura 22).

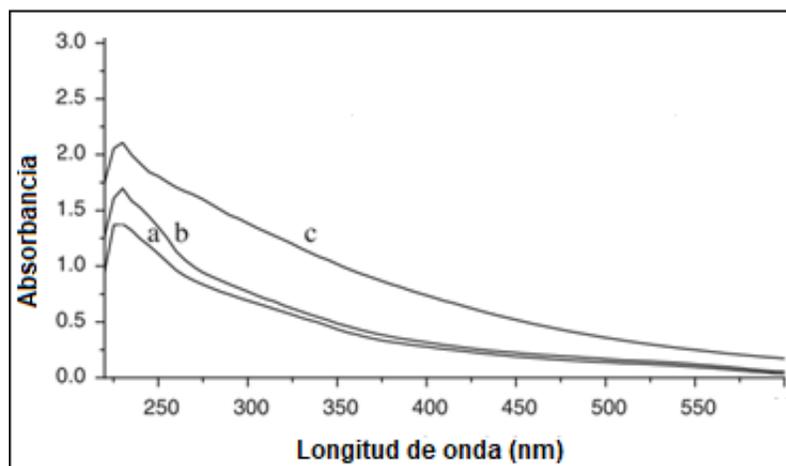


Figura 22. Espectro UV-Vis de la melanina sintetizada en cepas melanizadas de *Aspergillus nidulans*, donde a) corresponde al espectro de la melanina extraída del medio de cultivo, el b) a la melanina extraída del micelio y el c) a la melanina sintética. Tomado y modificado de Gonçalves y cols. (2012).

De acuerdo con Bell y Wheeler (1986), estos resultados son típicos del perfil de absorción de compuestos aromáticos como la melanina, que absorbe en la región UV (230 nm) y disminuye progresivamente a medida que aumenta la longitud de onda.

Se realizó la comparación entre los resultados obtenidos y los reportados por Gonçalves (2012), para lo cual se emplearon las mismas condiciones de preparación (la tirosinasa empleada para la síntesis de ambas melaninas proviene de un hongo).

Se prepararon disoluciones 0.5 mg/mL aproximadamente de cada una de las melaninas, pesando 2 mg de cada melanina y solubilizando en 4 mL de NaOH 0.5 M. Se registraron los espectros de absorción UV para las melaninas en un rango de 200 a 600 nm (Figura 23).

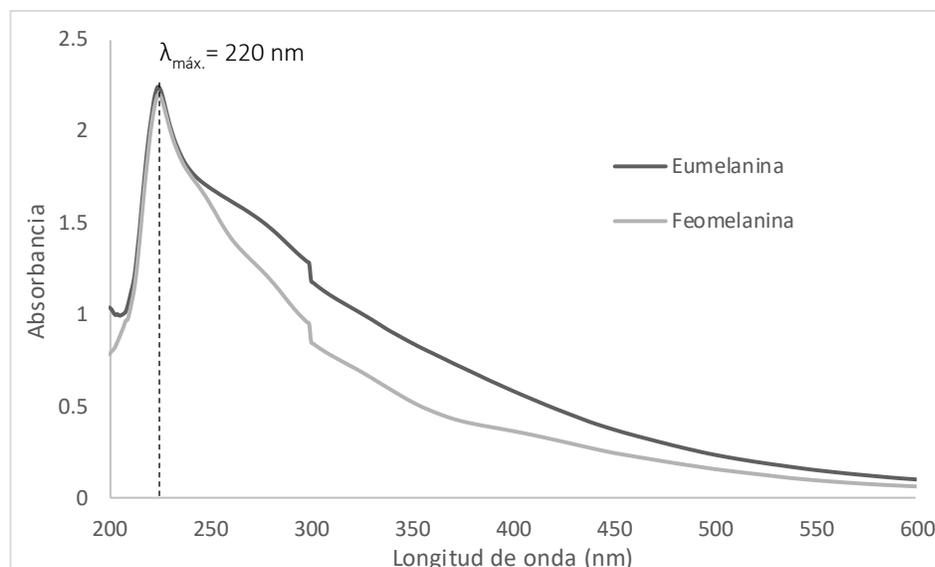


Figura 23. Espectros UV-vis obtenidos de las melaninas sintéticas en una solución de NaOH 0.5 M, a una concentración final aproximada de 0.5 mg/mL.

Los espectros registrados mostraron un patrón similar al reportado en la literatura, obteniendo absorción sin máximos o mínimos en los rangos visibles.

Al comparar los espectros obtenidos con los reportados en la literatura, se observó un comportamiento semejante de cada melanina sintetizada con los espectros de melanina de cepas de *Aspergillus nidulans*, ya que no hay máximos de absorción a mayor longitud de onda; además existe una coincidencia de los máximos de absorción ($\lambda_{máx.}$).

III. Solubilidad

Finalmente, se caracterizaron las melaninas por algunas propiedades físicas como la insolubilidad en agua y disolventes orgánicos, la resistencia a la degradación por ácidos concentrados y la solubilidad en soluciones alcalinas calientes, de acuerdo a lo señalado por diferentes autores (Lea, 1952; Lawrie, 2008; Gonçalves, 2012).

En primer lugar, se prepararon diferentes tubos con agua a un pH de 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14 ajustando el valor de pH con NaOH 0.5 M. En siete tubos se

colocaron aproximadamente 2 mg de la eumelanina sintetizada y se adicionó a cada uno 20 μ L de las soluciones preparadas a los diferentes valores de pH. Cada tubo se agitó y se dejó reposando a temperatura ambiente, observando que a partir de un valor de pH = 10, la eumelanina comienza a solubilizarse, pero no en su totalidad, por lo que se buscó favorecer la solubilidad al incrementar la temperatura de la mezcla hasta 50°C; sin embargo, en ningún caso se logró. Se repitió el procedimiento empleando NH₄OH (32%) para ajustar el valor de pH de la solución, pero de igual manera, no se consiguió solubilizar la eumelanina.

Posteriormente, se repitió el procedimiento anterior, empleando diferentes solventes y las dos melaninas. En diferentes tubos, se colocaron aproximadamente 2 mg de cada melanina y se adicionaron 20 μ L de cada disolvente: acetona, etanol, cloroformo, buffer de fosfatos, agua y Solueno®, a temperaturas de 25°C y 50°C; los resultados se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Análisis de solubilidad del precipitado de las melaninas sintetizadas.

DISOLVENTE	EUMELANINA	FEOMELANINA
H ₂ O a 25°C	X	X
H ₂ O a 50°C	X	~
Buffer de fosfatos (10mM), pH 6.8	X	~
Acetona	X	X
Etanol	X	X
Cloroformo	X	X
NaOH (0.5 M), 25°C, pH 9	X	X
NaOH (0.5 M), 50°C, pH 9	~	~
NH ₄ OH (32%), 25°C, pH 10	X	~
NH ₄ OH (32%), 50°C, pH 10	~	+
Solueno®, 25°C, pH 12	~	~
Solueno®, 50°C, pH 12	+	+

(x) insoluble; (+) soluble; (~) parcialmente soluble

Los resultados de la tabla 2 muestran que la feomelanina es más soluble que la eumelanina en las condiciones evaluadas. Ambas melaninas son insolubles en agua, disolventes orgánicos (acetona, cloroformo y etanol) e NaOH a temperatura ambiente. Sin embargo, al incrementar la temperatura y modificar su pH, ambas melaninas se volvieron parcial o completamente solubles en medios alcalinos fuertes (NH₄OH, NaOH y Solueno®), siendo el Solueno® el mejor disolvente para solubilizar ambas melaninas.

Extracción y determinación de las melaninas sintéticas por espectrofotometría UV-Vis.

Para realizar la extracción de la melanina, Ozeki señala que la muestra se debe suspender en 500 µL de agua por sonicación. Se toman 100 µL, se mezclan con 900 µL de Solueno® y se agita; después se calienta en un baño de agua hirviendo por 45 minutos, se centrifuga y registra el espectro UV de la fase superior de las muestras (Ozeki y cols., 1996).

Sin embargo, después de calentar y centrifugar las muestras, se observó que el Solueno® se vuelve denso y viscoso, dificultando su manipulación al colocarlo en la celda del espectrofotómetro para su lectura. Además, no siempre se obtenía la separación de las fases, así como la obtención en la misma proporción de las dos fases formadas al calentar el Solueno® en la muestra y el blanco, por lo que se decidió modificar la extracción para asegurar la reproducibilidad de ésta.

Para evitar trabajar con una suspensión de las melaninas, estas se solubilizaron en Solueno®. Se prepara una solución de cada una de las melaninas sintéticas a una concentración 10 mg/mL en Solueno®. Se colocan 100 µL de agua y 900 µL de la solución de la melanina sintética, se agitar en el vórtex y se observa una mezcla heterogénea debido a que el agua y el Solueno® son miscibles.

Para obtener las dos fases, es necesario que la muestra se caliente. Luego de realizar varias pruebas se encontró que, para obtener la separación de las fases,

las muestras deben permanecer en un sistema **abierto** y en agitación durante la incubación, para permitir la evaporación del metanol presente en el Solueno®. Se piensa que este es el componente que favorecen su miscibilidad con el agua.

A partir de lo observado, se trabajó en encontrar un tiempo y temperatura óptimos para realizar la extracción de las melaninas. Para llevar a cabo la extracción, la muestra de eumelanina sintética con su respectivo blanco, se incubaron variando los parámetros de temperatura y tiempo, tomando como referencia que, como señala Sawhney (1994), la melanina deja de ser estable a los 106°C aproximadamente.

Para esto, la melanina se dividió en diferentes tubos para variar los parámetros de temperatura y tiempo en cada uno; se calentó a temperaturas de 40 a 80°C, aumentando gradualmente 10°C en cada repetición, por periodos de 2 a 4 horas y con una agitación de 300 rpm, manteniendo constante los parámetros al utilizar un termociclador.

Para la elección de los parámetros ideales, se buscó que la separación de fases siempre estuviera presente, que el blanco no presentara un cambio de coloración, así como que el volumen tomado de la fase superior¹ de la solución incubada, fuera el suficiente para colocarlo en la celda (300 µL) y se mantuviera constante en las repeticiones, lo que nos permitiría asegurar la repetibilidad del método.

Después de incubar a las diferentes temperaturas y tiempos (Tabla 3), se midió el volumen de la fase superior en cada una de las soluciones incubadas, y se registraron los espectros.

Las muestras que se calentaron por un lapso de 2 horas dieron absorbancias negativas, por lo que se descartaron.

¹ Se denominarán fase superior e inferior debido a que no se tiene certeza de cuál es la fase orgánica y cual la acuosa, ya que los componentes de la mezcla no lograron aislarse en su totalidad, estando presentes en ambas fases.

Para los espectros de las muestras calentadas por 4 horas (Figura 24), se observó que en todos los casos se presentaban dos máximos de absorción, el primero de ellos a una $\lambda_{\text{máx.}} = 360$ nm y el segundo con una $\lambda_{\text{máx.}} = 400$ nm, mismos que no presentan tendencia con respecto a la temperatura.

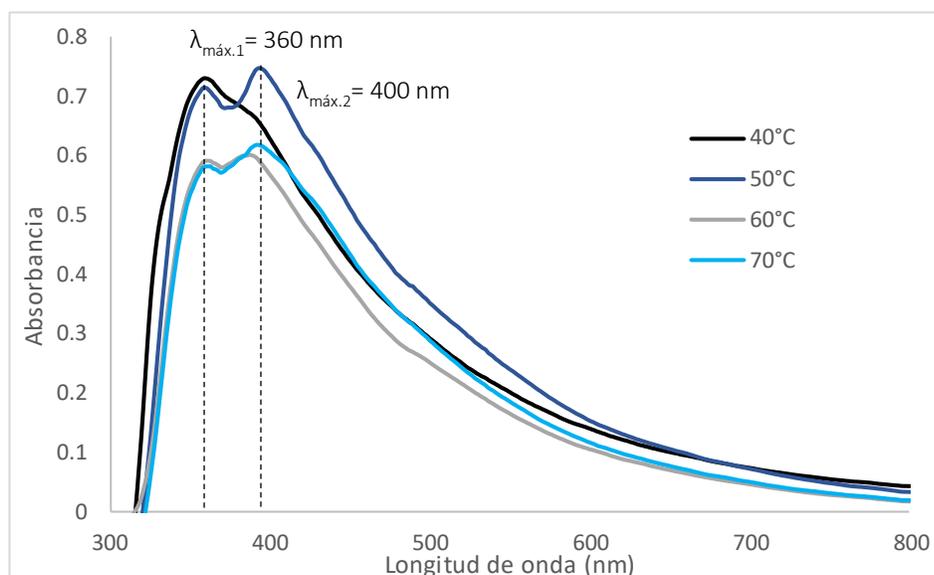


Figura 24. Espectros UV-Vis de la eumelanina sintetizada (10 mg/mL) por un tiempo de cuatro horas y a diferentes temperaturas de incubación.

Al calentar la mezcla de extracción por periodos de 2 horas, se observó un incremento en el volumen de separación de la fase superior. Al aumentar la temperatura de incubación, en periodos de 4 horas de calentamiento, se observó que el volumen disminuye, hasta volverse equivalente entre la muestra y el blanco.

Calentando 2 horas a temperaturas menores a 60°C no es posible la separación de las fases; además, no se tiene el mismo volumen de la fase superior tanto en el blanco como en la muestra, descartando ese tiempo en todas las temperaturas (Tabla 3).

<i>Tabla 3. Volumen tomado de la fase superior de cada muestra.</i>				
	40°C, 2 h	50°C, 2 h	60°C, 2 h	70°C, 2 h
Blanco	350 µL	400 µL	450 µL	460 µL
Muestra	-	-	500 µL	430 µL
	40°C, 4 h	50°C, 4 h	60°C, 4 h	70°C, 4 h
Blanco	600 µL	550 µL	500 µL	400 µL
Muestra	500 µL	500 µL	500 µL	400 µL

Se descartaron temperaturas mayores a 70°C, ya que, al incrementar la temperatura hasta ese rango, se obtienen absorbancias por encima de la aplicación de la Ley de Lambert-Beer, además de que luego de calentar, el blanco adquiere un cambio de coloración, que interfiere con las mediciones.

A las 4 horas de calentamiento, a temperaturas menores a 60°C, a pesar de obtener un mayor volumen, las fases no se encuentran completamente separadas, debido a que hay turbidez en la muestra.

A 60 y 70°C se recuperó la misma cantidad de la fase superior tanto en el blanco como en la muestra; sin embargo, a pesar de que a 60°C se obtuvo un mayor volumen, se observó un cierto remanente de emulsión en las fases, derivado de alguno de los compuestos del Solueno®; siendo las 4 horas a 70°C las mejores condiciones para la extracción de la eumelanina.

Luego de incubar, para evitar las variaciones en el volumen de recuperación, se evaluó el tiempo que debía permanecer en enfriamiento la muestra antes de centrifugar, por lo que se dejó por diferentes periodos, desde 5 minutos hasta 16 horas, dejando el sistema abierto y cerrado.

Se observó que al dejar el sistema cerrado la separación de las fases es menos visible, el volumen de recuperación es menor y requiere de mayor tiempo de reposo. Mientras que, al dejar el sistema abierto, pasando las 2 horas es posible obtener el volumen mínimo necesario (300 µL) para la lectura de la muestra en la

celda. Encontrando que, a mayor tiempo de reposo, mejor separación de fases, obteniendo una separación de éstas sin la necesidad de centrifugar la muestra luego de las 12 horas de reposo.

Partiendo de que tanto la eumelanina como la feomelanina son solubles en Solueno® caliente (Tabla 2), se pesaron 10 mg de cada melanina y se solubilizaron en 1 mL de Solueno®, obteniendo las melaninas en solución a una concentración aproximada de 10 mg/mL.

Después de todas las modificaciones se llegó a la optimización del método de extracción (Figura 25), siendo este reproducible en las condiciones propuestas, por lo que, para realizar la extracción de las melaninas, se sugiere calentar la muestra con su blanco por 4 horas a 70°C y 300 rpm, dejando el sistema abierto; después, enfriar por 3 horas y centrifugar a 12,500 rpm por 20 minutos. Recuperar la fase superior y medir el espectro en un rango de 200 a 800 nm.

Condiciones óptimas para la extracción y determinación por espectrofotometría UV-vis de melaninas sintéticas.

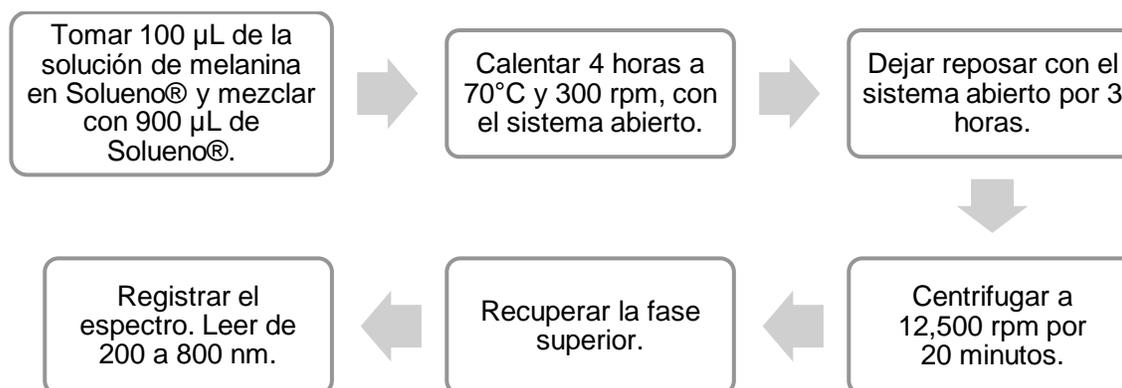


Figura 25. Diagrama de la extracción y medición de la melanina por espectrofotometría UV-vis.

Elección de las longitudes de onda de trabajo.

Con todas las modificaciones hechas al método propuesto por Ozeki y cols. (1996), se decidió registrar espectros con soluciones de melanina preparadas a diferentes concentraciones (10 mg/mL y 5 mg/mL).

Sin embargo, al obtener los espectros (Figura 26) de las melaninas sintéticas, se observó que las longitudes de onda señaladas por Ozeki y cols. (1996), no eran las más idóneas para el objetivo que se persigue en este trabajo, debido a que la contribución más importante del mismo consiste en calcular la concentración y relación de cada una de las melaninas presentes en diferentes muestras de cabello, a partir de realizar el cálculo de la concentración mediante la aplicación de la Ley de Aditividad.

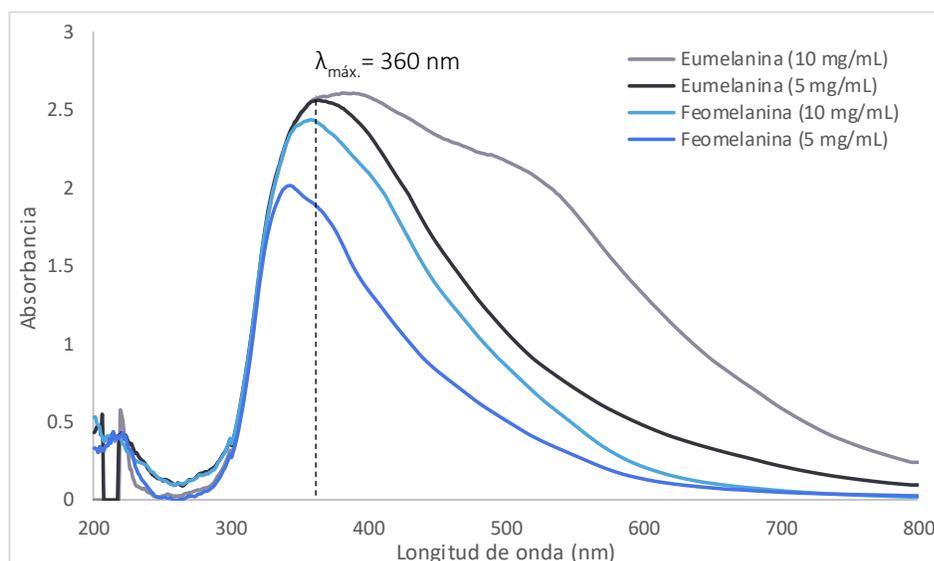


Figura 26. Espectros UV-Vis de las melaninas sintéticas a diferentes concentraciones.

Por lo que se realizaron diluciones 1:10 con la finalidad de separar las bandas y observar mejor los máximos de absorción (Figura 27), así como buscar que las absorbancias entraran dentro del rango de aplicación de la Ley de Lambert-Beer.

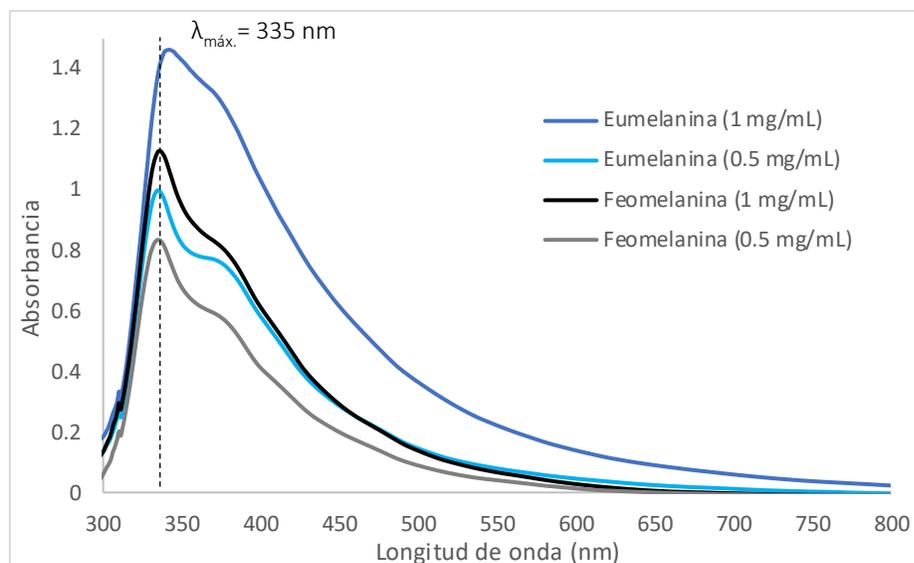


Figura 27. Espectros UV-vis de las melaninas sintéticas, luego de realizar diluciones de las muestras iniciales.

A pesar de que cerca de 335 nm se observa el máximo de absorción en todos los espectros, no se seleccionó como un punto de referencia, debido a que el Solueno® no solo solubiliza las melaninas del cabello, sino también otros componentes como las proteínas, los lípidos, los aminoácidos, entre otros, que absorben muy intensamente alrededor de esa longitud de onda, como se presentó en la *Tabla 1. Características espectrales de cromóforos encontrados en las proteínas.*

Por lo anterior, se decidió elegir diferentes longitudes de onda: 360 nm (valor representativo de las melaninas totales debido a que ambas melaninas absorben a esa longitud de onda) y 700 nm (valor donde absorbe mayormente la eumelanina que la feomelanina).

Reproducibilidad de los espectros de melanina de diferentes síntesis.

Se evaluó la reproducibilidad en los espectros de las melaninas sintéticas obtenida de tres diferentes síntesis, a partir del porcentaje del coeficiente de variación (%CV).

Se realizó la síntesis de cada una de las melaninas, de acuerdo a las condiciones descritas en las páginas 43 a 45 de esta tesis y que se resumen, para la síntesis de eumelanina en la Figura 16 y para el caso de la feomelanina en la Figura 17.

Del producto de la síntesis de cada melanina, se preparó por separado, una solución a una concentración de 1 mg/mL en Solueno®. Se realizó el procedimiento como se describe en la sección *Condiciones óptimas para la extracción y determinación por espectrofotometría UV-vis de melaninas sintéticas*, descrito en la Figura 25, página 59 de esta tesis.

Este procedimiento se repitió dos veces más para cada una de las melaninas, de tal manera que se tienen seis espectros de absorción que muestran en la Figura 28.

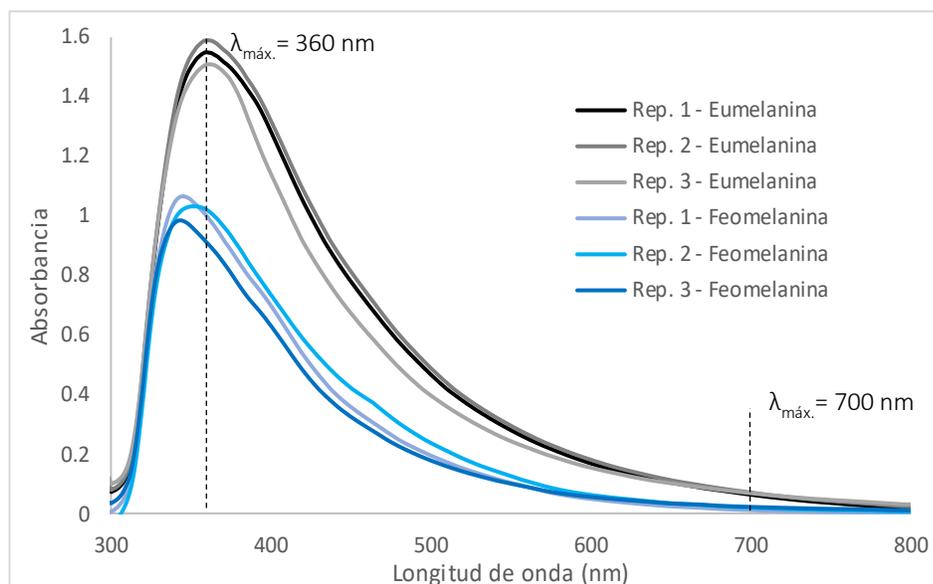


Figura 28. Espectros UV-vis de las repeticiones del método de síntesis de las melaninas a una concentración aproximada de 1 mg/mL en diferentes días.

Se registraron los valores de absorbancia a 360 y 700 nm de cada repetición. Estos valores al igual que el coeficiente de variación se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Resultados de las pruebas de repetibilidad durante tres días diferentes en las muestras de eumelanina y feomelanina sintetizadas.

	EUMELANINA SINTÉTICA	FEOMELANINA SINTÉTICA	EUMELANINA SINTÉTICA	FEOMELANINA SINTÉTICA
	360 nm		700 nm	
Síntesis 1	1.5485	1.0777	0.0521	0.0118
Síntesis 2	1.5841	1.0988	0.0577	0.0131
Síntesis 3	1.5093	1.0560	0.0551	0.0123
Media	1.5474	1.0775	0.0550	0.0124
Desviación estándar	0.0374	0.0214	0.052	0.0502
Coefficiente variación	2.41 %	1.98 %	5.15 %	5.02 %

El coeficiente de variación (%CV) se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\%CV = \%RSD = \frac{S}{\bar{x}} * 100$$

Donde:

CV = Coeficiente de variación

s = Desviación estándar de la muestra

\bar{x} = Media aritmética de la muestra

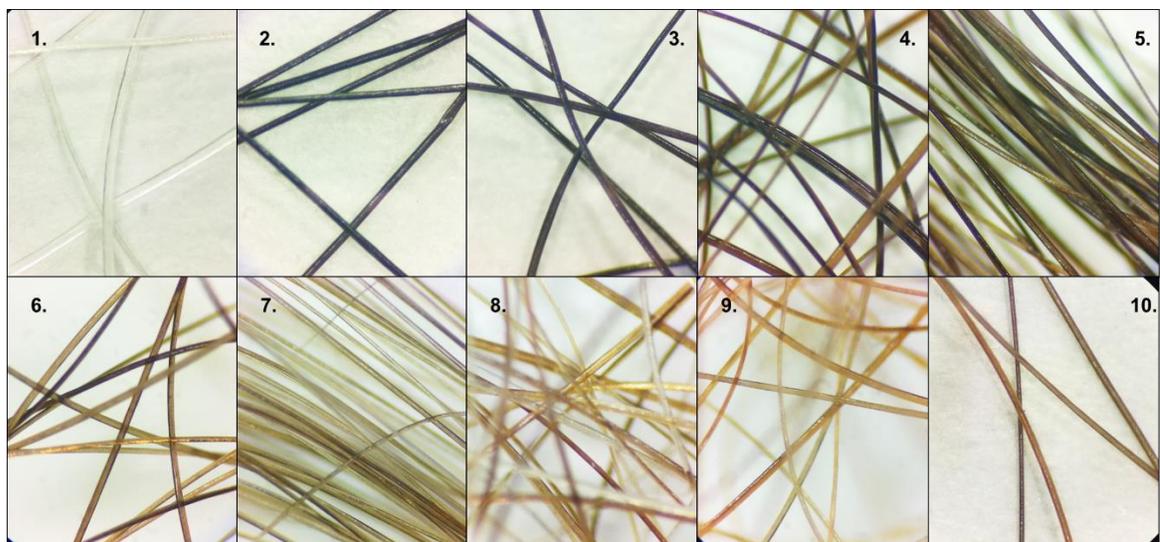
Con los valores obtenidos se puede concluir que la variación tanto para la eumelanina como feomelaninas sintéticas, en las diferentes longitudes de onda, se

encuentra dentro de los límites establecidos en la literatura ($CV < 10\%$), de acuerdo a la guía CCAYAC-P-058 (CCAYAC, 2011).

Análisis de las muestras de cabello.

Las 10 muestras recolectadas se fotografiaron a través de su observación por un microscopio estereoscópico marca Zeiss, modelo Stemi DV4 (Figura 29). Las muestras 1 y 2 corresponden al mismo individuo, pero se separaron por tratarse de cabello sin color (cana) y con color.

Se les pidió a 11 operadores distintos que clasificaran de forma visual cada muestra en: negro, café, rubio, rojo y cano, a través del microscopio estereoscópico y a partir de la fotografía. Los resultados de las frecuencias calculadas de la asignación de color se presentan en el Apéndice 1.



*Figura 29. Diferentes muestras de cabello seleccionadas para su análisis.
Asignación del color por los operadores (a partir de la fotografía/vista por el microscopio estereoscópico)
1) cana/cana, 2) negro/café, 3) negro/negro, 4) café/negro, 5) café/café, 6) café/café/, 7) rubio/rubio,
8) rubio/rubio, 9) rojo/rojo, 10) rojo/rojo.*

Después de realizar la asignación del color del cabello, los resultados que se obtuvieron muestran que un mismo observador puede llegar a asignar un color distinto al que asignó previamente a la misma muestra, al observarla directamente o por medio del microscopio, lo que evidencia la gran variabilidad y sesgo que existe respecto de la asignación en el color del cabello.

Al asignar colores diferentes a una misma muestra de cabello, los operadores muestran la poca confiabilidad, y resaltan la necesidad de contar con un método que permita hacer la estimación del color del cabello de manera objetiva.

Se observa que en las muestras con tonalidades negro y café hay mayor certeza en la asignación por los operadores, reflejado en la alta frecuencia de asignación en la misma categoría de color, la cual es más alta que al asignar las muestras con tonalidades rubio o rojo; ya que para algunas muestras los diferentes operadores asignan categorías que varían desde el color café hasta el cano, pasando por rubio a la misma muestra. La muestra marcada como número 5 fue la que menor frecuencia obtuvo, debido a que en su clasificación los operadores marcaron diferentes tonalidades.

Además, al realizar la asignación observando a simple vista se obtuvo un mayor porcentaje en la asignación del color que al observar a través del microscopio, mismo que se refleja en una menor frecuencia de asignación en la coloración, al presentar mayor detalle el cabello, lo que trae confusión en la asignación.

Extracción de las melaninas

Para el análisis de las muestras, se recomienda usar muestras de cabello recién recolectadas, ya que el fotoenvejecimiento induce modificaciones estructurales no solo en las feomelaninas (Greco y *co/s.*, 2009) sino también en las eumelaninas (Wakamatsu y *co/s.*, 2012).

El cabello recolectado, se lavó con agua destilada, se secó y cortó en trozos pequeños de 1 mm aproximadamente. Las muestras se trituraron con un homogeneizador (TenBrock Glass®) para favorecer la extracción.

El cabello finamente picado, se colocó en el tubo del homogeneizador mezclando con 1 mL de agua destilada y se maceró la muestra. Del homogenizado se colocaron 100 μ L en un tubo eppendorf y se adicionaron 900 μ L de Solueno®. La mezcla se calentó a 70°C por 4 horas, con el sistema abierto y agitando a 300 rpm. Se dejó enfriar por 3 horas y se centrifugó por 20 minutos a 12,500 rpm para obtener las dos fases.

Para verificar que la extracción se llevó a cabo, se tomó la fase superior y se colocó en la celda para medir la absorbancia, realizando el barrido de la muestra en un rango de 200 a 800 nm, y registrando los espectros de cada muestra (Figura 30).

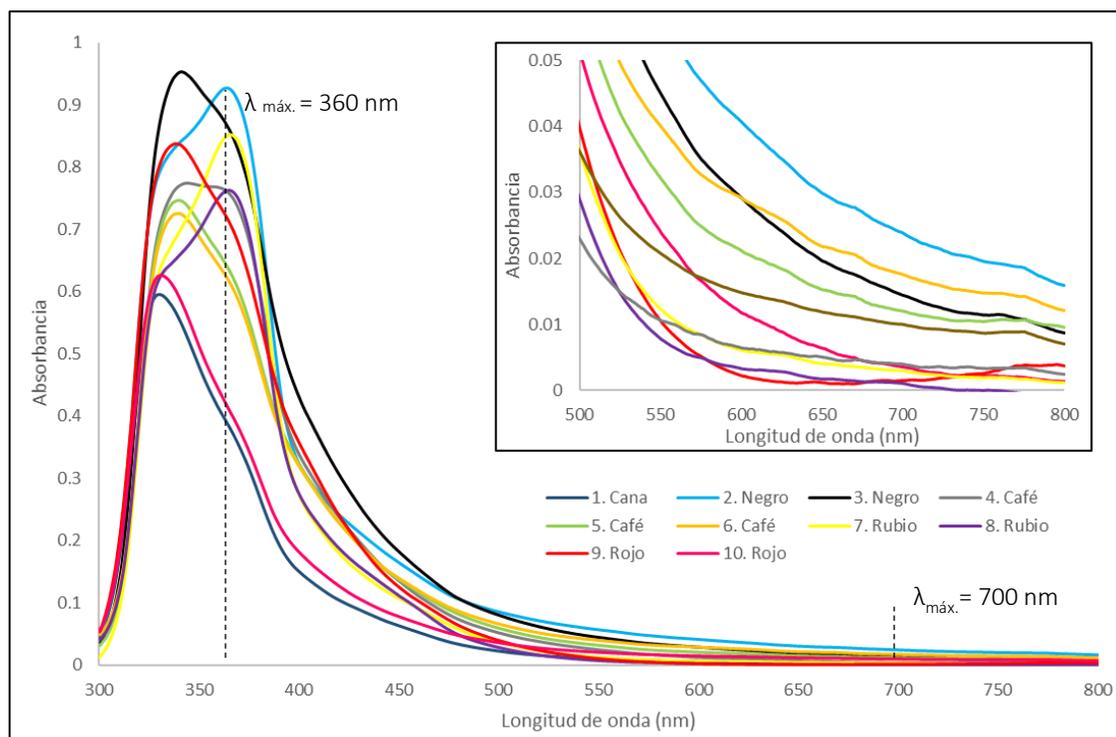


Figura 30. Espectros UV-vis obtenidos de las muestras de cabello analizadas.

Luego de realizar la medición, se observaron diferencias entre los espectros del cabello, obteniendo máximos de absorción que varían en la zona de 330 a 360 nm, los cuales van disminuyendo su absorbancia conforme aumenta la longitud de onda.

Cuantificación de las melaninas del cabello por espectrofotometría UV.

Se procedió a realizar la cuantificación de las melaninas presentes en una de las muestras, empleando dos diferentes métodos.

Cuantificación por la Ley de Aditividades

Para llevar a cabo la cuantificación por la Ley de Aditividades, es indispensable conocer el valor de la absorptividad (α) de las melaninas, en cada una de las longitudes de onda seleccionadas (360 y 700 nm), por lo que es necesario construir una curva de calibración para cada una.

. Para preparar el estándar se pesaron 10 mg de cada una de las melaninas, se agregó 1 mL de Solueno® y se calentaron a 70°C con agitación hasta solubilizar **toda la melanina**; se obtuvieron soluciones con una concentración inicial de 10 mg/mL de cada una de las melaninas.

A partir de estas soluciones, se prepararon diluciones en Solueno® con un volumen de aforo de 1 mL para elaborar los puntos de las curvas de calibración (Tabla 5).

Tabla 5. Preparación de las curvas de calibración.

Alícuota tomada de solución estándar 10 mg/mL de eumelanina (µL)	Volumen de aforo (mL)	Concentración final eumelanina (mg/mL)	Alícuota tomada de solución estándar 10 mg/mL de feomelanina (µL)	Volumen de aforo (mL)	Concentración final feomelanina (mg/mL)
20	1	0.2	10	1	0.1
30	1	0.3	30	1	0.3
40	1	0.4	50	1	0.5
50	1	0.5	70	1	0.7
60	1	0.6	100	1	1.0

Para obtener el volumen final de 1 mL, se tomó el volumen necesario para preparar cada alícuota y se completó con Solueno® hasta tener 900 µL de aforo, y posteriormente se añadió 100 µL de agua destilada. Se agitó hasta que se homogeneizó la solución; se calentó a 70°C por 4 horas, con agitación. Se dejó enfriar por 3 horas y se centrifugó por 20 minutos a 12,500 rpm. Se registraron los espectros UV-vis en un barrido de 200 a 800 nm.

I. Curvas de calibración.

Una vez obtenidos los espectros, se construyó una curva de calibración para cada melanina (eumelanina y feomelanina) con los valores obtenidos en cada alícuota en las diferentes longitudes de onda (Figura 31 a 34).

- Eumelanina

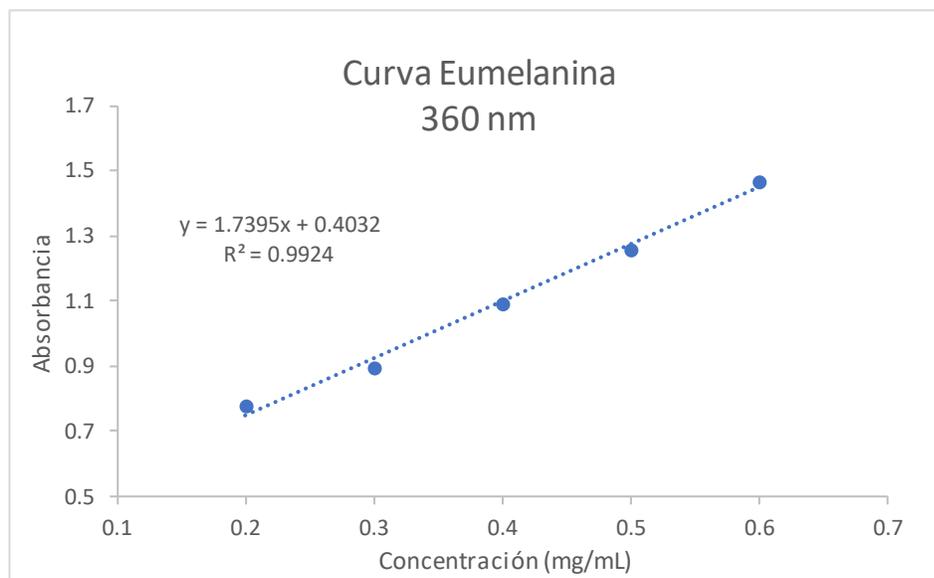


Figura 31. Gráfica de la absorbanza vs la concentración de la eumelanina sintetizada a una longitud de onda de 360 nm.

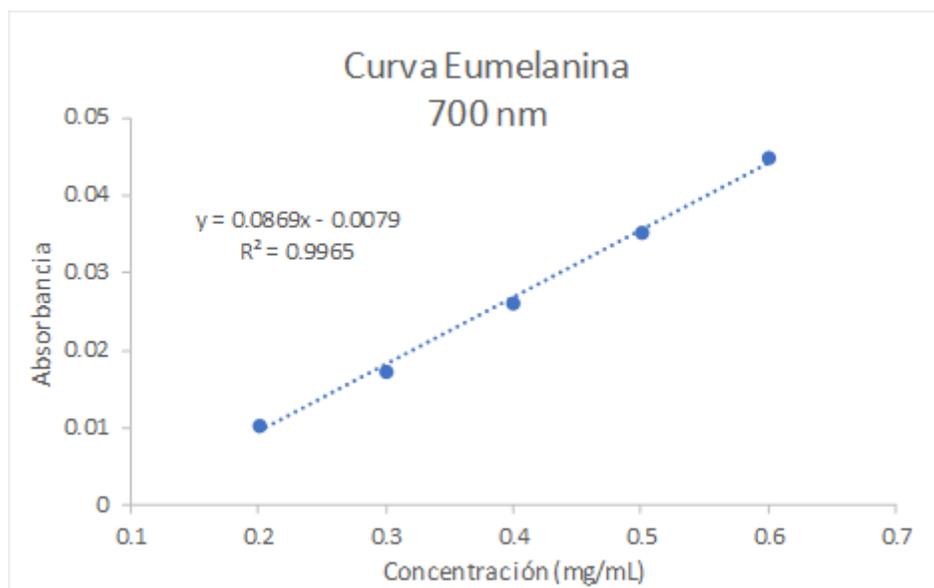


Figura 32. Gráfica de la absorbanza vs la concentración de la eumelanina sintetizada a una longitud de onda de 700 nm.

- Feomelanina

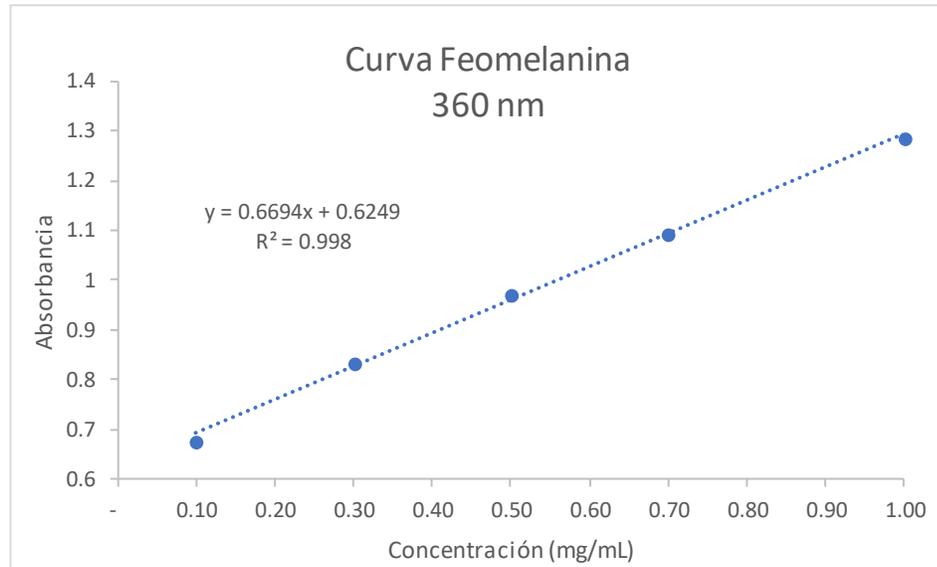


Figura 33. Gráfica de la absorbancia vs la concentración de la feomelanina sintetizada a una longitud de onda de 360 nm.

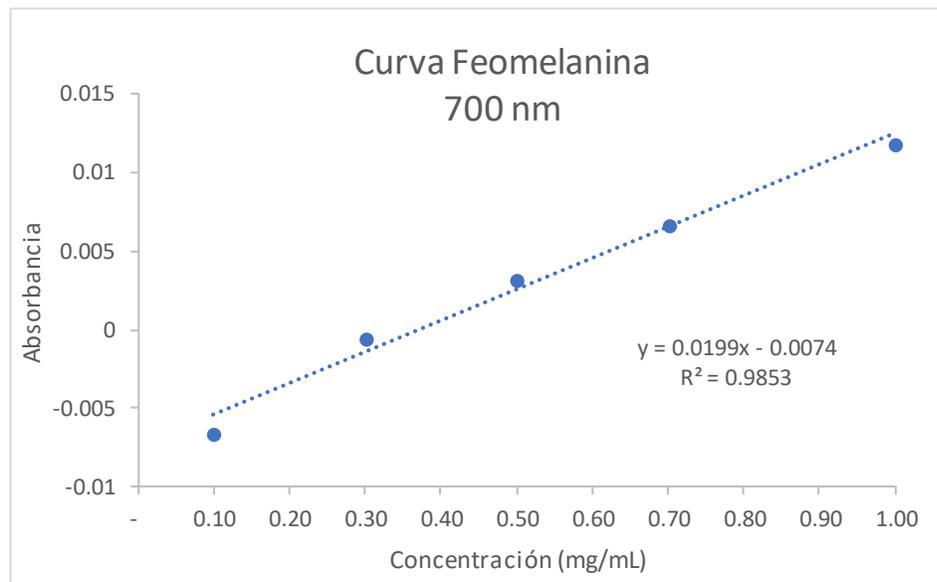


Figura 34. Gráfica de la absorbancia vs la concentración de la feomelanina sintetizada a una longitud de onda de 700 nm.

En ambos casos, se obtuvo una respuesta lineal en la absorbancia con respecto al incremento de la concentración en las longitudes de onda evaluadas.

II. Medición de la proporción de las melaninas en el cabello.

Con el espectro de cada muestra de cabello, se realizó la cuantificación de cada melanina, aplicando la Ley de Aditividad. Para esto, se construyó un sistema de dos ecuaciones seleccionando las longitudes de onda elegidas 360 y 700 nm, y considerando que la absorción en cada una de ellas es igual a la suma de la absorbancia atribuida a cada melanina. Con base en la ecuación de la Ley de Lambert y Beer, se emplearon los coeficientes de absorptividad de cada curva realizada (Figura 31 a 33).

$$A = \alpha * \ell * C$$

Donde $\ell = 1 \text{ cm}$ y $\alpha = m$ (pendiente).

Derivando las siguientes ecuaciones para realizar la suma de las absorbancias de la eumelanina y feomelanina en cada longitud de onda seleccionada:

A_{360}	A_{700}
$A_{(E+F)360} = \alpha_{E360} \ell C_E + \alpha_{F360} \ell C_F$	$A_{(E+F)700} = \alpha_{E700} \ell C_E + \alpha_{F700} \ell C_F$
$A_{360} = 1.7395 \cdot C_E + 0.6694 \cdot C_F$	$A_{700} = 0.0869 \cdot C_E + 0.0199 \cdot C_F$

Quedando las siguientes ecuaciones para calcular la concentración de cada melanina²:

$$C_F = 3.69(A_{360}) - 73.8644(A_{700})$$

$$C_E = 0.5748(A_{360}) - 0.3848(C_F)$$

Obteniendo para cada muestra de cabello las concentraciones de eumelanina y feomelanina en mg/mL, y realizando una relación entre ambas melaninas (Tabla 6).

<i>Tabla 6. Resultado de las concentraciones de las melaninas obtenidas de las muestras de cabello.</i>		
Muestra (Asignación de color^a)	Concentración eumelanina (mg/mL)	Concentración feomelanina (mg/mL)
1. Cana (100%)	-0.1617	1.0326
2. Negro (90%)	-0.0975	1.6269
3. Negro (81%)	-0.3387	2.2044
4. Café (72%)	-0.5480	2.5704
5. Café (72%)	-0.2154	1.5474
6. Café (72%)	-0.1153	1.2575
7. Rubio (90%)	-0.4407	2.2913
8. Rubio (72%)	-0.3324	1.7981
9. Rojo (100%)	-0.3637	2.1914
10. Rojo (63%)	-0.0482	1.0596
^a El porcentaje representa la frecuencia del color asignada a las muestras por los 11 observadores (apéndice 2).		

² Consultar el apéndice 0 para el despeje completo de la ecuación.

De los resultados obtenidos, se pudo observar que en todas las muestras analizadas, la concentración de la feomelanina es mayor que la de la eumelanina, ya que se obtuvieron absorbancias negativas para la concentración de la eumelanina.

III. Recobro.

Para evaluar la eficiencia de la extracción, el proceso de preparación y posibles interferencias que pudieran existir al aplicar la metodología propuesta se realizó el cálculo del recobro con una muestra adicionada.

$$\%R = \frac{y - x_i}{x_a} \times 100$$

Donde:

y = *Concentración de la muestra más el patrón añadido*

x_i = *Concentración inicial de la muestra*

x_a = *Concentración del patrón añadido*

Se colocaron 100 μL de la suspensión del cabello³ de color café marcado como muestra 4, junto con 890 μL de Solueno® y 10 μL de las melaninas en solución (10 mg/mL).

Se realizó el proceso de extracción y el barrido en el espectrofotómetro (Figura 35). Se obtuvieron las absorbancias a las longitudes de onda de 360 y 700

³ Se lavan y pesan 10 mg de cabello, se corta en trozos pequeños, se macera con un homogeneizador y se suspende en 1 mL de agua.

nm; se calculó la concentración de cada melanina (Tabla 7), y finalmente se calculó el porcentaje de recobro de cada melanina (Apéndice 0).

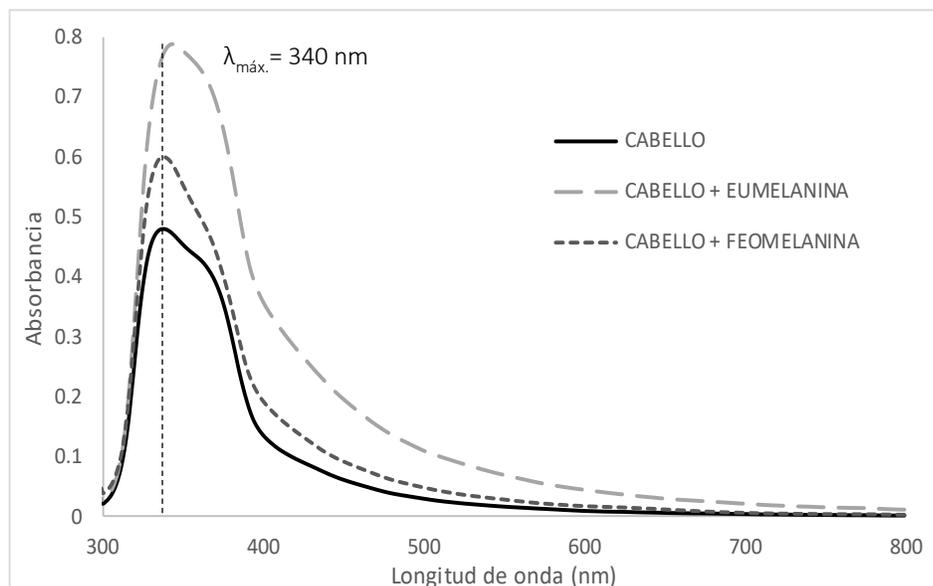


Figura 35. Gráfica de los espectros obtenidos al adicionar un volumen conocido a la muestra de cabello.

Tabla 7. Resultados del porcentaje de recobro obtenido de cada melanina.

	Concentración en el cabello (mg/mL)	Concentración en la muestra fortificada (mg/mL)	Porcentaje de recobro (%)
Eumelanina	-0.2906	-0.1017	37.7.8%
Feomelanina	1.3976	1.5843	37.34%

Al realizar el cálculo del porcentaje del recobro de cada melanina, se observó que el valor obtenido para ambas melaninas se encuentra muy por debajo de los límites establecidos en la guía CCAYAC-P-058, cuyo intervalo de aceptación se encuentra entre 85 y 110 %.

Cuantificación por adición estándar.

Después, se decidió realizar el método de adición estándar para realizar la cuantificación de las melaninas del cabello, el cual consiste en medir la intensidad de la solución con cantidades variables de estándar (patrón añadido).

El método de adiciones estándar es un método de análisis cuantitativo, que se utiliza cuando la muestra de interés tiene varios componentes que resultan en efectos de matriz, donde los componentes adicionales pueden reducir o aumentar la señal de absorbancia del analito. Cuando se ha hecho un análisis sin considerar el efecto matriz, se puede caer en errores significativos en los resultados del análisis.

Las adiciones estándar se usan para eliminar efectos de matriz de una medición, pues se asume que la matriz afecta a todas las soluciones por igual. Además, se utiliza para corregir efectos químicos, realizadas en el proceso de extracción.

El método se realiza mediante la lectura de la absorbancia experimental de la solución muestra y luego midiendo la intensidad de absorbancia de la muestra con cantidades variables de estándar conocido añadido. Los datos se trazan como absorbancia versus la cantidad del estándar añadido. Se calcula la línea de tendencia a través de mínimos cuadrados, y se calcula el valor de la intersección con el eje x en el negativo de la concentración de la muestra. Este valor corresponde a la concentración de la melanina en la muestra añadida a cada punto de la curva.

Para realizar la cuantificación, primero se preparó cada uno de los puntos de la curva de adición estándar; se pesaron para cada punto 10 mg de cabello de la muestra 4, se maceró en 800 μ L de Solueno® para disminuir el tamaño de partícula del cabello. Todo el contenido de cada uno de los extractos se colocó por separado en tubos eppendorf, realizando la adición del estándar de la melanina. Los tubos se prepararon según lo reportado en la Tabla 8 para eumelanina y Tabla 9 para feomelanina utilizando una solución estándar de 10 mg/mL.

<i>Tabla 8. Curva de calibración con estándar adicionado para la eumelanina.</i>		
Alícuota tomada de solución estándar de eumelanina de concentración 10.3 mg/mL (μL)	Volumen de aforo (μL)	Concentración final (mg/mL)
40	900	0.43
50	900	0.56
60	900	0.67
70	900	0.78
80	900	0.89

<i>Tabla 9. Curva de calibración con estándar adicionado para la feomelanina.</i>		
Alícuota tomada de solución estándar de feomelanina de concentración 10 mg/mL (μL)	Volumen de aforo (μL)	Concentración final (mg/mL)
30	900	0.34
40	900	0.40
50	900	0.57
60	900	0.69
70	900	0.80
80	900	0.92

Todas las muestras se agitaron para homogeneizar la solución y posteriormente se añadieron 100 μ L de agua destilada; se calentaron a 70°C por 4 horas, con agitación y el sistema abierto. Se dejaron enfriar por 3 horas a temperatura ambiente y se centrifugaron por 20 minutos a 12,500 rpm. Se registraron los espectros UV-vis en un barrido de 200 a 800 nm.

I. Curva de calibración.

Para llevar a cabo la cuantificación por el método de adición patrón se seleccionó la longitud de onda de 520 nm para la eumelanina y 534 nm para la feomelanina. En estas longitudes de onda se obtuvo una respuesta lineal en la absorbancia con respecto al incremento de la concentración y es posible llevar a

cabo la cuantificación. Se construyeron las curvas de calibración para cada una de las melaninas a la longitud de onda seleccionada (Figura 36 y Figura 37).

- Eumelanina

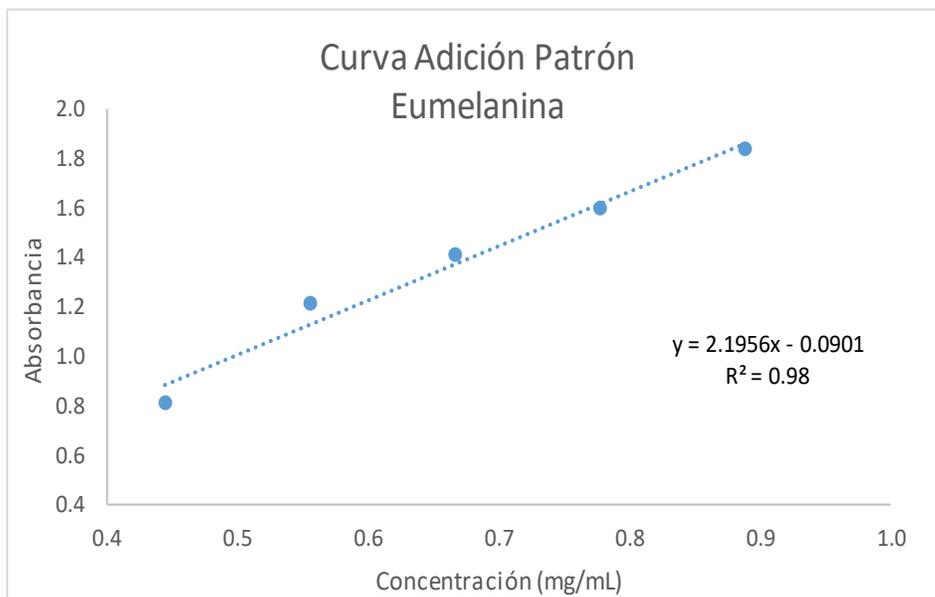


Figura 36. Gráfica de la absorbancia vs la concentración de la eumelanina en curva de adición patrón a 520 nm sobre la muestra 4.

- Feomelanina

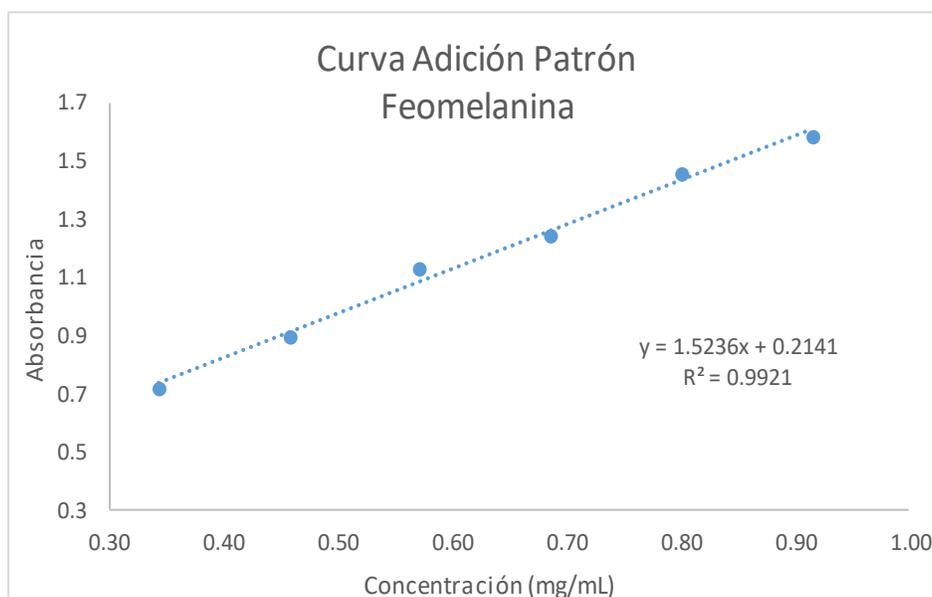


Figura 37. Gráfica de la absorbanza vs la concentración de la feomelanina en curva de adición patrón a 534 nm sobre la muestra 4.

Luego de realizar las diferentes curvas de adición estándar (Figura 36 y Figura 37), se realizó el cálculo de la concentración de las melaninas en la muestra de cabello analizada, determinado así la cantidad de las melaninas en el cabello de la muestra 4 .

	Concentración en el cabello (mg/mL)
Eumelanina	0.0410
Feomelanina	- 0.1405

II. Recobro

Se realizó el proceso de extracción y el barrido en el espectrofotómetro en las curvas de adición estándar. Posteriormente, se registró el espectro de una muestra adicionada con 0.5 mg/mL de cada melanina.

Se registraron las absorbancias a la longitud de onda elegida para cada una de las melaninas (520 nm para la eumelanina y 534 para la feomelanina); se calculó la concentración de cada melanina (Tabla 10), y finalmente se calculó el porcentaje de recobro de cada melanina (Apéndice 0b).

<i>Tabla 10. Resultados del porcentaje de recobro obtenido de cada melanina por adición estándar.</i>			
	Concentración en el cabello (mg/mL)	Cantidad de melanina por gramo de cabello (mg/g)	Porcentaje de recobro (%)
Eumelanina	0.0410	3.69	83.82%
Feomelanina	0.1405	12.64	73.76%

Al realizar el cálculo del porcentaje del recobro de cada melanina, se observó que los valores obtenidos se encuentran por debajo de los límites establecidos en la guía CCAYAC-P-058, cuyo intervalo de aceptación se encuentra entre 85 y 110 % (CCAYAC, 2011).

Resulta indispensable realizar un análisis completo para garantizar la validez del método, pero dado que esto excede los alcances del presente trabajo, debe ser tema de otro estudio.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

La melanina es una sustancia de interés forense debido a que, al ser la responsable de la pigmentación humana, la cuantificación de este pigmento permitirá estimar la coloración del cabello de una persona de una manera objetiva. En el presente trabajo se establecen las bases de un método de análisis químico que permite calcular la proporción de las melaninas del cabello por espectrofotometría ultravioleta.

Se logró el desarrollo y optimización de un método de síntesis para cada una de las melaninas, al controlar las variables de tiempo y temperatura durante el proceso de síntesis.

Al buscar un estándar comercial para llevar a cabo el desarrollo del método, se encontró que la marca Sigma-Aldrich comercializa una mezcla de ambas melaninas, que no resulta útil para ser usado en este trabajo, toda vez que lo que se pretende es la cuantificación de cada melanina. Para la síntesis se tomó como base el método reportado por Ozeki *y cols.* (1996). Este método fue modificado, para obtener productos de síntesis de forma aislada; Ozeki *y cols.* no logran aislar las melaninas, pues al final de sus síntesis tiene en solución a ambas melaninas. Realiza una modificación en la cantidad de cisteína que adiciona para encontrar las condiciones que favorezcan la formación de la feomelanina. A diferencia de lo reportado por Ozeki, para la síntesis de la feomelanina, en la síntesis propuesta, se incrementó la cantidad de cisteína presente en el medio de reacción, para garantizar que el equilibrio se desplazará hacia la formación feomelanina, y así obtenerla en una proporción mayoritaria. Otra de las diferencias con respecto al método propuesto por Ozeki se presenta en el tiempo y temperatura de incubación para la síntesis de feomelanina. Para favorecer la formación de la feomelanina, la mezcla de reacción se incubó por una semana a 4°C, con esta temperatura disminuimos la velocidad de reacción y favorecemos la formación de la melanina roja, que es perceptible en la aparición paulatina de la coloración en la mezcla de reacción conforme transcurre el tiempo de síntesis.

Además, a diferencia de lo reportado por los autores, en donde dejaban en suspensión la melanina (Ozeki y cols., 1996), para la síntesis que se propone en este trabajo, ambas melaninas son precipitadas al adicionar ácido acético a la mezcla de reacción, el precipitado obtenido se secó a flujo de nitrógeno, para que, a partir del precipitado, fuera posible preparar soluciones de cada melanina con una concentración conocida. Los precipitados que fueron sintetizados mostraron una coloración característica para cada melanina, siendo color café muy intenso, (a simple vista se puede observar incluso un precipitado de color negro) para el caso de la eumelanina y rojiza para el caso de la feomelanina, lo que corresponde con lo que se encuentra descrito en la literatura [Ito y Wakamatsu (2011); Riesz, (2007) Porstmann y Kiessig (1992); Xiao-Peng (2012)] y que permite establecer en la síntesis se logran obtener las melaninas de forma aislada.

Para lograr caracterizar los productos de reacción se decidió hacer uso de técnicas espectroscópicas y de las propiedades de los productos. Se registraron los espectros de IR, UV y se estudió la solubilidad de los productos de reacción.

Los espectros de IR de los productos de las síntesis presentan bandas características de los grupos funcionales presentes en cada melanina y coinciden con los valores reportados en la literatura. En el espectro de feomelanina sintetizada, se observan las bandas en 1139.07 cm^{-1} y 1253 cm^{-1} derivado de la presencia del grupo sulfónico (S-O) característico de la cisteína, y que no se observaron en el espectro de la eumelanina.

Las bandas de absorción en la región del infrarrojo no tienen valores idénticos a los reportados en la literatura y presentados en la sección de resultados de este trabajo (Figura 18), pues se trata de melaninas naturales. Estas diferencias son atribuidas a que el proceso de polimerización es distinto en melaninas sintéticas obtenidas en este trabajo que en melaninas naturales. Además, en los espectros de las melaninas naturales existe la presencia de restos proteicos presentes en el cabello, como el colágeno, fibrina, queratina o elastina (Nezirević, 2009; Wennig, 2000), cuyas bandas características se adicionan en el espectro a las bandas de la

melanina natural, resultando en un espectro de IR complicado y no superponible al 100% con las melaninas sintetizadas por medio de la tirosinasa.

Para el caso de los espectros UV, existe semejanza con los valores de absorbancia de los espectros reportados en la literatura por Gonçalves (Gonçalves y cols., 2012), con aquellos obtenidos de los compuestos sintetizados. Al presentar máximos de absorción iguales se puede establecer la presencia de grupos cromóforos que absorben en la misma longitud de onda. Así mismo, presentan absorción en todo el espectro visible, siendo esta una característica de las melaninas (Bell y Wheeler, 1986).

La insolubilidad que presentan ambos compuestos en medios ácidos y disolventes orgánicos, y su solubilidad en medios alcalinos, como el Solueno®, nos permite conocer las propiedades de los compuestos sintetizados y los cuales muestran semejanza con lo reportado en la literatura para este tipo de compuestos (Gonçalves y cols., 2012; Lea, 1952; Lawrie y cols., 2008).

A partir de todos los resultados mostrados en la caracterización de los precipitados, se tienen elementos suficientes para establecer que los productos de síntesis corresponden a la eumelanina y feomelanina, aunque no se tenga la certeza de la pureza de cada uno, fue posible establecer que los productos de la síntesis corresponden a las melaninas.

Este trabajo optimizó el método de síntesis de melaninas de forma independiente, así como su extracción, y sienta las bases para la posterior validación del método de cuantificación, mismo que pueda ser empleado en futuros trabajos para llevar a cabo la cuantificación por espectrofotometría ultravioleta de las melaninas.

En lo que respecta a la extracción de las melaninas del cabello, se empleó Solueno® como disolvente extractante. El Solueno® es una base orgánica fuerte, que tiene una excelente capacidad para la solubilización de tejidos, proteínas, nucleótidos, material vegetal y otras sustancias en solución. Solueno® es el nombre comercial de Perkin-Elmer para un producto formulado con tolueno, metanol,

hidróxido de amonio, metacrilato y cloruro de metiltrioctilamonio (ver Apéndice 4). Es así como aprovechamos sus características básicas para realizar la extracción y mantener en solución a las melaninas. En este punto resulta indispensable resaltar que, durante la extracción de las melaninas, en el momento de la incubación, el sistema se debe mantenerse abierto, ya que de esta manera se favorece la evaporación del metanol y la polimerización de los componentes del Solueno®, pues con el aumento de la temperatura se logra la separación de dos fases, en la fase superior se extraen las melaninas. Este procedimiento no se encuentra claramente descrito en la bibliografía consultada (Ozeki y *co/s.*, 1996).

Para cuantificar la melanina, se propusieron dos métodos diferentes a los existentes, ya que se consideró que los reportados, realizaban la cuantificación a partir de los productos de degradación (Borges y *co/s.*, 2001) o estiman únicamente las proporciones de las melaninas en el cabello (Ozeki y *co/s.*, 1996), sin hacer una cuantificación más precisa de cada una. Por otra parte, en el caso de los métodos espectrofotométricos, no se considera la interferencia que pueden generar los grupos proteicos presentes en el cabello que se extraen al mismo tiempo que los analitos de la muestra.

Utilizando la Ley de Aditividad para cuantificar las melaninas del cabello, se obtuvieron resultados incongruentes que reflejan que este método es inadecuado para la cuantificación, pues estima concentraciones negativas de eumelanina, lo cual es un error. Estos resultados se adjudican a la presencia de componentes celulares fuertemente unidos al cabello, lo cual resulta el principal obstáculo para el aislamiento de melaninas de fuentes naturales. Existen reportes que mencionan que el tratamiento del cabello con bases fuertes a altas temperaturas causa la descomposición química del pigmento melanina y la proteína asociada (Liu y *co/s.*, 2013).

La existencia de interferencias en las muestras o una extracción ineficiente de los analitos de interés, producen un efecto, que provoca que la respuesta analítica, no sea únicamente debida al analito de interés, sino por uno o más componentes presentes en la muestra. Si un componente específico puede ser

identificado como causante de dicho efecto, entonces ese componente se le denomina interferencia (IUPAC, 2006). Cuando se realiza el análisis de una muestra, el efecto de la matriz es una de las desventajas más relevantes que el analista debe tomar en cuenta. El efecto matriz puede afectar significativamente el resultado de la medición, se presenta en prácticamente todas las técnicas instrumentales.

En el caso del método de cuantificación por Ley de Aditividad, a pesar de obtener una respuesta lineal, se obtuvieron ordenadas al origen muy altas, lo que indica que, pese a la ausencia del analito, existe una respuesta analítica que no se debe a las melaninas, es decir hay absorbancia en ausencia de las melaninas. Este indicador aunado a un porcentaje de recobro muy bajo, nos indica que existe un aumento en la respuesta analítica asociado al efecto matriz.

El efecto matriz se atribuye a diferentes causas; las condiciones del método analítico, las propiedades químicas de las melaninas, los componentes del cabello (la matriz), el proceso de extracción. Se estima que existen interferencias originadas a partir de las proteínas que se encuentran de forma natural en el cabello, que pueden ser factores que aumentan la señal analítica, es decir la absorbancia, ya que estas y sus productos de degradación presenta absorbancias en la misma zona donde absorben las melaninas.

Fue por esta razón por la cual se llevó a cabo el desarrollo de un segundo método para realizar la cuantificación que permitiera eliminar los efectos de la matriz.

Con el método de cuantificación por adición estándar a diferencia del método con la Ley de Aditividad se obtuvieron resultados que permitieron llevar a cabo la cuantificación de las melaninas eliminado el efecto matriz, ya que la extracción resultó más eficiente, obteniendo porcentajes de recobro más adecuados. Al realizar la extracción, el extracto de la muestra analizada presentaba una coloración rojiza, misma que se relaciona con las concentraciones calculadas de las melaninas, siendo alrededor de tres veces mayor para la feomelanina (12.64 mg) que para la eumelanina (3.69 mg) (Figura 38. Coloración del extracto de la muestra 4.).



Figura 38. Coloración del extracto de la muestra 4.

Sin embargo, a pesar de mostrar mejores resultados, solo se analizó una muestra de cabello, ya que este método tiene la desventaja de que requiere un mayor tiempo de preparación para construir la curva patrón, además de que necesita de una mayor cantidad de muestra porque es necesario adicionarla en cada uno de los puntos de la curva, ya que a diferencia del método con la Ley de Aditividad en donde se utilizan sólo 20 mg de cada muestra, con este se necesitan más de 60 mg.

En química analítica se utilizan principalmente tres técnicas de calibración, la curva analítica, el método de adición estándar o adición patrón y el método de estándar interno. En la técnica de la curva analítica, se preparan varias soluciones estándares que contienen concentraciones conocidas del analito. Dichas soluciones deben cubrir el intervalo de concentraciones de interés y presentar una tendencia lineal para que puedan ser utilizadas para calcular la concentración. Cuando no se logra un comportamiento lineal, se pueden variar los parámetros instrumentales para lograr linealidad en el método. En el análisis espectrofotométrico, no es posible cambiar la longitud de onda utilizada para obtenerlas ni suprimir interferencias físicas o químicas de la matriz de la muestra. Si estas interferencias no se pueden librar, es posible usar el método de adición estándar.

No es lo mismo hacer un análisis de una sustancia sola que dentro de una matriz. El efecto matriz representa un reto en el desarrollo de métodos analíticos. Al desarrollar un método de cuantificación se debe tomar en cuenta que la respuesta del instrumento debe ser una función lineal de la concentración del analito, en el intervalo de concentraciones.

El método de adición estándar desarrollado permite cuantificar de forma independiente cada melanina presente en la matriz, permitiendo conocer las proporciones de las melaninas como lo plantean Ozeki *y cols.* Sin embargo, es necesario llevar a cabo una adecuada validación de este método para poder aseverar que la presencia de una melanina respecto a la otra tiene relación con el cabello, aunque se observe que se respeta la relación mencionada por otros trabajos y autores.

Cabe hacer mención que, en la asignación del color de las muestras de cabello realizadas por los diferentes operadores, se observaron variaciones en cuanto al color que cada uno percibe, ya que una misma muestra al ser observada bajo diferentes condiciones, a simple vista y por medio de un microscopio estereoscópico, un mismo operador puede llegar a asignar diferentes colores. Razón por la cual resulta indispensable obtener valores cuantitativos para eliminar el sesgo o error hecho por las personas al intentar asignar el color a una muestra de cabello.

El color del cabello es resultado de la cantidad y proporción de las melaninas, que son los pigmentos naturales depositados en forma de gránulos en la médula del cabello. Estos pigmentos son sintetizados en los melanocitos foliculares en donde se diferencian en eumelaninas (color negro a café) y feomelaninas (color amarillo a rojizas). La determinación cuantitativa de las melaninas y su proporción permite tener una idea más precisa del color real, y por tanto contar con una determinación así podría mejorar la búsqueda de marcadores genéticos involucrados en la síntesis de melaninas que pudiesen contribuir a la predicción de forma más precisa del color del cabello. El método de adición estándar y la

cuantificación espectrofotométrica se perfila como una opción para lograrlo, los cuales deberán ser optimizados en futuros trabajos.

CONCLUSIONES

- Se diseñó y optimizó un método de síntesis para la eumelanina y feomelanina a partir de una reacción enzimática con tirosinasa.
- Los productos de síntesis fueron identificados de acuerdo con sus propiedades de solubilidad, sus características de absorción en el espectro UV-Vis y por medio de las señales en sus espectros de infrarrojo.
- Se logró hacer las modificaciones necesarias para la extracción de las melaninas del cabello con Solueno®, debiendo mantener el sistema abierto durante la incubación de las muestras para garantizar la separación de las fases.
- Con el método desarrollado se sentaron las bases para convertir una variable cualitativa en una cuantitativa al obtener las concentraciones de eumelanina y feomelanina presentes en una muestra de cabello mediante la cuantificación por espectrofotometría ultravioleta.
- El método desarrollado por Ley de Aditividades no permitió la cuantificación de las melaninas del cabello, obteniendo ordenadas al origen muy elevadas y porcentajes de recobro muy bajos, lo que muestra que los datos no son confiables.
- El método de adición estándar desarrollado ofrece mejores resultados para la cuantificación de las melaninas en muestras de cabello, presentando linealidad y porcentajes de recobro más adecuados, al eliminar el efecto matriz.
- Al aplicar el método desarrollado en una muestra de cabello, se dilucida que existe una relación entre la concentración de las melaninas (fenotipo químico) y el color del cabello (fenotipo visual), misma que debe ser perfeccionada para su correcta aplicación.

PERSPECTIVAS

Este trabajo sienta las bases para continuar con el desarrollo del método de cuantificación por espectrofotometría ultravioleta de las melaninas, siendo un siguiente paso la validación del método de cuantificación, determinando los límites de identificación y cuantificación, repetibilidad, reproducibilidad entre otros parámetros.

Así mismo, se requiere realizar más pruebas de caracterización de los productos de síntesis como, por ejemplo: un análisis elemental, resonancia magnética, entre otros; para garantizar su completa caracterización y pureza, asegurando la ausencia subproductos de síntesis.

Finalmente, es necesario aplicar el método de adición estándar a una mayor cantidad de muestras de cabello de distintas características para conocer si existe una correlación entre el fenotipo visual (color del cabello) con el químico (concentración de melanina).

BIBLIOGRAFÍA

- Alaluf, S., Heath, A., Carter, N. I. K., Atkins, D., Mahalingam, H., Barrett, K., ... Smit, N. (2001). Variation in melanin content and composition in type V and VI photoexposed and photoprotected human skin: The dominant role of DHI. *Pigment Cell Research*, 14(5), 337–347.
- Bell, A. A., y Wheeler, M. H. (1986). Biosynthesis and Functions of Fungal Melanins. *Annual Review of Phytopathology*, 24(1), 411–451.
- Bilińska, B. (2001). On the structure of human hair melanins from an infrared spectroscopy analysis of their interactions with Cu²⁺ ions. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 57, 2525–2533.
- Borges, C. R., Roberts, J. C., Wilkins, D. G., y Rollins, D. E. (2001). Relationship of melanin degradation products to actual melanin content: Application to human hair. *Analytical Biochemistry*, 290(1), 116–125.
- Borovanský, J. (1978). Quantitative determination of melanin. *Mikrochimica Acta*, 70(5–6), 423–429.
- Comisión de control analítico y ampliación de cobertura. (2011). Criterios de Validación de Métodos Físicoquímicos “CCAYAP-P-058.” México.
- D’Ischia, M., Wakamatsu, K., Napolitano, A., Briganti, S., Garcia-Borron, J. C., Kovacs, D., ... Ito, S. (2013). Melanins and melanogenesis: Methods, standards, protocols. *Pigment Cell and Melanoma Research*, 26(5), 616–633.
- Gonçalves, R., Lisboa, H., y Pombeiro-Sponchiado, S. R. (2012). Characterization of melanin pigment produced by *Aspergillus nidulans*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1467–1474.
- Greco, G., Wakamatsu, K., Panzella, L., Ito, S., Napolitano, A., y D’Ischia, M. (2009). Isomeric cysteinyl dopas provide a (photo)degradable bulk component and a robust structural element in red human hair pheomelanin. *Pigment Cell and Melanoma Research*, 22(3), 319–327.

- Harris, D. (2006). *Análisis químico cuantitativo* (3rd ed.). Reverté.
- Ito, S., y Prota, G. (1977). A facile one-step synthesis of cysteinyl dopas using mushroom tyrosinase. *Experientia*, 33(8), 1118–1119.
- Ito, S., y Wakamatsu, K. (2011). Diversity of human hair pigmentation as studied by chemical analysis of eumelanin and pheomelanin. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 25(12), 1369–1380.
- Ito, Shosuke. (1989). Optimization of Conditions for Preparing Synthetic Pheomelanin. *Pigment Cell Research*, 2, 53–56.
- Ito, Shosuke, Nakanishi, Y., Valenzuela, R. K., Brilliant, M. H., Kolbe, L. y Wakamatsu, K. (2011). Usefulness of alkaline hydrogen peroxide oxidation to analyze eumelanin and pheomelanin in various tissue samples: Application to chemical analysis of human hair melanins. *Pigment Cell and Melanoma Research*, 24(4), 605–613.
- Ito, Shosuke, y Wakamatsu, K. (2003). Quantitative Analysis of Eumelanin and Pheomelanin in Humans, Mice, and Other Animals: a Comparative Review. *Pigment Cell and Melanoma Research*, 16, 523–531.
- IUPAC. (2006). *Compendium of Chemical Terminology*. (Williamson y McNaught, Ed.), Blackwell Scientific Publications (2^a ed.). Oxford.
- Katsara, M. y Nothnagel, M. (2019). True colors: A literature review on the spatial distribution of eye and hair pigmentation. *Forensic Science International: Genetics*, 39, 109–118.
- Kayser, M. (2015). Forensic DNA Phenotyping: Predicting human appearance from crime scene material for investigative purposes. *Forensic Science International: Genetics*, 18, 33–48.
- Kayser, M., Sijen, T., Breslin, K., Kukla-Bartoszek, M., Branicki, W., Pośpiech, E., ... Liu, F. (2018). *The HirisPlex-S system for eye, hair and skin colour prediction from DNA: Introduction and forensic developmental validation*. *Forensic Science International: Genetics* (Vol. 35). Elsevier Ireland Ltd.

- Lawrie, K. J., Meredith, P. y McGeary, R. P. (2008). Synthesis and Polymerization Studies of Organic-Soluble Eumelanins. *Photochemistry and Photobiology*, 84(3), 632–638.
- Lea, A. J. (1952). Solubility of Melanins. *Nature*, 170(4330), 709–709.
- Liu, F., Wen, B., y Kayser, M. (2013). Colorful DNA polymorphisms in humans. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 24(6–7), 562–575.
- Liu, Y., Kempf, V. R., Nofsinger, J. B., Weinert, E. E., Rudnicki, M., Wakamatsu, K., ... Simon, J. D. (2003). Comparison of the Structural and Physical Properties of Human Hair Eumelanin Following Enzymatic or Acid / Base Extraction. *Pigment Cell Research*, 16, 355–365.
- McMullen, R. L., Chen, S., y Moore, D. J. (2012). Fluorescencia de los Tejidos Queratinosos. *International Journal of Morphology*, 30(3), 956–963.
- Mengel-From, J., Wong, T. H., Morling, N., Rees, J. L., y Jackson, I. J. (2009). Genetic determinants of hair and eye colours in the Scottish and Danish populations. *BMC Genetics*, 10, 1–13.
- Nezirević Dernroth, D. (2009). *Pheomelanin markers in melanoma with reference to their excretion into urine*. SWeden: Linköping University. Faculty of Health Sciences.
- Ortonne, J. P., y Prota, G. (1993). Hair melanins and hair color: Ultrastructural and biochemical aspects. *Journal of Investigative Dermatology*, 101(1 SUPPL.).
- Owen, T. (1996). *Fundamentals of UV-Visible Spectroscopy* (15a ed.). Alemania: Hewlett-Packard Company.
- Ozeki, H., Ito, S., Wakamatsu, K. y Hirobe, T. (1995). Chemical characterization of hair melanins in various coat-color mutants of mice. *Journal of Investigative Dermatology*, 105(3), 361–366.
- Ozeki, Hiroyuki, Ito, S., Wakamatsu, K., y Thody, A. J. (1996). Spectrophotometric characterization of eumelanin and pheomelanin in hair. *Pigment Cell Research*,

9(5), 265–270.

- Panhard, S., Lozano, I., & Loussouarn, G. (2012). Greying of the human hair: a worldwide survey, revisiting the '50' rule of thumb. *British Journal of Dermatology*, 167(4), 865–873.
- Parabon® Snapshot® DNA Analysis Service. (2019). Consultado el 8 Junio 2019, from <https://snapshot.parabon-nanolabs.com/>
- Parra, E. J. (2007). Human pigmentation variation: Evolution, genetic basis, and implications for public health. *Yearbook of Physical Anthropology*, 50, 85–105.
- Perna, G., Palazzo, G., Mallardi, A., y Capozzi, V. (2011). Fluorescence properties of natural eumelanin biopolymer. *Journal of Luminescence*, 131, 1584–1588.
- Porstmann, T., y Kiessig, S. T. (1992). Enzyme immunoassay techniques an overview. *Journal of Immunological Methods*.
- Riesz, J. (2007). The spectroscopic properties of melanin. *Tese (Doutorado) - University of Queensland*, (November), 1–239.
- Riley, P. A. (1997). Melanin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 29(11), 1235–1239.
- Samuel, G., y Prainsack, B. (2018). Forensic DNA phenotyping in Europe: views “on the ground” from those who have a professional stake in the technology. *New Genetics and Society*, 6778.
- Sawhney, S. S. (1994). Thermal stability of melanin. *Thermochimica Acta.*, 247, 377–380.
- Skoog, D. A., y West, D. M. (1976). *Fundamentals of analytical chemistry* (Ninth). London: Cengage Learning.
- Skoog, Douglas A., Holler, F. J., y Crouch, S. R. (2018). *Principles of instrumental analysis* (7a ed.). Cengage Learning.
- Söchtig, J., Phillips, C., Maroñas, O., Gómez-Tato, A., Cruz, R., Alvarez-Dios, J., ... Lareu, M. V. (2015). Exploration of SNP variants affecting hair colour prediction

- in Europeans. *International Journal of Legal Medicine*, 129(5), 963–975.
- Stanic, V., Carlos, F., Maia, B., De, R., Freitas, O., Montoro, F. E., y Evans-Lutterodt, K. (2018). The chemical fingerprint of hair melanosomes by infrared nano-spectroscopy †. *Nanoscale*, 10, 14245.
- Sulem, P., Gudbjartsson, D. F., Stacey, S. N., Helgason, A., Rafnar, T., Magnusson, K. P., ... Stefansson, K. (2007). Genetic determinants of hair, eye and skin pigmentation in Europeans. *Nature Genetics*, 39(12), 1443–1452.
- Tang, J., Zeng, F., Savage, H., Ho, P. P., y Alfano, R. R. (2000). Fluorescence spectroscopic imaging to detect changes in collagen and elastin following laser tissue welding. *Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery*, 18(1), 3–8.
- Tistarelli, M., y Champod, C. (Eds.). (2017). *Handbook of Biometrics for Forensic Science*. Cham: Springer International Publishing.
- Tsukamoto, K., Jackson, I. J., Urabe, K., Montague, P. M., y Hearing, V. J. (1992). A second tyrosinase-related protein, TRP-2, is a melanogenic enzyme termed DOPAchrome tautomerase. *The EMBO Journal*, 11(2), 519–526.
- Urán, M. E., y Cano, L. E. (2008). Melanina: implicaciones en la patogénesis de algunas enfermedades y su capacidad de evadir la respuesta inmune del hospedero. *Asociación Colombiana de Infectología*, 12(2), 357–377.
- Wakamatsu, K., Nakanishi, Y., Miyazaki, N., Kolbe, L., y Ito, S. (2012). UVA-induced oxidative degradation of melanins: Fission of indole moiety in eumelanin and conversion to benzothiazole moiety in pheomelanin. *Pigment Cell and Melanoma Research*, 25(4), 434–445.
- Watanabe, T., Tamura, A., Yoshimura, Y., y Nakazawa, H. (1997). Determination of melanin in human hair by photoacoustic spectroscopy. *Analytical Biochemistry*, 254(2), 267–271.
- Wennig, R. (2000). Potential problems with the interpretation of hair analysis results. *Forensic Science International*, 107, 5–12.

Xiao-Peng Ma. (2012). *Melanin. Biosynthesis, Functions and Health Effects*. (X.-X. S. Xiao-Peng Ma, Ed.). New York: Nova Science Publishers Inc.

Zonios, G., Dimou, A., Bassukas, I., Galaris, D., Tsolakidis, A., y Kaxiras, E. (2008). Melanin absorption spectroscopy: new method for noninvasive skin investigation and melanoma detection. *Journal of Biomedical Optics*, 13(1), 014017.

APÉNDICES

Tabla 11. Resultados de la asignación del color a partir de fotografías (figura 32) de las diferentes muestras de cabello hecha por los diferentes operadores.

Muestra	Op. 1	Op. 2	Op. 3	Op. 4	Op. 5	Op.6	Op. 7	Op. 8	Op. 9	Op. 10	Op.11
1.	Cana	Cana	Cana	Cana	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Cana	Cana
2.	Café oscuro	Negro	Negro	Negro	Negro	Negro	Negro	Negro	Negro	Negro	Negro
3.	Café oscuro	Negro	Negro	Negro	Negro	Negro	Negro	Negro	Castaño	Negro	Negro
4.	Café claro	Café oscuro	Café	Castaño	Negro	Negro	Café	Café	Castaño	Castaño	Negro
5.	Castaño	Café	Café	Castaño	Negro	Café	Negro	Café	Castaño	Rubio	Castaño
6.	Castaño	Café	Café	Castaño	Café	Café	Café	Rubio	Rubio	Castaño	Rojo
7.	Rubio	Rubio	Rubio	Rubio	Rubio	Rubio	Rubio	Rubio	Rubio	Rubio	Cana
8.	Rubio	Rojo	Rubio	Rubio	Rubio	Rojo	Rubio	Rubio	Rubio	Rubio	Rojo
9.	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo
10.	Rojo	Café claro	Rojo	Rojo	Café	Rojo	Café	Rojo	Rojo	Rojo	Castaño

<i>Tabla 12. Tabla de frecuencias de los colores asignados a cada muestra de cabello a partir de una fotografía.</i>						
Muestra	Blanco	Negro	Café/Castaño	Rubio	Rojo	Porcentaje
1.	11/11					100% cana
2.		10/11	1/11			90% negro
3.		9/11	2/11			81% negro
4.		3/11	8/11			72% café
5.		2/11	8/11	1/11		72% café
6.			8/11	2/11	1/11	72% café
7.	1/11			10/11		90% rubio
8.				8/11	3/11	72% rubio
9.					11/11	100% rojo
10.			4/11		7/11	63% rojo

Tabla 13. Resultados de la asignación del color a través de un microscopio estereoscópico de las diferentes muestras de cabello hecha por los diferentes operadores.

Muestra	Op. 1	Op. 2	Op. 3	Op. 4	Op. 5	Op.6	Op. 7	Op. 8	Op. 9	Op. 10	Op.11
1.	Cana	Cana	Cana	Cana	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Cana	Cana
2.	Café oscuro	Negro	Café	Castaño	Café	Café	Café	Café	Castaño	Castaño	Café
3.	Café oscuro	Negro	Negro	Negro	Negro	Negro	Negro	Negro	Negro	Negro	Negro
4.	Café claro	Café	Negro	Negro	Negro	Negro	Negro	Negro	Negro	Negro	Negro
5.	Castaño	Café	Negro	Castaño	Negro	Negro	Café	Negro	Castaño	Castaño	Negro
6.	Castaño	Castaño	Rubio	Castaño	Café	Café	Café	Café	Rubio	Rojo	Rubio
7.	Rubio	Rubio	Rubio	Rubio	Rubio	Rubio	Rubio	Rubio	Blanco	Rubio	Rubio
8.	Rubio	Rubio	Rubio	Rubio	Rubio	Rubio	Rubio	Café	Rubio	Rubio	Rubio
9.	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Café	Café	Rojo	Café	Rojo	Castaño	Rojo
10.	Rojo	Café claro	Rojo	Rojo	Café	Rojo	Rojo	Café	Rojo	Rojo	Rojo

<i>Tabla 14. Tabla de frecuencias de los colores asignados a cada muestra de cabello a través de un microscopio estereoscópico.</i>						
Muestra	Blanco	Negro	Café/Castaño	Rubio	Rojo	Porcentaje
1.	11/11					100% cana
2.		1/11	10/11			90% café
3.		10/11	1/11			90% negro
4.		9/11	2/11			81% negro
5.		5/11	6/11			54% café
6.			7/11	3/11	1/11	63% café
7.	2/11			9/11		81% rubio
8.	1/11		1/11	9/11		81% rubio
9.			4/11		7/11	63% rojo
10.			3/11		8/11	72% rojo

2. Cálculo de la concentración de melaninas.

a. Ley de Aditividad

$$A = \alpha \ell C$$

$$A_{(E+F)360} = \alpha_{E360} \ell C_E + \alpha_{F360} \ell C_F$$

$$A_{(E+F)700} = \alpha_{E700} \ell C_E + \alpha_{F700} \ell C_F$$

Sabiendo que $\alpha = m$ (pendiente de las curvas de calibración):

	EUMELANINA	FEOMELANINA
m ₃₆₀	1.7395	0.6694
m ₇₀₀	0.0869	0.0199

Se sustituyen los valores de α en las ecuaciones, ($\ell = 1$):

$$\textbf{Ecuación 1} \rightarrow A_{360} = 1.7395 \cdot C_E + 0.6694 \cdot C_F$$

$$\textbf{Ecuación 2} \rightarrow A_{700} = 0.0869 \cdot C_E + 0.0199 \cdot C_F$$

Despejando C_E de la ecuación 2:

$$\textbf{Ecuación 3} \rightarrow C_E = \frac{A_{700} - 0.0199 \cdot C_F}{0.0869}$$

Sustituyendo la ecuación 3 en la ecuación 1:

$$A_{360} = 1.7395 \cdot C_E + 0.6694 \cdot C_F$$

$$A_{360} = 1.7395 \left[\frac{A_{700} - 0.0199 \cdot C_F}{0.0869} \right] + 0.6694 \cdot C_F$$

$$A_{360} = \left[\frac{1.7395(A_{700})}{0.0869} \right] - \left[\frac{1.7395(0.0199 \cdot C_F)}{0.0869} \right] + 0.6694 \cdot C_F$$

$$A_{360} - \left[\frac{1.7395(A_{700})}{0.0869} \right] = - \left[\frac{1.7395(0.0199 \cdot C_F)}{0.0869} \right] + 0.6694 \cdot C_F$$

$$A_{360} - \left[\frac{1.7395(A_{700})}{0.0869} \right] = - \left[\frac{0.0346 C_F}{0.0869} \right] + 0.6694 \cdot C_F$$

$$A_{360} - \left[\frac{1.7395(A_{700})}{0.0869} \right] = -0.3983 C_F + 0.6694 \cdot C_F$$

$$A_{360} - \left[\frac{1.7395(A_{700})}{0.0869} \right] = 0.2710 \cdot C_F$$

$$C_F = \frac{A_{360} - \left[\frac{1.7395(A_{700})}{0.0869} \right]}{0.2710}$$

$$C_F = \frac{A_{360} - [20.0172(A_{700})]}{0.2710}$$

$$C_F = 3.69(A_{360}) - 73.8644(A_{700})$$

Al obtener el valor de C_F , se despeja C_E en la ecuación 1.

$$C_E = \frac{A_{360} - 0.6694 \cdot C_F}{1.7395}$$

$$C_E = 0.5748(A_{360}) - 0.3848(C_F)$$

Al aplicar las ecuaciones a una de las muestras de cabello se tendría:

Muestra d)	
A ₃₆₀	0.7673
A ₇₀₀	0.0035

$$C_F = 3.69(0.7673) - 73.8644(0.0035)$$

$$C_F = 2.8313 - 0.2585 = \mathbf{2.5728 \text{ mg/mL} \rightarrow \textit{Feomelanina}}$$

$$C_E = 0.5748(0.7673) - 0.3848(2.5717)$$

$$C_E = 0.4410 - 0.9895 = \mathbf{-0.5485 \text{ mg/mL} \rightarrow \textit{Eumelanina}}$$

b. Método de adición estándar.

$$y = mx + b$$

Con la ecuación de la curva, se iguala a cero el valor de y, obteniendo el valor absoluto de x, se establece la concentración de las melaninas en la muestra adicionada.

$$x = \frac{b}{m}$$

Para la muestra 4 se tiene:

$$y = 2.1956x - 0.0901$$

$$x = \frac{0.0901}{2.1956} = \mathbf{0.0410 \text{ mg/mL} \rightarrow \textit{Feomelanina}}$$

$$y = 1.5236x + 0.2141$$

$$x = \frac{0.2141}{1.5236} = \mathbf{0.1405 \text{ mg/mL} \rightarrow \textit{Eumelanina}}$$

Haciendo la relación de la concentración en función de la cantidad de muestra utilizada para llevar a cabo la cuantificación se estable la cantidad de melanina por gramo de cabello.

	Concentración en el cabello (mg/mL)	Volumen de aforo (mL)	Cantidad de melanina por gramo de cabello (mg/g)
Eumelanina	0.0303	0.9	3.69
Feomelanina	0.1405	0.9	12.64

3. Cálculos del porcentaje de recobro de las melaninas.

$$\%R = \frac{y - x_i}{x_a} \times 100$$

Donde:

y = Concentración de la muestra más el patrón añadido

x_i = Concentración inicial de la muestra

x_a = Concentración del patrón añadido

a. Ley de Aditividades

	Concentración en el cabello (mg/mL)	Concentración en la muestra fortificada (mg/mL)
Eumelanina	-0.2906	-0.1017
Feomelanina	1.3976	1.5843

Sabiendo que $x_a = 0.5\text{mg/mL}$, se sustituyen los valores:

$$\%R_{Eumelanina} = \frac{-0.2906 - (-0.1017)}{0.5} \times 100$$

$$R_{Eumelanina} = 37.78 \%$$

$$\%R_{Feomelanina} = \frac{1.5843 - 1.3976}{0.5} \times 100$$

$$R_{Feomelanina} = 37.4 \%$$

b. Método de adición estándar.

	Concentración del patrón añadido (mg/mL)	Concentración de la muestra más el patrón añadido (mg/mL)
Eumelanina	0.0410	0.4601
Feomelanina	0.1405	0.5093

Sabiendo que $x_i = 0.5\text{mg/mL}$, se sustituyen los valores:

$$\%R_{Eumelanina} = \frac{0.4601 - 0.0410}{0.5} \times 100$$

$$R_{Eumelanina} = \mathbf{83.82\%}$$

$$\%R_{Feomelanina} = \frac{0.5093 - 0.1405}{0.5} \times 100$$

$$R_{Feomelanina} = \mathbf{73.76\%}$$

4. Ficha de datos de seguridad del Soluene®.

 PerkinElmer For the Better fecha de impresión 13.10.2015	Ficha de datos de seguridad según 1907/2006/CE, Artículo 31 Número de versión 3	página: 3/10 Revisión: 13.10.2015
Nombre comercial: Soluene-350		
P304+P340 EN CASO DE INHALACIÓN: Transportar a la persona al aire libre y mantenerla en una posición que le facilite la respiración. (se continua en página 2)		
<ul style="list-style-type: none"> · 2.3 Otros peligros · Resultados de la valoración PBT y mPmB · PBT: No aplicable. · mPmB: No aplicable. 		
SECCIÓN 3: Composición/información sobre los componentes		
<ul style="list-style-type: none"> · 3.2 Caracterización química: Mezclas · Descripción: Mezcla: compuesta de las siguientes sustancias. 		
<ul style="list-style-type: none"> · Componentes peligrosos: 		
CAS: 108-88-3 EINECS: 203-625-9	tolueno ----- ⚠ Flam. Liq. 2, H225 ⚠ Repr. 2, H361d; STOT RE 2, H373; Asp. Tox. 1, H304 ⚠ Skin Irrit. 2, H315; STOT SE 3, H336	40-60%
CAS: 94199-93-6 Número CE: 303-469-2	dodecyl(dimethyl)(tetradecyl)ammonium hydroxide ----- ⚠ Skin Corr. 1B, H314 ⚠ Aquatic Acute 1, H400; Aquatic Chronic 1, H410 ⚠ Acute Tox. 4, H302	20-40%
CAS: 5137-55-3 EINECS: 225-896-2	cloruro de metiltrioctilamonio ----- ⚠ Skin Corr. 1B, H314 ⚠ Aquatic Acute 1, H400; Aquatic Chronic 1, H410 ⚠ Acute Tox. 4, H302	2,5-10%
CAS: 67-56-1 EINECS: 200-659-6	metanol ----- ⚠ Flam. Liq. 2, H225 ⚠ Acute Tox. 3, H301; Acute Tox. 3, H331 ⚠ STOT SE 1, H370	2,5-10%
<ul style="list-style-type: none"> · Reglamento (CE) No 648/2004 sobre detergentes / Etiquetado del contenido 		
CAS: 7732-18-5 EINECS: 231-791-2	agua destilada, de conductividad o de igualgrado de pureza	2,5-10%
<ul style="list-style-type: none"> · Indicaciones adicionales: El texto de los posibles riesgos aquí indicados se puede consultar en el capítulo 16. 		

Ficha técnica completa:
[https://www.perkinelmer.com/Content/MSDSDatabase/MSDS_6003038_Soluene-350_\(ES\).pdf](https://www.perkinelmer.com/Content/MSDSDatabase/MSDS_6003038_Soluene-350_(ES).pdf)