

UNIVERSIDADE DE COIMBRA
INSTITUTO DE ANTROPOLOGIA

4.º do Ondara
668

JOSÉ ANTUNES SERRA

SEPARATA

Estudos sôbre a pigmentação melânica

178

Determinação da pigmentação
e escurecimento com a idade.
Composição das melaninas

Questões de método

III

(Publicação subsidiada pelo Instituto para a Alta Cultura)



COIMBRA

TIPOGRAFIA DA ATLANTIDA

1939

UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Estudo sobre a pigmentação mecânica

Determinação da pigmentação e sua distribuição com o tempo e composição das misturas

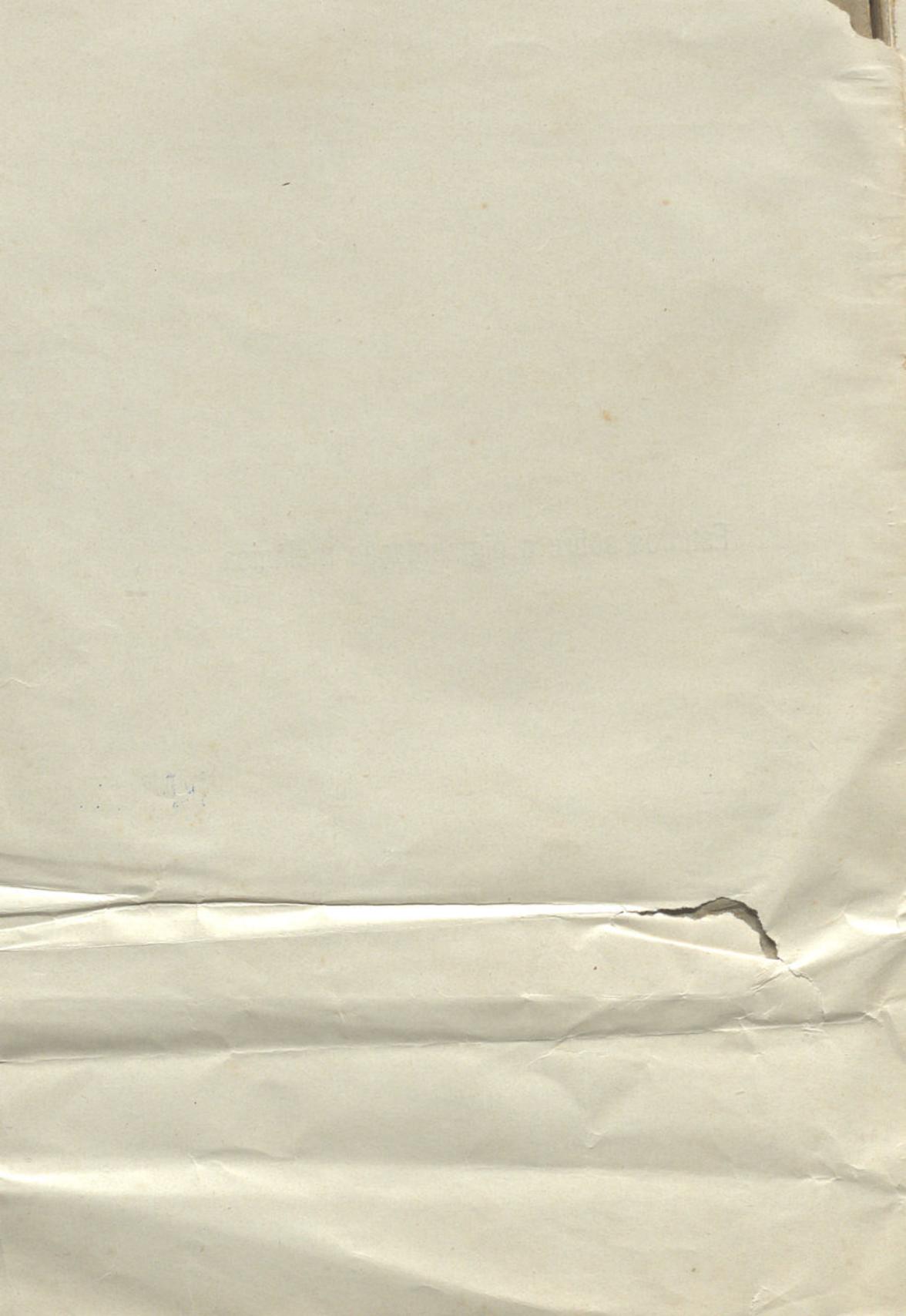
Questões de método

COIMBRA

IMPRESSÃO DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

1951

Estudos sôbre a pigmentação melânica



UNIVERSIDADE DE COIMBRA
INSTITUTO DE ANTROPOLOGIA

JOSÉ ANTUNES SERRA

Estudos sôbre a pigmentação melânica

Determinação da pigmentação
e escurecimento com a idade.
Composição das melaninas

Questões de método

III



CIENCIA VIVA
SILIO DE CARVALHO

RC
MVA
57
SER



SEPARATA

COIMBRA

TIPOGRAFIA DA ATLANTIDA

1939



UNIVERSIDADE DE COIMBRA
INSTITUTO DE ANTROPOLOGIA

JOSE ANTUNES FERREIRA

Estudos sobre a
pigmentação melânica

SEPARATA

DA

Revista da Faculdade de Ciências da Universidade de Coimbra

VOL. VII — N.º 2

Estudos sôbre a pigmentação melânica

Determinação da pigmentação e escurecimento com a idade. — Composição das melaninas

Sumário:

<i>Introdução.</i>	pág. 4
<i>A determinação da pigmentação.</i>	7
Determinações com o pigmentómetro.	12
<i>O escurecimento com a idade.</i>	42
A determinação do escurecimento com a idade.	47
Correlações — Compleição.	92
<i>Constituição química das melaninas.</i>	110
Composição e estrutura das proteínas.	121
Composição das melaninas.	132
Resultados obtidos.	135
<i>Discussão — Conclusões.</i>	159
<i>Bibliografia</i>	169

Esta comunicação é a primeira duma série de estudos sôbre a pigmentação. Como se verá, procurei resolver velhos problemas com novos métodos, alguns ainda não utilizados nestes casos — e os resultados obtidos, embora preliminares, parece demonstrarem que é possível esclarecer algumas questões fundamentais com os métodos usados.

Em certos aspectos do trabalho tive que recorrer a processos habituais à Química, pois naturalmente os problemas fisiológicos são, na base, problemas físicos e químicos, ou apenas como tais se podem actualmente conhecer.

Como fim essencial, estas investigações, cuja publicação agora

começa, visam o conhecimento da pigmentação melânica nos Mamíferos, incluindo o homem, para uma melhor compreensão e esclarecimento da sua hereditariedade e fenogénese.

O nome *pigmentação* é demasiado geral e ambíguo e indica um conjunto de origens e realizações muito diferentes. Duma maneira geral, chama-se pigmentos a substâncias coradas, difusas, ou em corpúsculos figurados, e que dão uma certa coloração ao meio em que existem. Evidentemente, nada há de mais geral e menos concreto do que uma definição destas.

Limitando-se aos *pigmentos animais*, pode-se, com SCHMIDT-MANN 1928 definir pigmentos como substâncias coradas existentes nas células e tecidos, sob a forma de grânulos. O pigmento é, portanto, caracterizado pela sua visibilidade ao microscópio. Ainda, podem dividir-se tais pigmentos em *exógenos* e *endógenos*, conforme são originados fora ou dentro do organismo. Dos *endógenos*, uns são *derivados hemoglobínicos* e caracterizam-se mais ou menos facilmente pela sua composição pirrólica (com núcleos do pirrol); outros são os chamados *pigmentos autóctones*. Como autóctones designam-se, principalmente, aqueles cuja origem não está esclarecida.

Entre os *autóctones* há-os derivados de proteínas, que são as *melaninas*, de cor acastanhada; outros, amarelados, derivados ou em relação com gorduras — *lipocromos*.

Um terceiro grupo de pigmentos autóctones abrange um conjunto de substâncias, de composição e relações muito incertas, que não se podem incluir em qualquer dos grupos anteriores.

Como se desconhece a composição química dos pigmentos autóctones, a sua classificação é necessariamente artificial.

De harmonia com o que se disse, o objecto destes estudos são os pigmentos melânicos nos Mamíferos, e começarei com o coelho e o homem. Ocupei-me mais detalhadamente do pigmento piloso, o mais fácil de atingir e separar das outras partes do corpo. Para os pigmentos da pele, sobretudo no homem, são recomendados alguns processos de extracção (v. por exemplo SCHMIDTMANN 1928) mas, dado o que hoje se sabe acêrca destes pigmentos, é de esperar que o produto final obtido seja muito diferente do pigmento que se desejava isolar. Para a pele são necessários outros métodos que terei ocasião de aplicar na continuação destes estudos. É, aliás, muito provável que os pigmentos melânicos da pele sejam, pelo menos em parte, idên-

ticos aos dos pêlos, de forma que tōda a contribuição para o esclarecimento de uns é também applicável aos outros.

Este trabalho foi efectuado principalmente no Laboratório Antropológico e no Laboratório Químico, da Universidade de Coimbra, e ainda no Museu Zoológico. Aos ex.^{mos} directores sr. Prof. Dr. Eusébio Tamagnini e Prof. sr. Dr. Couceiro da Costa, agradeço, reconhecido, as possibilidades de trabalho que me facultaram e favores de vária ordem.

Ao sr. Dr. Gouveia igualmente me confesso devedor de numerosas atenções, bem como ao Dr. Pinto Coelho e também ao sr. Dr. Viana de Lemos. Ao director do Laboratório de Análises Clínicas, sr. Dr. Ladeiro, agradeço as facilidades que me concedeu, além de incitamentos amistosos, de que compartilha também o sr. Dr. Temido.

Alguns amigos conseguiram amostras de cabelos e manifestaram de outras formas o seu amável interesse, como o sr. Reinas e a colega e amiga D. Sara Leitão de Mira.

Depois, ao pessoal do Laboratório de Antropologia, aos srs. J. D. Santos e Borges e ao pessoal do Laboratório Químico, particularmente aos srs. Coimbra, França e Ferreira — também não quero deixar de significar que me recorde dos muitos serviços prestados e os agradeço.

Por facilidades concedidas quando da determinação da pigmentação nos alunos de várias escolas, agradeço aos ex.^{mos}: Inspector Escolar, Reitor do Liceu D. João III, Reitora e Médica do Liceu Infanta D. Maria, vários Professores e Professoras das Escolas Primárias de Coimbra e ao Director e Professores do Colégio Portugal. Ao dr. Dâmaso sou também agradecido em relação ao mesmo assunto.

Finalmente, não podendo ser completo — para a realização dēste trabalho concorreram, de alguma maneira, muitas pessoas — limito-me, quanto às restantes, a um agradecimento global.

INTRODUÇÃO

O principal objecto de estudo para a pigmentação tem sido, sem dúvida, o homem. A classificação das várias raças repousa ainda e principalmente sobre caracteres pigmentares, embora se note tendência para enveredar pelo justo caminho da consideração do maior número de semelhanças e contrastes (v. BAUR-FISCHER-LENZ 1936). Por outro lado, nos restantes Mamíferos a cor é um carácter secundário para a taxonomia e só depois da redescoberta das leis de Mendel é que pode ser convenientemente estudada a sua hereditariedade, que tem levado a resultados brilhantes.

Entre os Mamíferos é no coelho que está melhor estudada a pigmentação sob o ponto de vista da sua hereditariedade e mesmo da fisiologia, havendo uma literatura numerosa, sobretudo de autores alemães e americanos. Os resultados de NACHTSHEIM e sua escola, de SCHULZ, ENGELMEIER, DANEEL e associados, e também os de CASTLE e associados, aclararam a hereditariedade e um pouco da fenogénese (esta apenas em coelhos «russos»), emquanto que a constituição e número de pigmentos ficaram por resolver, pois os métodos empregados são pouco próprios para estes últimos fins.

Na cobaia (CUÉNOT 1927, citando vários autores) também a hereditariedade da pigmentação está razoavelmente conhecida e em muitos pontos é flagrante a analogia com a do coelho.

Noutros Mamíferos — e são já em grande número — a hereditariedade da pigmentação tem mostrado analogias com a do coelho: Por exemplo no «*Rattus norvegicus*» (BLUM e GREGORY 1937, com a bibliografia própria); no «*Mus musculus*» (DUNN 1936 e respectiva bibliografia); no «*Peromyscus*», outro Roedor, da família Cricetidae (SUMNER 1932); no boi

(ROBERTS 1937); no cavalo (CREW E SMITH 1929), etc. (1). Mas, a-pesar d'êste interesse pelos problemas da pigmentação, e do conseqüente grande número de trabalhos, ainda deve ser sôbre o homem que há maior quantidade de observações respeitantes à pigmentação em geral.

Quanto à hereditariedade, no homem é muito mais difícil de estudar, já pela impossibilidade da experimentação, já porque as observações não se podem efectuar sôbre raças puras, que no estado actual da humanidade têm uma probabilidade de existência infinitamente pequena (2).

Outra dificuldade que aparece quando se pretende estudar a pigmentação no homem é a da influência da idade. Notôriamente, a côr do cabelo de certos indivíduos sofre alterações durante o desenvolvimento; a côr na infância é muito diferente da do adulto. Dados mais ou menos qualitativos encontram-se em vários autores que estudaram a pigmentação, aos quais farei pormenorizada referência, quando tratar desta questão.

Para ser possível estudar convenientemente as árvores genealógicas que vários autores reuniram e aquelas que eu próprio consegui, como nelas aparecem adultos e jôvens de várias idades, é necessário fazer correcções, sem o que se não passará de meras suposições, ou os resultados alcançados serão bastante subjectivos.

O tempo necessário para se calcularem as correcções da idade quando os estudos se efectuam sempre nos mesmos indivíduos, é naturalmente tanto como o do próprio desenvolvimento individual do homem, de forma que, para a obtenção de resultados imediatos são necessários outros processos. A aplicação d'êsses processos conduz aos resultados que exponho adiante.

Para a determinação da pigmentação em casos complicados convém que a côr seja melhor definida do que pelos simples

(1) Para o carneiro as coisas parece passarem-se de maneira diferente. A côr branca é dominante sôbre a preta e intermédia (DRY 1936).

(2) Quando me refiro, em todo êste trabalho, a «raça», sem mais especificações, faço-o no sentido restritamente biológico, isto é, no sentido de um conjunto de indivíduos que diferem doutros pelo menos num factor ou gene. As outras noções de raça, a geográfica e taxonómica e a puramente especulativa, tão usada actualmente, sobretudo por autores germânicos, não me interessam nesta altura.

termos: *preto, castanho, amarelo, claro e escuro*, etc., subjectivos e ambíguos. Particularmente, no caso do homem, ou no caso de populações (como por exemplo de «*Peromyscus*» — SUMNER, 1932), é preciso empregar processos de determinação da cor mais exactos e mais objectivos que os usualmente empregados. Determinei a pigmentação da pele e do cabelo e, indirectamente, dos olhos por intermédio de um aparelho mais adequado que as escalas, da autoria de LOVIBOND, de Salisbury, Inglaterra. Para saber exactamente a cor e sobretudo para atestar a qualidade do aparelho empregado, foi necessário determinar as especificações tricromáticas na nomenclatura internacional, como exponho adiante.

Finalmente, para a compreensão da fenogénese da pigmentação e para o estabelecimento de analogias, por exemplo, entre o homem e o coelho ⁽¹⁾, é muito importante determinar as espécies de pigmentos existentes. O conhecimento dos pigmentos pode ainda trazer ensinamentos doutra ordem, como seja, contribuir para o conhecimento das proteínas em geral, segundo o exemplo da queratina — e tudo o que diz respeito às proteínas é duma importância capital para a Biologia.

É o relato de investigações nos sentidos acima apontados que constitui a presente comunicação.

(1) FISCHER (em BAUR-FISCHER-LENZ 1936) toma como base esta analogia para toda a discussão da pigmentação no homem, analogia que não estava nem está provada.

A determinação da pigmentação

Como atrás fica dito, para uma análise da côr, quando têm de se avaliar pequenas diferenças, ou em que ela parece formar uma série mais ou menos contínua, têm-se usado escalas formadas por pequenas amostras de cabelos ou pêlos (ou produtos artificiais que os imitam) dispostas numa certa ordem. Outros processos são o do pião, usado principalmente por antropólogos americanos, e o dos tinto-fotómetros. Ainda há outros processos menos usados: um descrito por BELLAMY 1930, o de BUNAK e, mais recentemente, o mais exacto e objectivo de GARDNER e MAC ADAM 1934. Vou passar em revista todos êsses processos e apreciar a sua utilização na técnica pigmentométrica.

Escalas. — As escalas ou tabelas são usadas principalmente para a determinação da côr da pele, cabelo e olhos no homem. Das mais empregadas são as de FISCHER ou de FISCHER-SALLER para a côr do cabelo, a de VON LUSCHAN para a da pele e a de SALLER ou de MARTIN E SCHULTZ para a côr dos olhos. As novas tabelas de SCHULTZ para a côr da pele, cabelo e olhos, conjuntamente com a estrutura da iris, de HESCH, apresentam-se sob uma forma muito cômoda, mas são manifestamente insuficientes para o fim que se propõem.

SALLER e SCHULTZ-HESCH compararam e fizeram corresponder as respectivas tabelas, mas PETERS 1936 verificou por um exame cuidadoso que a alegada correspondência não existe. A correspondência entre as várias tabelas é realmente difficil de estabelecer e muitas vezes é mesmo impossível, sendo êste um dos pontos fracos do seu uso: não podem nunca ter universalidade, pois é improvável que qualquer das existentes venha a ser adotada por todos os autores. Por outro lado, a maior parte das tabelas, senão tôdas, têm as seriações bastante arbi-

trárias e na prática são incompletas para certas tonalidades existentes.

A escala para a côr da pele de VON LUSCHAN não tem a maior parte dos tons existentes em populações como a portuguesa, entre o branco marfim e o rosado e entre o branco e o moreno. As côres escuras, castanho muito escuro ou anegrado, já estão melhor representadas. Para uma apreciação rigorosa e determinação quantitativa da côr da pele, a escala de VON LUSCHAN, que é ainda uma das melhores, não se pode empregar.

Para a côr dos cabelos, a escala de FISCHER, ou a sua modificação de FISCHER-SALLER, que lhe é um pouco superior, além do defeito do seu pequeno número de pontos ou degraus, apresentam a seriação das côres arbitrária e, portanto, não se prestam para fins quantitativos. Na modificação de SALLER aparecem já mais tons castanhos e menos loiros; a primitiva escala de FISCHER não era conveniente para os Mediterrânicos ou outros agrupamentos de cabelos castanhos ou escuros.

BUNAK e SOBOLEVA estudaram a escala de FISCHER com um fotómetro do tipo KÖNIG-MARTENS. Estes fotómetros comparam por intermédio de um nicol dois raios polarizados em planos perpendiculares, provenientes do desdobramento de um raio monocromático, vindo de um monocromador mais ou menos sensível. Um dos raios vai cair sobre o objecto e sofre um enfraquecimento. Visualmente verifica-se qual a rotação que é preciso dar ao nicol para que resulte igualdade de iluminação, o que constitui uma medida da intensidade relativa dos dois raios. Os resultados dependem muito da sensibilidade do monocromador e não deixam de ser um tanto subjectivos; estes fotómetros medem mais fácil e exactamente curvas sem bandas nítidas, curvas relativamente uniformes. No entanto, este tipo de fotómetros é suficiente para a demonstração das qualidades de uma escala e BUNAK verificou que os termos da escala de FISCHER, contíguos e da mesma côr (diferentes tons), mostram curvas de absorção de forma diferente, além das diferenças na reflectância para o «branco» — v. o quadro 6 e tabela 3 de BUNAK. As determinações de BUNAK e SOBOLEVA foram efectuadas para os comprimentos de onda 646, 590 e 550 *mμ*. e maiores diferenças deviam aparecer considerando a absorção em todo o espectro.

Com base na simples observação directa, pode dizer-se que

as côres fundamentais do cabelo são, em primeira aproximação, o alaranjado ou vermelho (ruivo), o amarelo (loiro), o castanho e o preto. Uma escala completa devia ter vários tons (diferindo apenas na quantidade de luz «branca» que absorvem) para cada côr, e depois as combinações entre as côres fundamentais que ocorrem mais freqüentemente na prática. O número de termos da escala seria grande, mas em condições favoráveis de iluminação e com observadores treinados, tais tabelas poderiam prestar bons serviços.

As escalas para a côr dos olhos com um número de degraus relativamente grande, como a de SALLER, estão talvez mais apropriadas que as existentes para a côr dos cabelos. A escala de SALLER é melhor, quanto a mim, que a de MARTIN ou de MARTIN-SCHULTZ, principalmente porque tem mais termos. A ordenação dos termos segundo SALLER é que não me parece satisfatória, antes se reconhece facilmente que é arbitrária, pois não entra em conta com a estrutura, que, como começa a ser geralmente reconhecido, é um factor indispensável a considerar para avaliação e julgamento exacto da côr da íris.

WENINGER 1934 chama a atenção para a importância que pode ter o estudo da estrutura da íris. Vários outros antropólogos seguem a mesma opinião, como por exemplo HESCH. HESCH organizou uma tabela para a estrutura ou desenho da íris, com 12 termos, 8 para os olhos pouco pigmentados, os restantes 4 para íris escuras. Manifestamente, embora as fotografias sejam magníficas, os termos são insuficientes, como pode verificar quem efectue muitas observações da estrutura. Estas observações realizam-se cómodamente tirando estereofotografias com uma câmara apropriada ou, na sua falta, visualmente com uma lupa, mas de pequena ampliação, examinando de frente e um pouco de perfil, com iluminação de intensidade média, preferivelmente luz média do Norte.

HESCH 1931 relata um estudo da estrutura da íris, conjuntamente com a côr, em 410 ♂ e 386 ♀. Nota-se uma certa falta de sistematisação na apreciação da estrutura e na sua tabela de desenhos da íris, de que já falei, sucede outro tanto.

No final dêste capítulo voltarei a estudar mais detalhadamente êste assunto e então descreverei como, entrando em conta com a estrutura, é possível medir a côr dos olhos por um processo conveniente.

Processo do pião colorimétrico. — Na América é usado para a determinação da pigmentação um pião com discos de papel de côres apropriadas, discos cuja parte visível pode ser maior ou menor segundo se queira; o pião põe-se em movimento de preferência com um pequeno motor eléctrico.

Êste método tem sido empregado em muitos trabalhos e presta bons serviços para a apreciação da côr da pele. Percorrendo a colecção do «American Journal of Physical Anthropology» encontram-se muitas determinações com o pião (v. por exemplo HARRIS 1926, HERSKOVITS 1926, DAVENPORT 1925, CLEMENTS 1931, TODD E GORDER 1921, TODD, BLACKWOOD E BEECHER 1928, BOWMAN 1930).

Contudo, o método apresenta numerosas dificuldades. Em primeiro lugar, as côres dos discos não são côres puras do espectro: O disco vermelho tem, segundo HARRIS 1926, 33% de vermelho e 67% de preto, emquanto que outros autores dizem que possui respectivamente 41% e 59%. TODD, BLACKWOOD E BEECHER verificaram a existência de um êrro experimental de $\pm 2\%$ e explicam as diferenças na côr do vermelho pelo uso de «fundos» diferentes para a rotação dos discos — a companhia fabricante fornece «fundos» de duas côres, cinzentos e castanhos. Para TODD, BLACKWOOD E BEECHER não se podem objectivamente distinguir resultados obtidos com o pião que comportem diferenças entre 67 e 59% de preto.

HARRIS afirma que o disco amarelo ⁽¹⁾ é o amarelo-limão, puro do espectro, emquanto que BOWMAN, na sua cuidadosa crítica (BOWMAN 1930), assinala que o amarelo do pião tem algum vermelho. Êste último autor recomenda o uso de uma velocidade de rotação mais ou menos constante e uma fonte luminosa também constante, como seja a luz de uma lâmpada Mazda de azoto, de 150 watts, com luz aproximadamente igual à do dia. O menor êrro a que um observador treinado pode chegar é de $\pm 3\%$ — diz BOWMAN — e o pião não fornece uma indicação absoluta do N (negro). Demais, a côr vermelha é muito difícil de imprimir sempre idêntica, de forma que, embora o vermelho usado pela companhia fabricante seja dos melhores,

(1) O pião colorimétrico é usado com quatro discos: preto, vermelho, amarelo e branco.

não são rigorosamente iguais os discos vermelhos de vários piões.

O que é certo, é que o método do pião colorimétrico é muito moroso e pouco objectivo; a pele de que se quer determinar a pigmentação e o pião têm que estar um pouco afastados e é quasi impossível abstrair do brilho superficial dos discos e da pele, que necessariamente são a maior parte das vezes diferentes — além da incerteza das cores dos discos.

BELLAMY 1930 propõe um método baseado na rotação de discos de cores, sobre que se aplicam vidros neutros de determinada absorção e no centro coloca-se uma amostra do cabelo cuja coloração se quer determinar.

O método do pião só com um grande erro poderá ser aplicado à determinação da cor de pêlos ou cabelos (conjuntamente com o grande dispêndio de tempo que seria requerido para efectuar as medições, como diz SUMNER 1932). O de BELLAMY também não parece muito próprio: os discos são igualmente de papel e os defeitos apontados a um aplicam-se igualmente ao outro método.

Métodos fotométricos e tinto-fotométricos. — São estes processos que permitem uma determinação mais rigorosa da cor da pele e do cabelo, bem como dos pêlos, sendo possível empregá-los também para os olhos.

Os tinto-fotómetros usados são o de IVES na América (SUMNER 1932 e DICE) e o de LOVIBOND (GRAY 1908). Compõem-se essencialmente de filtros de determinadas cores que se interpõem a um raio de luz «branca» e que em combinações apropriadas reproduzem a cor do objecto. Quando o brilho da superfície branca-padrão e do objecto são diferentes, é necessário usar diafragmas.

O processo é pouco empregado, talvez por ser um tanto moroso e requerer filtros e aparelhos nem sempre de fácil aquisição. Por outro lado, é precisa uma grande prática para se conseguir ajustar com exactidão a cor dos filtros à cor do objecto. Como o capítulo seguinte é consagrado à análise e discussão deste método, não me refiro a elle mais pormenorizadamente nesta altura.

*

*

*

Métodos fotométricos pròpriamente ditos apenas podem aplicar-se à determinação da còr dos pêlos ou cabelos e têm sido muito pouco empregados. Sem dúvida, seriam os melhores se se pudessem aplicar em trabalhos no campo e para todos os objectos, o que é impossível.

As determinações de BUNAK e SOBOLEVA, a que já me referi, foram executadas com o fim de obter uma escala devidamente ordenada. GRAY com o pigmentómetro (tinto-fotómetro) de LOVIBOND realizou algumas observações com o mesmo fim. As novas determinações da còr do cabelo no homem, relatadas em GARDNER e MAC ADAM 1934, feitas com um fotómetro registador fotoeléctrico, segundo HARDY, são as mais precisas que se conhecem, mas os autores também tiveram em vista a construção de escalas. GARDNER e MAC ADAM obtiveram curvas da *reflectância* entre 400 e 700 $m\mu$ e depois determinaram as características para a especificação da còr segundo a nomenclatura internacional (v. o pròximo capítulo). As amostras analisadas foram repartidas em três grupos: castanho, vermelho e loiro; estas séries foram ainda divididas em subgrupos. Os autores não chegaram neste estudo a definir uma escala que lhes possibilitasse exprimir cada còr do cabelo por determinadas constantes colorimétricas — o número de casos estudados foi relativamente pequeno (53 amostras).

Determinações com o pigmentómetro

A uma modificação do tinto-fotómetro de LOVIBOND pròpria para a determinação da pigmentação, foi dado o nome de *pigmentómetro*. Foi êste o aparelho usado por GRAY, como já referi, mas as suas determinações dizem respeito a um pequeno número de casos e não tenho conhecimento que tenha sido empregado em mais larga escala. No entanto, o aparelho presta-se perfeitamente para se efectuarem com êle determinações quantitativas (embora referidas à sua escala arbitrária) da còr da pele, do cabelo e olhos no homem e da còr dos pêlos de vários animais.

Vou expor o método de medidas e o estudo que fiz do aparelho com o fim de verificar as suas qualidades.

O pigmentómetro consta essencialmente de um pequeno óculo com um único orifício ocular e duas aberturas pequenas, diante de uma das quais se coloca o objecto a medir e em frente da outra está uma superfície de «branco-padrão», no caso do pigmentómetro um cartão próprio semelhante, segundo o fabricante, ao carbonato e óxido de magnésio usado internacionalmente para padrão branco (1). Entre o padrão branco e o orifício ocular podem interpor-se filtros de côr apropriada e com graduação arbitrária, divididos em unidades, décimas e meias décimas, sendo esta subdivisão suficiente para os estudos da pigmentação. Os filtros são, no caso do pigmentómetro, vidros de três côres: vermelho, amarelo e azul; as combinações destes filtros nas várias graduações dão aproximadamente as côres que se desejem.

O tinto-fotómetro de IVES, já referido, tem também três escalas, mas as respectivas côres são: vermelho, amarelo e azul-violeta.

O princípio da utilização destes dispositivos é o da formação de côres compostas à custa de duas côres simples e a absorção de luz «branca» pela combinação de três vidros de côr apropriada (2).

O que mais interessa apreciar quando se determina a pigmentação no homem é a quantidade de «negro» existente, ou, por outras palavras, a quantidade de luz «branca» que o objecto absorve. Esta quantidade será igual, segundo LOVIBOND, à graduação do menor dos três filtros empregados na determinação da côr. O excesso entre o «preto» e o menor dos restantes dois filtros dá a «côr composta» do objecto (violeta, verde e alaranjado) e o excesso desta para o maior dos três filtros dá a côr simples (azul, amarelo, vermelho). Assim, uma côr que fôsse igualada interpondo entre a ocular e a superfície branca-padrão os filtros, respectivamente, vermelho, amarelo e azul —

(1) Na verdade o cartão não deve ser branco puro e o sistema óptico tem também influência (v adiante).

(2) Uma descrição do pigmentómetro de LOVIBOND e seu princípio, encontra-se nos folhetos explicativos fornecidos pela casa vendedora.

2.6 : 2.1 : 1.9 — teria 1.9 de preto, 0.2 de alaranjado e 0.5 de vermelho. A especificação duma côr com os filtros — 3.8 : 4.5 : 4.0 — seria 3.8 de preto, 0.2 de verde e 0.5 de amarelo.

Esta nomenclatura da côr é, porém, muito simplista e imprecisa. A côr é uma das características dos objectos que mais facilmente se observa, mas está muito sujeita a impressões subjectivas e, sobretudo, a designação das côres tem estado mais ou menos subordinada ao critério de cada observador. As tabelas de côres como as de OSTWALD ou as de RIDGWAY não resolvem o problema, pois a apreciação pode diferir muito de um para outro observador e não se prestam para certos casos. Para obstar a estes inconvenientes, a Comissão Internacional de Iluminação (C. I. E.)⁽¹⁾ definiu em 1931 um sistema de coordenadas e as propriedades de um observador-padrão neste sistema, conjuntamente com a descrição de iluminantes apropriados.

Vou procurar definir a côr dos vidros-filtros do pigmentómetro de forma que se saiba a qualidade do aparelho empregado, realizando uma crítica que permita julgamentos seguros e tornando a nomenclatura objectiva, ao mesmo tempo que é feita uma verificação dos filtros da graduação.

*

* *

A apreciação da côr depende das propriedades da retina e meios de visão humana. À visão fotópica não é possível normalmente a apreciação da distribuição da energia luminosa num determinado intervalo, o que se aprecia é a soma dos estímulos energéticos recebidos. É possível, graças a esta propriedade, realizar qualquer côr por intermédio de três outras côres ou estímulos na proporção conveniente. Êste processo é muito simples e chama-se o *sistema triestimular de especificação da côr* (JUDD 1933). Os três estímulos que servem para a definição da côr chamam-se *estímulos primários*. As quantidades dêstes três estímulos primários definem precisamente uma dada côr para cada

(1) Commission Internationale de l'Éclairage.

observador. É necessário além da definição dos estímulos primários que a cor seja apreciada sempre pelo mesmo observador (o *observador-padrão*) e que a iluminação seja sempre a mesma, por exemplo o iluminante B recomendado pela C. I. E., que corresponde à luz média solar do meio-dia.

Para a especificação da cor a Comissão estabeleceu como estímulos primários energia radiante homogênea de 700.0, 546.1 e 435.8 $m\mu$ de comprimento de onda e como *estímulo heterogêneo* (iluminante) o iluminante B, cuja distribuição de energia entre 380 e 780 $m\mu$ é dada pela C. I. E. As coordenadas x , y e z dos estímulos primários no sistema triestímular, são:

	x	y	z
700.0 $m\mu$	0.73467	0.26533	0.00000
546.1	.27376	.71741	.00883
435.8	.16658	.00886	.82456
Iluminante-padrão B	.34842	.35161	.29997

O observador padrão é tal que os estímulos espectrais estão para ele perfeitamente definidos no sistema triestímular com os estímulos primários e o estímulo heterogêneo iluminante B; as coordenadas dos vários pontos do espectro estão bem calculadas e definidas em relação a este observador-padrão e encontram-se dispostas em tabelas convenientes (v. JUDD 1933). A cada cor, a cada comprimento de onda, correspondem, portanto, três coordenadas, que costumam ser dadas ou achando a sua soma para cada intervalo de 5 $m\mu$ — *coordenadas trilineares do espectro*, ou apenas directamente para cada ponto de 5 em 5 ou de 10 em 10 $m\mu$ — *coeficientes tricromáticos*. O espectro de igual energia corresponde a iguais estímulos primários. Outras propriedades do observador-padrão foram derivadas da especificação de 17 observadores normais, tomando aproximadamente a média. Quando se considera o observador-padrão costuma admitir-se que o estímulo básico é o de igual energia, pois é em relação ao espectro de igual energia que são fixadas as propriedades do observador-padrão. A questão dos iluminantes é também de importância capital, visto que para a definição do sistema entra um determinado iluminante, bem conhecido, servindo de estí-

mulo heterogéneo. A especificação tricromática (coeficientes tricromáticos) doutros iluminantes em relação ao observador-padrão é também conhecida, como seja, para os iluminantes da C. I. E.: *iluminante A*, correspondente à luz típica de determinada lâmpada com gás; *iluminante C*, que dá aproximadamente a luz média do dia.

Querendo-se conhecer a côr dum objecto, tem que se saber primeiramente a sua *reflectância* (quantidade de luz reflectida) para cada comprimento de onda, ou, para objectos transparentes, a *transmissão*, também para cada comprimento de onda. Êste último caso é o dos filtros usualmente empregados, por exemplo no pigmentómetro. A transmissão e a reflectância são dadas espectrofotométricamente e, para cálculos aproximados, suficientes para as necessidades da prática, basta conhecê-las em cada intervalo de 10 *mμ*. Como, por outro lado, é conhecida para os iluminantes A, B e C a distribuição de energia para o observador-padrão — é possível calcular a côr com que o observador-padrão vê o objecto considerado desde que se use um certo iluminante.

Calculada a especificação tricromática de um determinado estímulo é agora possível determinar a sua côr, tal como é vista pelo observador-padrão. Para a expressão da impressão visual da côr procede-se ao cálculo de um estímulo equivalente dado pelas seguintes características: 1 — *Brilho*, ou, no caso dos filtros, transmissão luminosa, em que é igual a $\frac{\sum \bar{y}ETd\lambda}{\sum \bar{y}Ed\lambda}$, em que T representa a transmissão para cada intervalo $d\lambda$ e $\sum \bar{y}E$ corresponde à distribuição de energia em relação à coordenada y ; 2 — *Comprimento de onda dominante*, isto é, comprimento de onda da «côr pura» do espectro que se pode considerar representativa da côr complexa que se observa; 3 — *Pureza colorimétrica* ou simplesmente pureza, ou seja, a fracção da côr pura que é necessária para que, combinada ao estímulo heterogéneo, resulte a côr complexa de que se trata.

Procedi ao cálculo destas constantes para os filtros do pigmentómetro, de forma a fazer passar a expressão da sua côr de termos vagos como são vermelho, amarelo e azul, para outros mais precisos, e conformes com a nomenclatura internacional.

*

* *

As curvas de transmissão dos filtros foram obtidas com um espectrofotómetro HILGER para o visível, combinado com um fotómetro SPEKKER, igualmente da casa HILGER. Como é sabido, o fotómetro divide um raio de luz em dois raios de intensidades relativas conhecidas; um dos raios atravessa o filtro a estudar antes de entrar no espectrofotómetro. Os dois raios são depois decompostos pelo espectrofotómetro e registados contiguamente em chapas fotográficas. As chapas usadas foram pancromáticas «Agfa Isopan». Em seguida, foram determinados os pontos de igual escurecimento (igual densidade) da chapa como é usual, e os comprimentos de onda correspondentes a estes pontos eram dados num gráfico previamente obtido para a combinação espectrofotométrica utilizada. As medidas sobre as chapas foram efectuadas com um micrómetro Zeiss apropriado e os pontos de referência eram constituídos por riscas conhecidas.

Obtive assim a transmissão espectral dos filtros das três cores. Foram empregados filtros de 1, 5, 10 e 20 unidades. O cálculo da transmissão por unidade foi feito admitindo implicitamente a lei de LAMBERT (v. por exemplo SCHEIBE 1933 ou GOUVEIA 1935). Segundo LAMBERT, quando a luz de determinado comprimento de onda λ e intensidade I_λ passa num meio absorvente, em cada camada infinitamente pequena ds sofre um enfraquecimento proporcional à intensidade da luz incidente. Para a intensidade I_λ é, portanto:

$$\frac{-dI_\lambda}{ds} = k'I_\lambda \quad \text{ou} \quad \frac{-dI_\lambda}{I_\lambda} = k'ds$$

Para uma espessura s :

$$\int \frac{-dI_\lambda}{I_\lambda} = \int k'ds$$

donde vem

$$- \ln I = k's + c$$

Para o caso em que $s = 0$ obtém-se:

$$- \ln I_{\lambda_0} = c$$

e

$$- \ln I_{\lambda} - (- \ln I_{\lambda_0}) = k's,$$

donde

$$\ln \frac{I_{\lambda_0}}{I_{\lambda}} = k's,$$

em que k' é uma constante e se chama *coeficiente de extinção*.

Empregando os logaritmos decimais vem uma constante diferente:

$$\lg \frac{I_{\lambda_0}}{I_{\lambda}} = ks = \varepsilon$$

Esta constante é mais usada na Química, enquanto que na Física costuma ser preferida k' . k é também chamado coeficiente de extinção.

Pelo método usado conhece-se a relação $\lg \frac{I_0}{I}$, correspondente a $\lg \frac{I_{\lambda_0}}{I_{\lambda}}$ para todo o espectro: esta relação é dada pelo fotómetro SPEKKER para certos pontos. Querendo a transmissão expressa por exemplo em percentagens da luz incidente I_0 , então obtém-se para relação desta com a luz I que sai do filtro e para cada unidade do pigmentómetro:

$$\frac{I}{I_0} \% = \frac{1}{\text{antilg} \left(\frac{I_0}{I} \cdot \frac{1}{s} \right)} \cdot 100$$

Neste caso, s representa a marcação na escala do filtro utilizado; para o filtro 10 unidades é $s = 10$, para o de 20 unidades $s = 20$, etc.

Transmissão luminosa e côr do filtro «azul». — As curvas da transmissão em percentagens $T\%$ por unidade do filtro azul, estão traçadas na *fig. 1*. Nota-se uma pequena divergência entre as curvas obtidas a partir dos filtros 5, 10 e 20. O método de marcação de iguais densidades sobre as chapas exige que a espessura do meio absorvente esteja entre certos limites para que a

marcação resulte eficiente; com efeito, no processo visual empregado é preciso que os dois espectros contíguos apresentem um certo contraste entre si, fora dos pontos de igual densidade de escurecimento, para que estes últimos possam ser bem marcados. As determinações para o filtro 10 são as mais convenientes para

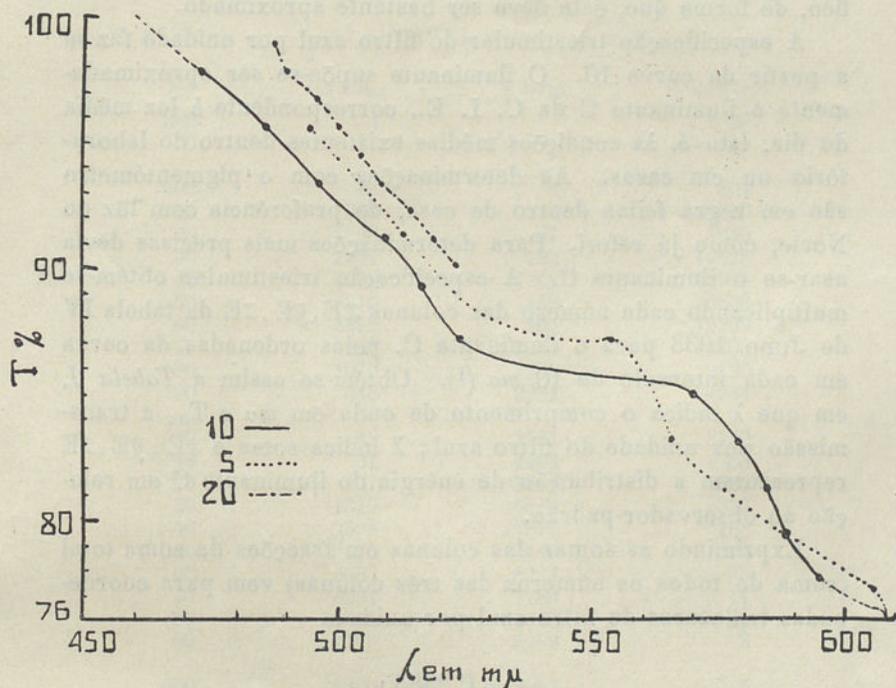


FIG. 1

Filtro « azul » — percentagens de transmissão $T\%$ por unidade, para cada comprimento de onda λ em $m\mu$.

os níveis médios e altos de transmissão. Em quasi todos os casos foi tomada a curva 10, em vez da média das três, por esta razão. Como se vê pela figura, os valores obtidos não diferem muito para as três curvas e só um método com a precisão por exemplo do de HARDY (cf. HARDY 1935) possibilitaria a eliminação de diferenças devidas ao método. As escalas de filtros parece estarem bem graduadas.

A absorção incompleta vai até aproximadamente 610 $m\mu$, estendendo-se pelo azul, verde, amarelo até quasi o alaranjado médio. Não há absorção no extremo azul e no violeta, ao

passo que o alaranjado extremo e o vermelho são completamente absorvidos. A forma da curva é curiosa, parecendo o resultado da união de duas curvas mais simples na região de $540 \text{ m}\mu$. Ficou verificado fotométricamente que as curvas não apresentavam ordenadas sensivelmente inferiores às do gráfico, de forma que, este deve ser bastante aproximado.

A especificação triestímulos do filtro azul por unidade faz-se a partir da curva 10. O iluminante supõe-se ser aproximadamente o iluminante C da C. I. E., correspondente à luz média do dia, isto é, às condições médias existentes dentro do laboratório ou em casas. As determinações com o pigmentómetro são em regra feitas dentro de casa, de preferência com luz do Norte, como já referi. Para determinações mais precisas devia usar-se o iluminante C. A especificação triestímulos obtém-se multiplicando cada número das colunas $\bar{x}E, \bar{y}E, \bar{z}E$ da tabela IV de JUDD 1933 para o iluminante C, pelas ordenadas da curva em cada intervalo de $10 \text{ m}\mu$ (1). Obtém-se assim a *Tabela I*, em que λ indica o comprimento de onda em $\text{m}\mu$ e T_{az} a transmissão por unidade do filtro azul; Σ indica soma e $\bar{x}E, \bar{y}E, \bar{z}E$ representam a distribuição de energia do iluminante C em relação ao observador-padrão.

Exprimindo as somas das colunas em fracções da soma total (soma de todos os números das três colunas) vem para coordenadas trilineares do filtro azul por unidade

$$\begin{aligned}x &= 0.23835 \\y &= .29510 \\z &= .46655\end{aligned}$$

Todos os cálculos seguintes repousam simplesmente sobre os valores de x e y , visto ser $z = 1 - (x + y)$.

O comprimento de onda dominante Λ encontra-se unindo o ponto x, y no sistema de coordenadas com o ponto x_h, y_h que representa no mesmo sistema o estímulo heterogéneo empregado; para o iluminante C $x_h = 0.31012$ e $y_h = 0.31631$; Λ corresponde ao ponto em que a recta assim definida corta a

(1) Para estes cálculos T não é expresso em percentagens, isto é, 100 do gráfico corresponde a 1.

curva que representa no mesmo sistema o espectro visível. O problema reduz-se, pois, a achar a intersecção duma recta com uma curva, mas dada a forma relativamente complicada desta última, é muito facilitado pelo uso de tabelas apropriadas. Entra-se nas tabelas com os valores que passo a calcular.

TABELA I

λ	$\bar{x} ET_{ax}$	$\bar{y} ET_{ax}$	$\bar{z} ET_{ax}$
380	4		20
90	19		89
400	85	2	404
10	329	9	1570
20	1238	37	5949
30	2997	122	14628
40	3975	262	19938
50	3915	443	20638
60	3362	694	19299
70	2231	1039	14703
80	1072	1560	9120
90	343	2231	4984
500	48	2251	3160
10	81	4403	1385
20	507	5687	627
30	1319	6871	336
40	2398	7877	168
50	3678	8446	74
60	5033	8424	33
70	6231	7784	17
80	6944	6593	13
90	7160	5282	8
600	6890	4093	5
10	0	0	0
	59859	74110	117168

Considerando como estímulo básico o espectro de igual energia, como observador o observador-padrão e como estímulo heterogêneo o iluminante C (luz média do dia),

$$x_h = 0.31012 \quad x = 0.23835$$

$$y_h = .31631 \quad y = .29510.$$

Calcula-se:

$$R = \frac{y - y_h}{x - x_h} = + 0.29553$$

Na tabela VI de Judd 1933 entra-se com esta relação (ou a inversa, conforme a que é maior) para se achar Λ_0 . Como o

valor de R não vem na tabela, é preciso interpolar (interpolação linear) tomando os dois valores vizinhos. Obtém-se para adicionar ao R imediatamente menor

$$\Delta\Lambda = + 0.302$$

É:

$$\Lambda = \Lambda_0 + \Delta\Lambda = 487,302 \text{ m}\mu.,$$

em que Λ_0 corresponde ao R imediatamente inferior ao encontrado e que vem na tabela.

Pode-se dizer, portanto, que o comprimento de onda dominante é $\Lambda_{ax} = 487.3 \text{ m}\mu.$, aproximadamente.

A pureza é dada pela fórmula

$$p = \frac{1}{y} \cdot (y - fy_h)$$

em que

$$f = \frac{x - X}{x_h - X} = \frac{y - Y}{y_h - Y},$$

sendo X, Y as coordenadas do ponto em que a recta encontra a curva. Estes pontos obtêm-se por interpolação na tábua de JUDD. Calcula-se

$$Y = Y_0 + \Delta Y = 0.2354 + 0.00571 \\ = 0.24111,$$

donde deriva

$$p = 0.2303,$$

ou seja, uma pureza aproximadamente de 0.23. A transmissão luminosa do filtro (sempre por unidade) é $T_{\lambda ax} = \Sigma \bar{y} E T_{ax} \Delta\lambda \cdot 10^{-6}$. Neste caso $\Delta\lambda = 10 \text{ m}\mu.$ e 10^6 é o factor por que estão multiplicados todos os números da tabela. Vem $T_{\lambda ax} = 0.7411$, aproximadamente.

Assim ficam calculadas tôdas as constantes necessárias para uma perfeita especificação do filtro azul. *O observador-padrão vê o filtro azul 1 como se êle deixasse passar 74,11% da energia luminosa e a côr que mostra é a mesma que se obtém combinando 0.77 de luz média do dia (iluminante C) com 0.23 de luz pura de*

comprimento de onda $487.3 \text{ m}\mu$. As proporções desta combinação são proporções de brilho (no sentido da definição de «brilho»).

Transmissão luminosa e côr do filtro amarelo. — Os mesmos métodos serviram também para a obtenção das curvas de

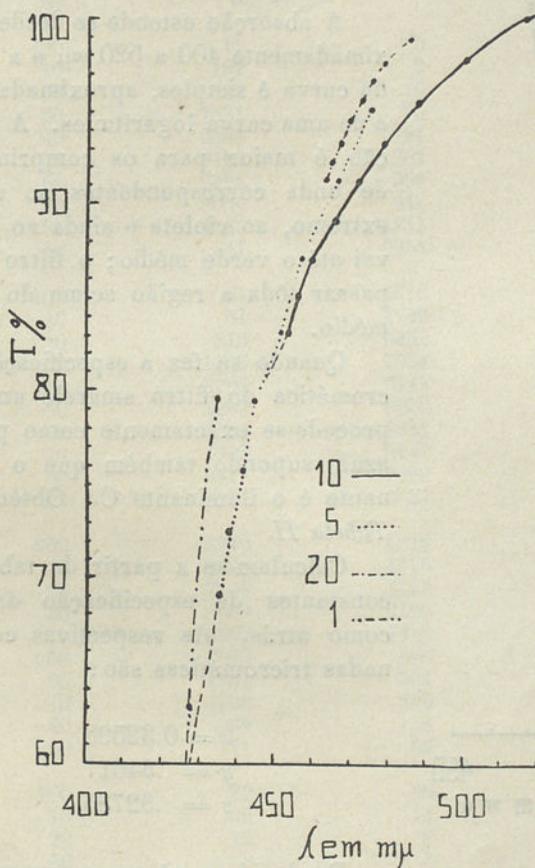


Fig. 2

Filtro « amarelo » — Percentagens de transmissão $T\%$ por unidade para os comprimentos de onda λ (em $m\mu$).

transmissão do filtro amarelo e das respectivas constantes colorimétricas. As curvas estão representadas nas *figs. 2 e 3*. Ao inverso dos outros dois filtros, este tem percentagens de trans-

missão relativamente baixas, nalguns pontos; por esta razão são utilizadas as curvas 10, 5 e 1 para o cálculo dos coeficientes tricromáticos, as duas últimas nos pontos de ordenadas baixas, como está indicado nas figuras a tracejado.

Os dois gráficos são, portanto, contíguos e só por comodidade foram separados.

A absorção estende-se desde aproximadamente 400 a 520 $m\mu$ e a forma da curva é simples, aproximadamente a de uma curva logarítmica. A absorção é maior para os comprimentos de onda correspondentes ao violeta extremo, ao violeta e ainda ao azul e vai até o verde médio; o filtro deixa passar toda a região acima do verde médio.

Quando se faz a especificação tricromática do filtro amarelo unidade, procede-se exactamente como para o azul, supondo também que o iluminante é o iluminante C. Obtém-se a *Tabela II*.

Calculam-se a partir da tabela as constantes de especificação da cor, como atrás. As respectivas coordenadas tricromáticas são:

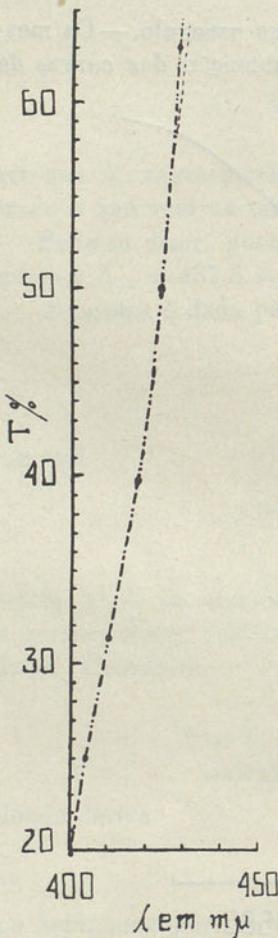


FIG. 3

Filtro « amarelo » — Percentagens de transmissão T % por unidade, para os diversos comprimentos de onda λ (em $m\mu$).

aproximadamente $\Lambda_{am} = 569.3 m\mu$. A pureza vem $p = 0.1986$, isto é, pode tomar-se $p = 0.20$.

Portanto, o observador-padrão vê o filtro amarelo unidade

$$\begin{aligned} x &= 0.32598 \\ y &= .34617 \\ z &= .32785. \end{aligned}$$

Desde já se vê que a transmissão luminosa do filtro é $T_{lam} = 0.99203 \cdot 10 \cdot 10^{-6}$, aproximadamente $T_{lam} = 0.9920$. O comprimento de onda dominante é $\Lambda_{am} = 569.302 m\mu$, ou seja,

como se tivesse uma transmissão luminosa de 0.9920 e a luz que ele transmite corresponde à combinação de luz média do dia

TABELA II

λ	\bar{x} ET _{am}	\bar{y} ET _{am}	\bar{z} ET _{am}
380	0		0
90	0		0
400	17	0	80
10	102	3	485
20	545	16	2618
30	1831	75	8938
40	2989	197	14993
50	3195	361	16841
60	2928	604	16809
70	2056	957	13550
80	1039	1511	8837
90	347	2254	5042
500	51	3316	2792
10	87	4746	1492
20	576	6462	712
30	1523	7934	388
40	2785	9149	195
50	4282	9832	86
60	5880	9841	39
70	7322	9147	20
80	8417	7992	16
90	8984	6627	10
600	8949	5316	7
10	8325	4176	2
20	7070	3153	2
30	5309	2190	
40	3693	1443	
50	2349	886	
60	1361	504	
70	708	259	
80	369	134	
90	171	62	
700	82	29	
10	39	14	
20	19	6	
30	8	3	
40	4	2	
50	2	1	
60	1	1	
70	1		
	93416	99203	93954

(ilum. C) mais luz pura de comprimento de onda 569.3 m μ , na proporção de brilho respectivamente de 0.80 para 0.20.

Transmissão luminosa e côr do filtro vermelho. — Para o filtro vermelho obtêm-se as curvas representadas na *fig. 4*. Tôdas estão reduzidas à unidade. Observando as diferenças entre as três curvas reconhece-se que devem ser devidas a erros de método e não a má graduação das escalas, visto que as diferenças não têm sempre o mesmo sentido. A curva adoptada para a especificação da côr foi a 10, pelas razões já apontadas.

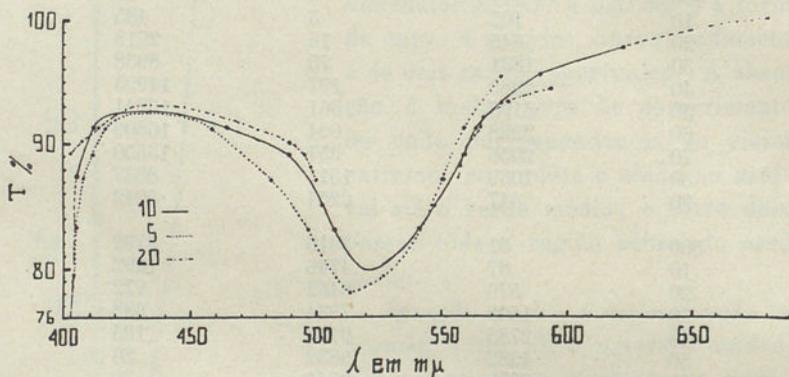


FIG. 4

Filtro « vermelho » — Transmissão em percentagens $T\%$ por unidade, para os diversos comprimentos de onda λ expressos em $m\mu$.

A absorção estende-se desde o extremo violeta ao vermelho médio, com máximos na região do verde e violeta. Dos três filtros êste é o que apresenta menor selectividade na absorção. A partir da curva de transmissão obtém-se a *Tabela III*.

Os valores de x , y e z são :

$$x = 0.31857$$

$$y = .30914$$

$$z = .37229$$

Calculando a transmissão luminosa da maneira habitual vem $T_{lv} = 0.89146$, aproximadamente $T_{lv} = 0.8915$. O comprimento de onda dominante é $\Lambda_v = 501.629$, isto é, cêrca de $501.6 m\mu$. A pureza é $p = -0.0519$, aproximadamente $p = -0.05$.

Como se vê, o filtro vermelho forneceu resultados um tanto inesperados, o comprimento de onda dominante é no verde e a

pureza é negativa. Um valor negativo da pureza significa que a linha definida por x , y e x_h , y_h (v. notação atrás) corta o espectro apenas num ponto e a intersecção vem acompanhada

TABELA III

λ	$\bar{x} ET_v$	$\bar{y} ET_v$	$\bar{z} ET_v$
400	0	0	0
10	296	8	1415
20	1145	34	5503
30	2781	113	13575
40	3681	243	18463
50	3606	408	19008
60	3076	635	17659
70	2065	962	13610
80	1002	1458	8524
90	323	2096	4689
*			
500	45	2925	2463
10	73	3978	1251
20	453	5079	560
30	1224	6379	312
40	2303	7566	161
50	3682	8456	74
60	5292	8857	35
70	6773	8461	19
80	7937	7536	15
90	8589	6335	10
600	8627	5035	7
10	8075	4051	2
20	6893	3074	2
30	5202	2146	
40	3641	1423	
50	2326	877	
60	1353	501	
70	707	258	
80	369	134	
90	171	62	
700	82	29	
10	39	14	
20	19	6	
30	8	3	
40	4	2	
50	2	1	
60	1	1	
70	1		
	<hr/>	<hr/>	<hr/>
	91866	89146	107357

de uma pureza negativa, correspondendo a uma cor púrpura (cores que se estendem entre o violeta e o vermelho e se podem considerar misturas destas duas cores). As cores espectrais têm em regra dois valores para pureza, um negativo outro positivo,

a que andam associados dois comprimentos de onda dominantes. Prefere-se o comprimento de onda associado à pureza positiva. Na especificação dos filtros azul e amarelo apenas esta pureza e respectivo comprimento de onda foram considerados; cada filtro tinha, porém, um outro comprimento de onda para a mesma relação $x - x_n/y - y_n$ (ou o inverso). Para o filtro azul o outro comprimento de onda, com pureza negativa, era cêrca de $594 \text{ m}\mu$ e para o amarelo $453 \text{ m}\mu$.

Pelo contrário, o filtro vermelho apenas tem uma pureza negativa, a sua côr é uma côr não-espectral, uma côr púrpura formada pela subtracção ao estímulo heterogéneo de uma quantidade de luz pura do comprimento de onda dominante, igual à pureza, ou, o que é equivalente, a pureza negativa refere-se a uma parte do brilho que não é adicionada ao estímulo heterogéneo.

Para o observador-padrão o filtro vermelho unidade é uma côr púrpura, com uma transmissão luminosa de 0.8915 e a luz transmitida é como se fôsse igual à combinação do iluminante C adicionada de luz pura de comprimento de onda $501.6 \text{ m}\mu$, nas proporções de brilho respectivamente de 1.00 para 0.05.

Este resultado está de acôrdo com o que se observa nas curvas de transmissão, em que quási só o verde e o extremo violeta é que são mais fortemente absorvidos, mas principalmente o verde; o extremo vermelho é transmitido integralmente.

* * *

Sumarizando os resultados obtidos com a análise colorimétrica: O filtro «azul» aparece, na verdade, como azul à luz média diária, pois o seu comprimento de onda dominante está no azul; no entanto, o azul do filtro está um pouco deslocado para o lado do verde (aproximadamente a $590 \text{ m}\mu$ é que se pode considerar a transição das duas côres). O filtro «amarelo» é amarelo à luz média do dia, o seu comprimento de onda dominante está aproximadamente no amarelo médio. O filtro vermelho é, como disse, uma côr púrpura. A côr vermelha do pião colorimétrico (v. atrás *Processo do pião colorimétrico*) é também a pior das côres dos discos. Reconhece-se que realmente as côres vermelhas devem ser as mais difíceis de realizar com precisão.

* * *

A nomenclatura de especificação triestimular das cores apresenta, além das propriedades já referidas, as de identificação e aditividade ⁽¹⁾ de duas ou mais cores. Duas cores serão iguais quando as suas especificações triestimulares forem iguais, isto é, se

$$\begin{aligned}\int_0^{\infty} \bar{x}ET_1d\lambda &= \int_0^{\infty} \bar{x}ET_2d\lambda \\ \int_0^{\infty} \bar{y}ET_1d\lambda &= \int_0^{\infty} \bar{y}ET_2d\lambda \\ \int_0^{\infty} \bar{z}ET_1d\lambda &= \int_0^{\infty} \bar{z}ET_2d\lambda;\end{aligned}$$

na prática pode substituir-se $\int_0^{\infty} \bar{x}ETd\lambda$ para um certo intervalo, por exemplo o visível, por $\Sigma \bar{x}ET\Delta\lambda$, etc., podendo ser $\Delta\lambda$ igual a 5 ou 10 $m\mu$.

O cálculo da especificação de um conjunto aditivo de estímulos cromáticos, dadas as especificações de cada um dos estímulos componentes, é muito simples: Se as respectivas especificações forem $x_1, y_1, z_1; x_2, y_2, z_2; \dots x_n, y_n, z_n$, a especificação do estímulo composto dos n estímulos simples é $\Sigma_1^n x_i, y_i, z_i$. Foi esta segunda propriedade que permitiu a especificação da cor dos filtros do pigmentómetro, visto que a sua absorção se estende a grandes porções do espectro. Para o conjunto de dois filtros não é possível, porém, adicionar simplesmente os valores obtidos para x, y, z , pois para cada um não se trata de um estímulo simples, mas de estímulo complexos que se estendem a uma porção diferente do espectro. Isto é, para se saber a cor de dois ou mais dos filtros, empregados conjuntamente, é necessário multiplicar os valores de $\bar{x}E, \bar{y}E$ e $\bar{z}E$ referentes ao iluminante C pelas transmissões de cada um dos componentes. Por exemplo, para o caso da combinação dos dois filtros azul e vermelho é preciso achar os valores respeitantes ao iluminante C de $\bar{x}ET_{az}T_v, \bar{y}ET_{az}T_v, \bar{z}ET_{az}T_v$ e depois prosseguir os cálculos como para o caso de um único filtro. Calculei por este processo

(1) Segundo a « Comissão Internacional de Iluminação » e Judd.

as combinações de filtros: azul-vermelho, amarelo-vermelho e azul-amarelo-vermelho; são estas combinações que aparecem freqüentemente na prática, sobretudo a 2.^a e 3.^a combinações.

Transmissão luminosa e côr do filtro azul-vermelho. — Procedendo da maneira indicada, obtém-se a partir das curvas de transmissão unidade os valores da *Tabela IV*.

TABELA IV

λ	$\bar{x} ET_{ax} T_v$	$\bar{y} ET_{ay} T_v$	$\bar{z} ET_{az} T_v$
400	0	0	0
10	296	8	1415
20	1145	34	5503
30	2781	113	13575
40	3681	243	18463
50	3606	408	19008
60	3076	635	17659
70	2028	945	13365
80	966	1406	8217
90	306	1983	4436
500	42	2213	2288
10	67	2274	1140
20	399	4470	493
30	1060	5524	270
40	1983	6514	139
50	3163	7264	64
60	4530	7582	30
70	5764	7200	16
80	6548	6217	12
90	6845	5049	8
600	6643	3877	5
10	0	0	0
	<hr/> 54929	<hr/> 63959	<hr/> 106106

A partir desta tabela encontram-se os valores das coordenadas tricromáticas

$$\begin{aligned}x &= 0.24413 \\y &= .28427 \\z &= .47160.\end{aligned}$$

A transmissão luminosa é $T_{axv} = 0.6396$ e para comprimento de onda dominante vem $\Lambda_{axv} = 484.912$, ou seja, por aproximação, $\Lambda_{axv} = 484.9 \text{ m}\mu$. O valor da pureza, calculada como para um só filtro é $p = 0.1922$, por aproximação $p = 0.19$.

Para o observador-padrão a combinação dos dois filtros uni-

dade azul e vermelho tem uma transmissão luminosa 0.6396 e a côr é a resultante da combinação adicional de luz média do dia e luz pura de comprimento de onda 484.9 $m\mu$ na proporção de brilho respectivamente de 0.81 para 0.19.

Transmissão luminosa e côr do filtro amarelo-vermelho.

— A Tabela V mostra a especificação triestimular respeitante ao conjunto dos filtros amarelo e vermelho por unidade.

TABELA V

λ	$\bar{x} ET_{am} T_v$	$\bar{y} ET_{am} T_v$	$\bar{z} ET_{am} T_v$
400	0	0	0
10	91	2	437
20	504	15	2421
30	1699	69	8294
40	2768	183	13884
50	2942	333	15511
60	2679	553	15381
70	1869	871	12317
80	936	1361	7961
90	309	2004	4483
500	44	2852	2401
10	72	3906	1228
20	453	5079	560
30	1224	6379	312
40	2303	7566	161
50	3682	8456	74
60	5292	8857	35
70	6773	8461	19
80	7937	7536	15
90	8589	6335	10
600	8949	5316	7
10	8325	4176	2
20	7070	3153	2
30	5309	2190	
40	3693	1443	
50	2349	886	
60	1361	504	
70	708	259	
80	369	134	
90	171	62	
700	82	29	
10	39	14	
20	19	6	
30	8	3	
40	3	2	
50	2	1	
60	1	1	
70	1		
	87686	88435	85515



Os valores que se encontram para as respectivas coordenadas são

$$\begin{aligned}x &= 0.33514 \\y &= .33801 \\z &= .32685\end{aligned}$$

A transmissão luminosa dos dois filtros conjuntamente é, como se vê pela tabela, $T_{amv} = 0.8844$. Para comprimento de onda dominante encontra-se $\Lambda_{amv} = 579.586$, aproximadamente $\Lambda_{amv} = 579.6 \text{ m}\mu$. A pureza calculada é $p = 0.1821$, por aproximação $p = 0.18$. A pureza é da mesma ordem da combinação azul-vermelho, bem como da dos filtros isolados, exceptuando o vermelho.

O conjunto dos filtros amarelo e vermelho unidade é visto pelo observador-padrão como transmitindo 0.8844 de energia luminosa e corresponde à combinação de luz do iluminante C e radiação pura de comprimento de onda 579.6 m μ na proporção de brilho de 0.82 e 0.18, respectivamente.

Transmissão luminosa e côr do filtro azul-amarelo-vermelho. — O conhecimento da côr do conjunto dos três filtros é talvez ainda mais importante que o de cada um deles, pois, segundo os autores do pigmentómetro, o conjunto dos três filtros da mesma graduação e que dá a côr neutral ou «preto».

A partir das três curvas dos filtros simples calculei, da maneira habitual, os valores da *Tabela VI*.

Da tabela extraem-se

$$\begin{aligned}x &= 0.25912 \\y &= .32149 \\z &= .41939\end{aligned}$$

e a partir destes coeficientes obtêm-se as especificações da côr. A transmissão luminosa dos três filtros unidade conjuntamente é $T_{azamv} = 0.6297$. O comprimento de onda dominante é $\Lambda_{azamv} = 492.176 \text{ m}\mu$, isto é, cêrca de $492.2 \text{ m}\mu$; o comprimento de onda dominante está entre o azul e o verde, na respectiva zona de transição. Para a pureza obtêm-se $p = 0.2009$, aproximadamente 0.20.

O observador-padrão vê o conjunto dos três filtros unidade como possuindo uma transmissão luminosa de 0.6297 e a luz

transmitida tem a mesma côr que a combinação aditiva de luz do iluminante C (luz média diária) e luz pura de comprimento de

TABELA VI

λ	\bar{x} ET _{ax} T _{am} T _v	\bar{y} ET _{ax} T _{am} T _v	\bar{z} ET _{ax} T _{am} T _v
400	0	0	0
10	91	2	437
20	504	15	242
30	1699	69	8294
40	2768	183	13884
50	2942	333	15511
60	2679	553	15381
70	1835	855	12095
80	902	977	7675
90	293	1896	4241
500	41	2158	2231
10	66	2233	1119
20	399	4470	493
30	1060	5524	270
40	1983	6514	139
50	3163	7264	64
60	4530	7582	30
70	5764	7200	16
80	6548	6217	12
90	6845	5049	8
600	6643	3877	5
10	0	0	0
	50755	62971	82147

onda 492.2 $m\mu$ na proporção de brilho de 0.80 para 0.20, respectivamente.

*

*

*

A expressão objectiva da côr dos filtros do pigmentómetro levou a resultados um tanto inesperados. Na correspondência entre o comprimento de onda da luz e o nome da respectiva impressão pessoal seguiu a demarcação do espectro que é utilizada, na América⁽¹⁾ por exemplo para o caso do fotómetro de HARDY, a que já fiz referência. Mas é evidente que não há de forma alguma uma demarcação natural: é difícil distinguir entre

(1) Tal como se vê em gráficos da Gener. Electr. C.º.

o azul e o violeta, por exemplo, ou entre o alaranjado e o amarelo. Por isso, muitos autores consideram no espectro visível apenas o azul, verde, amarelo e vermelho como diferindo sensivelmente entre si. Só usando o comprimento de onda é que não pode haver divergências. A consideração de um observador-padrão e de uma especificação cromática, sempre a mesma, concorre para que se atinja a certeza na nomenclatura da cor; com o método internacionalmente seguido, pode dizer-se que se chegou a uma objectivação suficiente para os usos da prática.

O processo de manipulação dos dados não parece, portanto, susceptível de introduzir erros sensíveis nos resultados atrás expostos. Os maiores erros podem aparecer por as curvas de transmissão serem apenas aproximadas. Como os gráficos indicam (figs. 1, 2, 3 e 4) o erro cometido não vai nos piores casos além de 5%, em regra. É possível que em certos casos os erros sejam provocados por má gradação das escalas, como sucede talvez para o caso dos filtros 20 azul e amarelo. Pode também acontecer que seja apenas um erro cometido quando da marcação das chapas, o que parece menos provável, dada a regularidade das diferenças.

Recapitulando e comparando os resultados obtidos para os três filtros e suas combinações, verifica-se que para todos a pureza anda à volta de 0.20 quando o estímulo heterogéneo é a luz média diária ou o correspondente iluminante C; exceptua-se o filtro «vermelho», cuja pureza é negativa, como se viu. O filtro «azul» é o de maior pureza (aproximadamente 0.23) seguindo-se-lhe o «amarelo» e a combinação «azul-amarelo-vermelho» (0.20), depois as combinações «azul-vermelho» (0.19) e «amarelo-vermelho» (0.18). Estas quantidades têm o significado explicado atrás, a propósito de filtro vermelho. Como se vê, a pureza dos vários filtros e combinações de igual gradação do pigmentómetro é equivalente, excepto no «vermelho». É evidente que a pureza aumenta com a gradação do filtro, visto que uma parte da luz «branca» vai sendo selectivamente absorvida de acôrdo com a lei de LAMBERT.

Quanto à cor dominante (luz homogénea de comprimento de onda dominante) é cêrca de 487 $m\mu$, isto é, luz azul, para o filtro «azul»; cêrca de 569 $m\mu$ para o filtro «amarelo», em pleno amarelo do espectro; o filtro «vermelho» tem um comprimento de onda dominante no verde, em 502 $m\mu$, mas associado com a

pureza negativa. Para as combinações de filtros, a combinação «violeta» («azul-vermelho») tem como côr dominante luz de comprimento de onda 485 $m\mu$ isto é, azul um pouco mais arroxeado que o do filtro «azul»; a combinação «alaranjado» («amarelo-vermelho») tem uma côr dominante aproximadamente em 580 $m\mu$, no amarelo-alaranjado; a combinação «preto» («azul-amarelo-vermelho») não tem côr neutral — com o iluminante C — pois mostra côr dominante no azul-esverdeado, em 492 $m\mu$, com uma pureza relativamente grande.

A transmissão luminosa dos vários filtros e suas combinações é bastante diferente de uns para outros. O «amarelo» transmite aproximadamente 0.992 (ou, em percentagem, 99.2^o/_o); seguem-se o «vermelho» com 0.891; o «alaranjado» com 0.884; o «azul» com 0.741; o «violeta» com 0.640; finalmente, o «preto» com 0.630. O filtro «azul» e suas combinações é que transmitem menos, com o «amarelo» dá-se o inverso. Os filtros não são, portanto, equivalentes quanto à transmissão luminosa, embora sejam quanto à pureza (com excepção do «vermelho»). Esta falta de equivalência, conjuntamente com a côr não-neutra da combinação dos três filtros em iguais graduações — constituem faltas graves que apresenta o pigmentómetro quando com êle se pretendam efectuar medidas absolutas da côr.

Pela análise detalhada que pretendi levar a efeito, sôbre cada um dos filtros do pigmentómetro e suas combinações, parece poder-se concluir que o aparelho apenas serve directamente para determinações relativas à sua escala arbitrária; em princípio, é possível, sempre que se queira, reduzir as unidades absolutas da sua escala ao sistema de colorimetria adoptado. Para isso era preciso que os padrões «brancos» usados no aparelho fôsem realmente brancos, isto é, iguais a uma superfície branca de carbonato e óxido de magnésio — o padrão internacional. Ora os cartões «brancos» do aparelho não são iguais ao branco-padrão, segundo parece por observação directa. O sistema óptico altera a côr dos objectos, mas, como se vêem ao mesmo tempo os termos de comparação pelo mesmo sistema, não deve resultar daqui grande diferença. Uma perturbação, sem dúvida muito mais importante, é devida à qualidade deficiente dos filtros: o observador é levado insensivelmente a tomar a combinação dos três filtros como tratando-se de autêntica côr neutral.

Se as condições apontadas se não realizassem era, portanto, fácil a redução dos dados ao sistema colorimétrico. Multiplicavam-se os logarítmos da absorção em cada ponto (de 10 em 10 $m\mu$) pelas respectivas unidades da escala do pigmentómetro, depois procedia-se como para o caso da unidade — achava-se a transmissão e entrava-se com ela para a obtenção de tabelas de especificação das constantes tricromáticas como as que estão expostas atrás. Destas tabelas extraem-se da maneira habitual as constantes de especificação da côr. Contudo, com o aparelho tal como está não é aconselhável proceder a estes cálculos.

*

* *

Além da côr dos filtros e das outras constantes colorimétricas, tem também importância quando se usa o pigmentómetro a possível exactidão com que se podem realizar as respectivas combinações. Verifiquei a êste respeito que um observador treinado pode levar facilmente a exactidão até 0.2 da escala, precisão muito maior do que a que é possível atingir com qualquer das tabelas em uso. Aproximações até 0.1 são já mais difíceis e só em casos de côres claras (com pouco «preto») é possível atingir esta precisão.

Para a determinação da *côr da pele* apenas as primeiras 3 unidades e decimais são usualmente empregadas para populações como a portuguesa; nestas condições, é possível levar a aproximação até 0.1 da escala, principalmente quanto à combinação dos três filtros, ou seja, quanto ao pretense «preto». Para o «preto», como a transmissão luminosa da combinação é menor do que para as outras combinações ou filtros isolados, uma diferença de 0.1 ou 0.2 da escala é já perfeitamente perceptível. Por esta e outras razões, a gradação da combinação dos três filtros constitui o valor empregado para fins comparativos, como exporei adiante.

Para a *côr do cabelo* o instrumento presta ainda bons serviços. Como há mais côr neutra, já a aproximação não se pode fazer em regra a mais de 0.2 da escala. Também aqui o «preto» é que é mais fácil de obter com exactidão. No caso da determinação da pigmentação dos cabelos, o branco-padrão

é constituído por um pequeno feixe de cabelos brancos fornecidos conjuntamente com o aparelho. Êste padrão tem uma leve tinta leitosa de queratina. Ê evidente que para a côr do cabelo não se usa, portanto, o branco-padrão internacional. Adiante terei ocasião de voltar a êste assunto.

Tanto para a medida da côr da pele como para a dos cabelos, é preciso intercalar um diafragma que reduz a quantidade de luz. O diafragma faz parte do aparelho e só com êle é possível levar a aproximação até 0.1 ou 0.2.

*

*

*

Para a côr dos olhos é fornecido com o pigmentómetro um fundo que vagamente pode ter aparência duma estrutura iriana, com estrias e a pupila ao centro, sendo o resto de cartão «branco-padrão». Verifiquei, porém, que são impraticáveis as medidas directas da côr da iris com ou sem o «fundo», em virtude da natural dificuldade de assestar durante tempo suficiente o aparelho em direcção a uma vista e principalmente porque a iris raramente tem uma só côr.

Ê necessário, como já referi no princípio dêste capítulo, apreciar a côr da iris sempre em relação à sua estrutura. A iris compõe-se de um estroma, no todo ou em parte revestido anteriormente por um endotélio, e de um epitélio posterior retiniano. O epitélio posterior é sempre mais ou menos intensamente pigmentado, excepto nos albinos puros, e o pigmento é castanho a negro, conforme o estado de agregação. O estroma pode possuir cromatóforos em maior ou menor quantidade e apresenta uma estrutura mais ou menos complicada. Na face anterior nota-se sempre uma elevação anular que divide a iris em duas zonas: uma *interna* ou *peripupilar*, outra *externa* ou *ciliar*. A estrutura da *zona interna* é, em regra, simples, e a sua coloração é tão intensa, ou mais, do que a da *zona externa*. Nos olhos de côr misturada a zona interna é constantemente, ou quási constantemente, de tom castanho ou amarelado, mais ou menos escuro, mais ou menos claro. Em olhos castanhos é sempre castanha, e em muitos olhos azuis é amarelada ou acastanhada.

Nem sempre é possível delimitar bem a zona interna. O anel peripupilar é a maior parte das vezes de forma circular com um contôrno em zig zag e, em certos olhos de côres misturadas, o anel é incompleto em maior ou menor extensão. O que é importante, porém, é que *na zona interna é que se manifestam as possibilidades de realização pigmentar que possui a iris*. Quando se queira usar um número como representativo da côr mais escura da iris, procura-se o que corresponde à zona interna.

A zona externa apresenta duas estruturas fundamentais: uma de tipo radiado, com estrias radiais mais ou menos aparentes, outra com trabéculas entrecruzadas de forma a que entre elas podem resultar criptas ou depressões. Os olhos com trabéculas têm, em regra, maior mistura de côres; as criptas dos olhos castanhos, quando profundas, são azuis ou esverdeadas. A zona interna mostra quási sempre estrutura radiada (estrias). Outro elemento sempre presente na estrutura iriana são os círculos externos, próximo do bordo externo da iris. Estes círculos, segundo as minhas observações, são sempre aparentes desde que incida sôbre a retina uma luz forte e o estroma de iris tenha uma certa espessura, e estão em relação, muito provavelmente, com a contractilidade da iris e alargamento da pupila. Muitas vezes os círculos são incompletos, em certos casos quási invisíveis quando a estrutura da zona externa é trabecular complicada. Nos olhos medianamente escuros tornam-se mais aparentes, pois em regra são mais claros que o resto da zona externa e são freqüentemente de côr esverdeada-acastanhada.

Como elementos inconstantes e mais ou menos raros, existem ainda na estrutura de certas iris, extensões mais ou menos consideráveis em que o estroma é mais espesso que no resto, com formas e tamanhos variados, pontuações, pequenas «placas», ou anéis de pontuações alongadas. A coloração dêstes elementos é quási sempre diferente, sobressaindo do resto.

Diferentes destas pontuações são umas manchas, geralmente pequenas, sempre mais escuras que o resto da iris, que representam aparentemente os pequenos nevos de coloração escura que em regra se encontram nalguns pontos da pele.

O estudo da pigmentação iridiana deve necessariamente ser feito conjuntamente com o da estrutura, como se infere facilmente do que expus acima, e como representativa da côr mais

escura que o genotipo individual permite realizar (em reacção com o «meio») deve tomar-se a côr da zona interna.

Para a determinação da côr pode-se usar a escala do pigmentómetro referida a termos de comparação. O método que empreguei consiste no seguinte: Desenha-se esquematicamente a estrutura da iris dos dois olhos, observando cuidadosamente com uma lupa. Para cada zona de coloração diferente acerta-se tanto quanto possível a côr pela escala de SALLER considerando em cada um dos desenhos desta tabela apenas uma porção de coloração mais ou menos uniforme. As côres da tabela são depois medidas da maneira habitual com o pigmentómetro (cf. Tabela VII). É possível, assim, determinar as colorações da zona interna da iris, conseguindo-se uma certa aproximação, sobretudo para o «preto» da escala, que pode ir até 0.2 e tem probabilidade de ser à volta de 0.5.

Aos olhos azuis puros corresponde, como é sabido, a ausência de pigmento no estroma da iris, ao passo que o pigmento presente no epitélio posterior, visto através o estroma e conjuntamente com os elementos dêste, dá a coloração azul. As côres amarela—castanha—castanha-negra aparecem quando o estroma é também pigmentado. Como se vê por esta seriação, as pigmentações serão mais diferentes no tom que na côr, isto é, têm principalmente diferenças de intensidade. Nos olhos verdes a pigmentação amarela-castanha é em pequena quantidade e fica, portanto, permanecendo a impressão azul do epitélio posterior conjuntamente com a do pigmento anterior, estromático, o que dá a impressão de verde. Olhos com azul e castanho (ou amarelado) ou verde e castanho, são devidos à desigual distribuição do pigmento ou pigmentos do estroma e, segundo as observações efectuadas, estão associados constantemente a estruturas em que a espessura do estroma é diferente nos diversos pontos (maior nas áreas castanhas ou amareladas). Coloração azul-acinzentada pode facilmente aparecer quando o estroma é muito espesso, embora despigmentado, ou quando em estromas espessos há uma ténue camada pigmentada.

Na *Tabela VII* estão inscritos os valores em unidades da escala do pigmentómetro correspondentes aos vários termos da escala de SALLER. São estes os valores atribuídos à côr da zona interna e que serão considerados no capítulo seguinte. As letras da primeira coluna à esquerda são as da tabela de SALLER.

Quando há uma côr geral quasi uniforme apenas esta foi determinada, noutros casos foram consideradas várias zonas em separado. Sempre o 1.º número da esquerda representa a

TABELA VII

Tabela de Saller	Côr geral			Zona interna				Zona média			Zona externa				
P ₁	20.5	21.0	19.5												Pròpriamente, côr em volta da pupila.
P ₂	19.5	20.5	19.0												
P ₃	19.0	20.5	17.8												
P ₄	19.0	20.8	16.7												
P ₅	18.0	20.0	15.0									16.0	18.5	15.5	
P ₆				17.3	19.3	14.5	15.5	19.7	14.3	15.0	15.5	14.0	18.0	14.8	
P ₇				17.2	19.3	14.2	14.2	19.0	14.2	14.0	18.0	14.0	18.0	14.8	
P ₈				17.0	19.0	14.8	12.0	13.2	11.2	13.3	14.0	13.0			
M ₁				17.5	20.0	15.0						15.3	18.0	16.3	
M ₂				17.0	18.7	13.8						13.8	17.5	16.7	
M ₃				15.2	19.5	14.3	14.3	19.5	14.0	14.0	18.0	17.5			
M ₄				18.2	19.8	16.3	15.6	19.5	15.0	15.3	18.4	17.2			
M ₅				17.4	19.2	14.7	14.5	19.0	14.7	14.3	18.0	16.0			
M ₆				"	"	"	11.0	18.0	11.5	"	"	"			≈ a M ₅ . Z. média círculo amarelo.
M ₇				13.4	16.5	12.0						13.3	16.3	15.5	
M ₈				16.5	19.0	14.0						12.7	13.7	15.8	
M ₉				19.0	20.5	16.5	18.0	20.0	15.7	16.4	18.8	17.0			
M ₁₀				17.9	20.0	15.0						15.8	17.2	16.5	
M ₁₁				14.5	16.9	12.8						14.0	13.2	13.5	
M ₁₂												15.0	17.3	16.5	Z. interna e média ≈ a M ₅ .
M ₁₃				17.2	19.0	14.5	11.5	16.3	11.8	13.5	17.2	16.4			
M ₁₄				17.0	19.2	14.7	12.4	18.2	13.0	13.8	18.0	17.0			
M ₁₅				11.7	14.7	11.5						14.0	15.0	15.5	
M ₁₆				17.0	19.0	14.7	8.0	8.3	8.1	12.9	13.4	14.8			Nas pontuações quasi branco.
M ₁₇				10.8	14.5	11.0						12.7	14.4	15.0	
M ₁₈				14.5	19.9	16.7	11.0	16.5	11.2	13.7	18.5	16.9			Z. média em pontuações.
M ₁₉				12.0	16.7	14.4	9.7	12.5	10.0	11.8	15.0	14.0			" " " "
M ₂₀				13.4	19.3	12.9	11.0	13.8	11.2	13.0	14.0	14.6			Z. média muito estreita.
M ₂₁				12.0	16.8	14.2	9.8	12.0	10.1	11.2	12.1	11.9			
M ₂₂				6.2	6.8	6.0						10.3	9.2	9.7	
S ₁				6.3	6.7	6.0						9.1	8.0	9.5	
S ₂				"	"	"	6.1	6.3	6.0	"	"	"			Z. interna e externa ≈ a S ₁ .
S ₃				11.2	13.5	13.2	6.5	7.3	6.8	16.4	16.4	16.9			
S ₄				11.2	13.3	13.2	6.0	6.2	6.1	14.5	14.5	15.0			Z. média com pontuações.
S ₅	16.5	16.3	17.0												Z. interna com algumas estrias quasi brancas.
S ₆				17.2	14.8	15.5	12.1	9.6	13.1	15.6	15.0	16.4			
S ₇				16.2	14.8	15.0						14.4	14.4	15.2	
S ₈				14.1	11.6	13.0	8.2	7.2	9.5	10.5	9.9	12.9			Z. média em pontuações.
S ₉				6.4	6.6	6.3						10.2	10.0	12.5	
S ₁₀	6.3	6.5	7.3									10.0	10.0	12.7	Estrias quasi brancas.

quantidade de «vermelho» em unidades do pigmentómetro, o 2.º representa o «amarelo» e o 3.º o «azul». O menor dos três números representa o pretense «preto». Aos olhos pura-

mente azuis corresponde uma côr 0, visto que apresentam ausência de pigmento anterior. Desde que haja uma pequena zona diferente (sempre a zona interna, em primeiro lugar) atribui-se-lhe o valor correspondente.

Com o número de tons da escala e seus intermediários, é fácil atingir uma certa precisão e é de crer que este método seja superior ao que consiste simplesmente em fazer comparações globais com as tabelas; além desta razão, obtêm-se números que se prestam melhor para a resolução de certos problemas do que simples categorias arbitrárias.

*

*

*

Da análise efectuada ao pigmentómetro resulta a conclusão que é possível empregá-lo com vantagem em relação às habituais tabelas de pigmentação. O processo está, porém, longe de ser perfeito. Os filtros, para serem mais exactos deviam ser equivalentes, no sentido das suas constantes colorimétricas, e para a côr neutral ou «preto» era mais conveniente, parece, o uso de vidros apropriados de côr neutra. Com um branco-padrão igual ao padrão internacional e uma superfície estriada, dêste branco, para os cabelos e, além disso, um sistema óptico de confiança — o aparelho passaria a ser muito mais perfeito e constituiria um dispositivo próprio para determinações de pigmentação.

Não era possível por intermédio de escalas obter facilmente as indicações quantitativas que obtive. O novo critério a adoptar na técnica pigmentométrica é o de abandonar tanto quanto possível as escalas de pigmentação para se usarem métodos quantitativos. Os tintofotómetros, desde que fossem construídos com base em estudos práticos e atendendo à nova nomenclatura da côr, seriam satisfatórios. Tal como existe, o de LOVIBOND presta bons serviços nalguns casos de determinações quantitativas, como está exposto no capítulo seguinte. É de desejar, contudo, um progresso no sentido acima apontado.

O escurecimento com a idade

Uma das maiores perturbações introduzidas no estudo da hereditariedade da pigmentação no homem é, sem dúvida, causada pela alteração da cor com a idade. Quando se estudam genealogias obtêm-se dados referentes a várias idades; êsses dados não são directamente comparáveis entre si, em virtude de não se saber a correcção a efectuar para os reduzir à mesma idade, ao mesmo estado de desenvolvimento relativo.

Outros caracteres descritivos e métricos referentes ao homem sofrem também a influência do crescimento ou desenvolvimento individual. Ao lado da natural dificuldade dos estudos hereditários no homem, o crescimento é, assim, uma causa de julgamentos inseguros. Uma grande parte da literatura sobre hereditariedade no homem, embora represente um notável esforço, ressentese desta e outras condições particulares.

O efeito do crescimento podia ser completamente eliminado se os estudos se realizassem somente em adultos, ou se, estudando indivíduos de tôdas as idades, se conhecesse a curva de crescimento de cada carácter, para cada génio em relação com diferentes «meios». Pela primeira alternativa perder-se-ia muito material que doutro modo pode ainda dar diversas e importantes indicações, o segundo processo é quasi irrealizável. De maneira que, ou o observador espera para a publicação dos resultados todo o tempo necessário ao completo desenvolvimento dos indivíduos que estuda — e renunciará êle próprio possivelmente a obter os dados completos, quanto mais a estudá-los — ou então tem que recorrer ao estudo de populações actualmente existentes e daí inferir para o crescimento de cada indivíduo.

A partir da «tendência» das médias de populações de diferentes idades pode-se concluir por analogia para a «tendência» do valor individual com a variação da idade. Êste método tem, portanto, como base, a substituição da curva do desenvolvimento individual pela de populações com a mesma idade. Para as árvores genealógicas supõe-se cada indivíduo com a idade adulta, para o que se faz a respectiva correcção. Ê evidente que a correcção obtida por êste processo pode fornecer valores que

não correspondem exactamente aos do desenvolvimento individual efectivo mas é preferível a usarem-se simplesmente as medidas directas.

Para o caso da pigmentação, de que me ocupo, determinei a côr da pele, cabelo e olhos em alunos das Escolas primárias e Liceus, desde os 7 aos 22 anos, usando a escala arbitrária do pigmentómetro de LOVIBOND e calculando depois a média para cada grupo de indivíduos com intervalos de 1 ano. Necessariamente, tive que agrupar as determinações no centro das classes como é usual para as variáveis contínuas, como por exemplo os índices (e medidas) da Antropologia. Êste processo introduz uma imprecisão relativamente grande, visto colocar em classes, distintas indivíduos cujas idades têm uma diferença apenas de dias; no entanto, o intervalo de 1 ano aparece quási como natural nestes casos.

ROUTIL 1937 indica também uma correcção para a idade, mas procede de maneira diferente. A formulação que emprega dá ao método a impressão de maior precisão do que a que realmente possui. ROUTIL supõe o estado adulto atingido na classe dos 30-39 anos, cuja média designa por M_{III} . A média para cada idade a e para cada sexo, será M_a . A partir destas duas médias consegue uma correcção «Bereinigungszahl» B_a para a respectiva idade a e sexo, sendo $B_a = \frac{100 \cdot M_a}{M_{III}}$. Para cada medida individual b_a (do mesmo sexo a que pertencem M_{III} , M_a e B_a) acha a relação $\frac{100 \cdot b_a}{x} = B_a$. A x chama então a medida corrigida («bereinigte Masse»). Ê, portanto, $x = 100 \cdot \frac{b_a}{B_a}$, e êste valor é tomado para figurar nas genealogias definitivas. Todo o julgamento ulterior se baseia no valor corrigido x e não no observado b_a .

Ê fácil verificar que $x = b_a \cdot \frac{M_{III}}{M_a}$, isto é, o valor corrigido não é mais que o valor individual observado multiplicado pela relação entre a média para a classe adulta e a da classe-idade a que pertence o individuo. Pode também ver-se que sendo $x/b_a = M_{III}/M_a$ êste método supõe um «crescimento» individual proporcional à relação entre as médias.

Uma outra correcção possível consiste em substituir o valor

observado pelo que se obtém adicionando-lhe a diferença entre a média para os adultos e a média correspondente à idade considerada. Então, com a mesma notação, será $x = b_a + (M_{III} - M_a)$ e o valor assim obtido será menor do que se fôsse calculado pelo processo de RUTIL, quando a média adulta é maior que a média da idade considerada.

O processo de RUTIL não entra em conta com a forma da curva do crescimento; supõe simplesmente que êste se faz segundo uma recta, visto que o valor de x é dado pela equação duma recta que passa pela origem das coordenadas. Não é, portanto, senão um processo aproximado e, quando há grandes diferenças entre a média para a classe adulta e a média para as várias idades, leva a valores demasiadamente altos que não devem corresponder à realidade.

Mais correcto do que qualquer dêstes processos é o que consiste em calcular a curva média do crescimento e achar os valores corrigidos a partir da respectiva equação. É êste o processo seguido no presente trabalho. Além de se encontrar uma correcção para as genealogias, levantam-se ainda outras questões interessantes em relação com o crescimento e com a interpretação do escurecimento com a idade, como se verá.

*

* *

A determinação da côr da pele, cabelo e olhos foi feita da maneira indicada anteriormente. Nem sempre era possível efectuar as determinações com luz do Norte e em certos casos havia efeitos parasitários produzidos pelas construções vizinhas, etc., visto as determinações da côr da pele se terem efectuado no próprio local das escolas. Em todo o caso, procurei sempre realizar condições não muito diferentes das condições médias diárias, operando junto de uma janela e com o aparelho em posição tal que a luz vinha de cima e não de frente.

Para os olhos, no local apenas fazia a comparação entre a sua côr e a tabela empregada e para os cabelos a côr era determinada no laboratório numa amostra colhida próximo da região lambdaide.

Ao mesmo tempo que determinava a pigmentação, era feito

um desenho esquemático da estrutura da íris, como já referi, e anotadas certas particularidades relacionadas com a pigmentação, tais como a existência de sardas e nevos, cor das faces, abundância e forma dos cabelos e grau de pilosidade. Os dados obtidos referentes a estas particularidades serão possivelmente tratados noutros trabalhos.

No presente estudo apenas procuro exprimir por números o chamado *escurecimento com a idade*, (o «Nachdunkeln» dos autores alemães) servindo-me do pigmentómetro e designando directamente as cores observadas na sua graduação arbitrária. Todos os resultados gerais poderiam ser convertidos em medidas colorimétricas apropriadas, mas, como já tive ocasião de explicar, com os padrões «brancos» empregados e a pouca selectividade dos filtros, principalmente do vermelho, tal transformação não mereceria confiança.

Contudo, a resolução de certas questões, entre elas a do escurecimento com a idade, é em parte possível mesmo que se utilizem as unidades do pigmentómetro. O «preto» é dado pelo menor dos três filtros empregados e aproxima-se realmente da cor neutral desde que a graduação seja alta, o que acontece particularmente para a cor dos olhos e cabelo. O número representativo do «preto» será utilizado nos cálculos relativos ao escurecimento com a idade, pois é ele que principalmente interessa.

*

* *

O escurecimento com a idade tem sido tratado por vários autores duma maneira qualitativa. Já VIRCHOW 1886 e outros autores antes d'ele se ocuparam do problema. Igualmente se referem às mudanças na pigmentação com a idade UCHIDA 1904, TOCHER 1908, STANUS 1913, e mais recentemente HERSKOVITS 1926, HESCH 1931, JANKOWSKY 1932 a), KARVÉ 1931, CONITZER 1931, NEDRIGAILOFF 1926, BOAS e MICHELSON 1933, GODIN 1935, FISCHER 1936 (1), LENZ 1925, etc.

STANUS 1313 observou o escurecimento com a idade em pretos

(1) Em BAUR-FISCHER-LENZ 1936.

(Nyasaland). Segundo este autor, aparecem crianças filhas de pais pretos com a pele mais clara à nascença e o cabelo levemente acastanhado em vez de preto. Depois dá-se rapidamente o escurecimento da pele e cabelo (em menos de três meses); no entanto, a coloração definitiva só seria atingida cerca dos 16 anos.

HERSKOVITS 1926 — estudando populações de diferentes idades e podendo ter os resultados uma outra interpretação — também verificou pelo método do pião um escurecimento com a idade na pele dos negros da América.

Segundo FISCHER 1936 e LENZ 1925 o escurecimento ocorre principalmente no cabelo e apenas nas populações em que houve mestiçagem de uma raça loira com uma escura. LENZ lançou a hipótese de que a mudança (escurecimento) da pigmentação com a idade é devida às hormonas sexuais, o que explicaria também o tom do cabelo de certos recém-nascidos, mais escuro à nascença do que daí a algum tempo. As hormonas da mãe, passando através da placenta, causariam o fenómeno.

GODIN foi o único que seguiu sempre os mesmos indivíduos, mas as suas determinações são também, infelizmente, de ordem qualitativa. Segundo GODIN, há mudança na cor dos cabelos depois dos 13 anos em 28% das pessoas e a modificação tem lugar no período pubertário, dos 15 aos 16 anos. Observou escurecimento tanto em cabelos loiros como castanho-claros, castanho-escuros e ruivos. Pelo contrário, GODIN diz que a cor dos olhos em regra se aclara quando da puberdade (45% dos casos), podendo também tornar-se mais escura, mas com menos frequência (18%). Pelo contrário, HESCH 1931, estudando populações de diferentes idades, conclui que há em regra um escurecimento da iris depois dos 7 anos e que para além dos 56 anos se torna novamente mais clara.

As opiniões diferem, pois, bastante, conforme o observador. O que parece seguro é que a pigmentação do cabelo pode variar com a idade. Quanto à cor da pele e olhos não existe a certeza. O escurecimento pode dar-se também em raças escuras puras, como deviam ser os pretos observados por STANUS. A explicação de LENZ e FISCHER é talvez incompleta, sobretudo quando pretendem atribuir todo o «Nachdunkeln» ao cruzamento de raças.

É evidente que o problema precisava ser aclarado fazendo

observações quantitativas, o que pretendi levar a efeito. Os resultados de tais observações são expostos a seguir e representam uma contribuição para a resolução do problema além de permitirem estabelecer a correcção para a idade, indispensável para o estudo da hereditariedade da pigmentação no homem.

A determinação do escurecimento com a idade

Quando se estuda o escurecimento com a idade têm que se considerar, por várias razões, os dois sexos em separado: por exemplo, é opinião corrente que as mulheres de várias regiões da Europa são em média mais fortemente pigmentadas que os homens.

Igualmente, é preciso tratar da cor da pele, cabelo e olhos em separado.

Cor da pele — ♂. — A pigmentação foi determinada na parte mediana interna do antebraço esquerdo. As observações abrangem rapazes de 8 a 22 anos e o número de casos é diferente de umas para as outras idades. A análise a que vou proceder refere-se principalmente ao filtro «azul» do pigmentómetro, que dá aproximadamente o preto. Para o caso da pele o filtro «azul» era sempre o que tinha a menor graduação e o «vermelho» o que tinha a maior.

O método usado consiste na determinação e análise de médias e da variação de populações de diferentes idades, mais ou menos equivalentes quanto à composição racial. Na *Tabela VIII* estão expostas as médias e desvios-padrões para cada idade; o número de observações que serviram para o cálculo destes estatísticos é o mesmo que se encontra na tabela seguinte (IX) na coluna n'_i . As médias foram calculadas pela fórmula directa

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n'}$$

em que \bar{x} representa a média (na notação de FISHER 1932), $\sum x$ a soma de todos os valores da variável e n' o número das observações.

O desvio-padrão foi calculado usando a fórmula

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n}}$$

em que s é o desvio-padrão encontrado e $n = n' - 1$ representa o número de graus de liberdade.

Como se sabe, esta fórmula é superior à clássica, que não considerava os graus de liberdade (v. FISHER 1932 ou GOULDEN 1937).

TABELA VIII

Anos	Média	Desvio-padrão
8	1.98	0.40
9	1.82	0.26
10	1.96	0.38
11	1.85	0.35
12	2.13	0.65
13	1.79	0.40
14	2.01	0.39
15	2.16	0.74
16	2.02	0.51
17	2.00	0.57
18	1.94	0.49
19	2.10	0.65
20	2.03	0.57
21	1.90	0.86
22	1.60	0.46

As diferenças entre as médias dos vários anos são pequenas e irregulares, dando a impressão de não haver heterogeneidade. No entanto, para um julgamento seguro tem de se proceder a uma análise da variância (no sentido de FISHER 1932). Para o caso actual, a maneira de executar a análise encontra-se bem descrita em FISHER 1932, ou GOULDEN 1937, ou SNEDECOR 1934 (cf. também TAMAGNINI 1938). A equação fundamental é, conhecidamente:

$$\sum_1^{n'k} (x - \bar{x})^2 = \sum_1^k \sum_1^{n'} (x - \bar{x}_i)^2 + n' \sum_1^k (\bar{x}_i - \bar{x})^2 \dots \dots (1)$$

em que k representa o número de grupos, cada um contendo n' casos; \bar{x}_i é a média de cada grupo; \bar{x} a média geral e x os valores individuais da variável.

A soma dos quadrados dos desvios de x a partir da média chamarei, como é costumeado, simplesmente *soma de quadrados*.

Na equação (1) há a distinguir três somas de quadrados: $n' \sum_1^k (\bar{x}_i - \bar{x})^2$ é a soma de quadrados entre os grupos e calcula-se facilmente atendendo a que (1);

$$n' \sum_1^k (\bar{x}_i - \bar{x})^2 = \sum_1^k (T_i^2/n') - T_x^2/n'k \quad \dots \dots \dots (2)$$

e nesta igualdade T_i representa a soma dos valores da variável x para cada um dos k grupos e T_x é a soma de todos os valores de x em todos os k grupos.

O outro termo do segundo membro — $\sum_1^k \sum_1^{n'} (x - \bar{x}_i)^2$ — corresponde à soma dos quadrados dentro dos grupos e na prática não é preciso calculá-lo, obtendo-se por subtracção entre o primeiro membro da igualdade (1) e o segundo termo do segundo membro.

Ao primeiro membro de (1) chama-se soma de quadrados total e calcula-se utilizando a igualdade (3) (2):

$$\sum_1^{n'k} (x - \bar{x})^2 = \sum_1^{n'k} (x^2) - T_x^2/n'k \quad \dots \dots \dots (3)$$

A análise da variância ainda se pode efectuar quando o número de observações é diferente em cada grupo. As igual-

(1) A demonstração da igualdade (2) faz-se com facilidade. Com efeito, é:

$$\begin{aligned} n' \sum_1^k (\bar{x}_i - \bar{x})^2 &= n' \sum_1^k (\bar{x}_i^2 + \bar{x}^2 - 2\bar{x}_i\bar{x}) = n' \sum_1^k (T_i^2/n'^2) + \\ &\quad + n' \sum_1^k (T_x^2/n'^2 k^2) - 2 n' \sum_1^k (T_i/n' \cdot T_x/n'k) \\ &= \sum_1^k (n' T_i^2/n'^2) + (n'k T_x^2/n'^2 k^2) - 2 [\sum_1^k (T_i/n') \cdot \sum_1^{n'} (T_x/n'k)] \\ &= \sum_1^k (T_i^2/n') + T_x^2/n'k - 2 T_x^2/n'k \\ &= \sum_1^k (T_i^2/n') - T_x^2/n'k \end{aligned}$$

visto que

$$\sum_1^k T_i = T_x \quad \text{e} \quad \sum_1^{n'} T_x = n' T_x$$

(2) A demonstração é semelhante à da nota (1):

$$\begin{aligned} \sum_1^{n'k} (x - \bar{x})^2 &= \sum_1^{n'k} (x^2 + \bar{x}^2 - 2x\bar{x}) = \sum_1^{n'k} (x^2) + \\ &\quad + \sum_1^{n'k} (T_x^2/n'^2 k^2) - 2 \sum_1^k (x \cdot T_x/n'k) \\ &= \sum_1^{n'k} (x^2) + (n'k T_x^2/n'^2 k^2) - 2 (T_x \cdot T_x/n'k) \\ &= \sum_1^{n'k} (x^2) - T_x^2/n'k \end{aligned}$$

dades (1), (2) e (3) continuam a valer substituindo n/k por $\sum_i^k n'_i$ em que n'_i se refere ao número de observações dentro de cada grupo (diferente de grupo para grupo). Da mesma maneira, nas referidas igualdades substitui-se n' por n'_i . Facilmente se reconhece que as equações fundamentais continuam a valer. No entanto, no caso de número diferente de observações em cada grupo e quando há heterogeneidade, perde-se uma certa parte da informação que se poderia colher a partir dos dados se houvesse o mesmo número em todos os grupos.

*

*

*

Na *Tabela IX* estão os valores necessários para se proceder à análise da variância da cor da pele (gradação do «preto» do pigmentómetro) para portugueses de 8 a 22 anos, sem qualquer mistura aparente com outras populações.

TABELA IX

Anos	T_i	n'_i	T_i^2/n'_i	$\sum_1^{n'_i} x^2$
8	41.5	21	82.01	85.17
9	31.0	17	56.53	58.04
10	33.4	17	65.62	64.70
11	38.8	21	71.69	74.10
12	64.0	30	136.53	148.64
13	39.3	22	70.20	73.49
14	46.3	23	93.20	96.57
15	42.9	19	96.86	102.70
16	46.4	23	93.60	99.30
17	41.9	21	83.60	89.99
18	33.0	17	64.06	67.96
19	21.0	10	44.10	47.98
20	8.1	4	16.40	17.37
21	11.4	6	21.76	25.36
22	4.8	3	7.68	8.10
	503.8	254	1003.74	1059.47

Outro ponto importante quando se procede à análise da variância é o da determinação do número de *graus de liberdade*. Como se sabe, o número de graus de liberdade pode considerar-se igual ao número de valores diferentes que pode tomar a variável mantendo-se os totais. Sendo n' casos, com um total T_x , o número de graus de liberdade é $(n' - 1)$; 1 valor

de x é fixo para que se mantenha $\sum_1^{n'} x = T_x$. Desta maneira, os *graus de liberdade para a soma de quadrados total* são $(\sum_1^k n'_i - 1)$, isto é, o número total de observações menos 1. Para a soma de quadrados entre os grupos, os *graus de liberdade* são $(k - 1)$. Por diferença obtêm-se os *graus de liberdade referentes à soma de quadrados dentro dos grupos*, que serão $[(\sum_1^k n'_i - 1) - (k - 1)] = \sum_1^k (n'_i - 1)$.

Para calcular as variâncias dividem-se as somas de quadrados pelos respectivos graus de liberdade. Assim se obtêm as chamadas *somas de quadrados médias* ou *variâncias*, referidas ao total, entre os grupos, e dentro dos grupos. O julgamento da variância entre os grupos faz-se comparando-a com a variância dentro dos grupos, considerando esta última como erro.

Da tabela IX extraem-se as seguintes somas de quadrados:

Soma de quadrados *total* .

$$\begin{aligned} \Sigma (x - \bar{x})^2 &= 1059.47 - 503.8^2 / 254 \\ &= 60.20. \end{aligned}$$

Soma de quadrados *entre os grupos*

$$\begin{aligned} n'_i \Sigma_1^k (\bar{x}_i - \bar{x})^2 &= 1003.74 - 503.8^2 / 254 \\ &= 4.47. \end{aligned}$$

A soma de quadrados *dentro dos grupos* é igual à diferença entre estas duas.

A análise da variância propriamente dita está exposta na *Tabela X*. As variâncias entre os grupos e dentro dos grupos (ou nos grupos) servem para se calcular o estatístico F, dividindo a variância entre os grupos pela variância nos grupos, visto esta representar as flutuações devidas ao acaso. As tábuas de F estão calculadas de forma que apenas têm valores positivos maiores que 1, o que se consegue dividindo sempre a variância maior pela menor e atendendo aos respectivos graus de liberdade (n_1 refere-se sempre aos graus de liberdade da variância maior). Como a distribuição de F é conhecida (FISHER 1932 — 1/2 *lg. nat.* F; ou SNEDECOR 1934) vê-se se o valor obtido para F está contido dentro de um certo limite de significação, se está abaixo (ou acima) de uma certa significância.

Na tabela X e nas restantes referidas ao mesmo assunto

S. *q.* designa soma de quadrados; G. *l.* os graus de liberdade;
S. *q. m.* as somas de quadrados médias ou variâncias.

TABELA X

	S. <i>q.</i>	G. <i>l.</i>	S. <i>q. m.</i>	F	F 5%
Entre os grupos	4.47	14	0.319	1.369	2.13
Nos grupos	55.73	239	0.333		
Total	60.20	253	0.23794		

Como se vê pela tabela, $F = 1.369$. Na tabela de SNEDECOR vem

para $n_1 = \infty$

$n_2 = 14$ $F = 2.13$, quando $P = .05$

Tem que se tomar $n_1 = \infty$ visto que se usou para denominador quando do cálculo de F a variância entre os grupos e nas tabelas acima de $n_1 = 24$ encontra-se apenas $n_1 = \infty$. O que se verifica é que o F obtido é muito menor do que o correspondente ao ponto 5%, ou seja, ao nível de significação. Uma particularidade interessante desta análise é a existência de uma variância entre as médias dos grupos maior que a variância dentro dos grupos. Só esta última pode ser considerada como erro, pois que apenas dentro dos grupos as flutuações se devem mostrar com carácter ocasional. A variância entre as médias dos grupos é, claramente, muito pequena em relação às flutuações do acaso.

Em todo o caso, o que interessa neste ponto é que o F obtido é menor do que o F significativo. Portanto, a julgar pelos dados conseguidos com o pigmentómetro e nas populações estudadas, *não há evidência de no sexo masculino existir um escurecimento com a idade da cor da pele entre os 8 e os 22 anos.*

Visto que há homogeneidade no conjunto das amostras observadas, podem-se considerar tôdas como pertencendo à mesma população e calcular-se uma média geral representativa de toda a população, bem como um desvio-padrão geral. *A média geral é:*

$$\bar{x} = 503.8 / 254 = 1.98$$

e o *desvio-padrão geral:*

$$s = \sqrt{0.23794} = 0.488.$$

Este desvio-padrão é a raiz quadrada da variância total — esta é obtida pela divisão da soma de quadrados total pelos respectivos graus de liberdade.

A significância de \bar{x} deve ser elevada; no entanto, para um julgamento mais seguro convém calcular o estatístico t :

$$t = \bar{x} / s_m,$$

em que

$$s_m = s / \sqrt{n'}$$

Para a média acima é:

$$\begin{aligned} t &= 1.98 \cdot \sqrt{254} / 0.488 \\ &= 64.66 \end{aligned}$$

e, como era de esperar, este valor é altamente significativo. Com efeito,

$$\begin{array}{ll} \text{para } P = .01, n = 200, & \text{é } t = 2.601 \\ & n = 300, \quad t = 2.592, \end{array}$$

isto é, os valores de t correspondentes aos graus de liberdade neste caso existentes (graus de liberdade representados por $n = n' - 1$) dados pelas tabelas de SNEDECOR (1) são muito menores do que o valor encontrado, mesmo para o nível de significação 1% ($P = .01$). A probabilidade que um tal valor da média ocorra por acaso é, portanto, menor do que 1%, como era de esperar.

Igualmente se podia usar o *erro-padrão* (erro médio) da média, calculado da maneira habitual:

$$e_x = \sqrt{\frac{s^2}{n'}} = 0.0306.$$

Segundo as indicações desta análise da variância, conclui-se que os Portugueses adultos do sexo masculino (parece que desde os 8 anos a pigmentação da pele não sofre, em média, grandes

(1) Estas tabelas são uma extensão das de FISHER, que têm t para maior número de graus de liberdade.

alterações), têm em média uma pigmentação da pele com 1.98, aproximadamente 1.20, da escala do pigmentómetro (2).

*

*

*

Para os filtros «amarelo» e «vermelho» foram obtidas nas mesmas observações, as médias da *Tabela XI*. Os números de observações para cada idade são, portanto, os mesmos da tabela para o «preto».

TABELA XI

Anos	F. amarelo	F. vermelho
8	2.52	3.00
9	2.32	2.81
10	2.54	2.96
11	2.34	2.79
12	2.75	3.29
13	2.37	2.85
14	2.65	3.16
15	2.99	3.37
16	2.67	3.09
17	2.51	3.14
18	2.63	3.24
19	2.73	2.98
20	2.78	3.13
21	2.55	3.10
22	1.97	2.60

Observando as diferenças das médias das várias idades, facilmente se crê que não deve haver heterogeneidade e, sendo assim, poder-se-iam calcular médias gerais como para o caso do «preto». Tais médias são: para o «amarelo» $\bar{x} = 2.58$ e para o «vermelho» $\bar{x} = 3.06$; de forma que a cor da pele para os Portugueses será, expressa na graduação do pigmentómetro:

$$3.06 : 2.58 : 1.98,$$

respectivamente para os filtros «vermelho», «amarelo» e «azul».

(2) Conforme o que disse no cap. anterior, isto só é válido como exactidão para um mesmo observador.

Côr da pele — ♀. — Os dados colhidos para o sexo feminino estendem-se entre os 7 e os 19 anos e dizem também respeito à pigmentação do ante-braço esquerdo. O número de observações é igualmente variável para cada idade e em regra maior do que para os ♂. As médias e desvios-padrões referidas à gradação do filtro «azul» estão na *Tabela XII*. Os números de observações para cada ano são os mesmos da tabela XIII, coluna n'_i .

TABELA XII

Anos	Média	Desvio-padrão
7	1.86	0.30
8	1.91	0.29
9	1.91	0.38
10	1.89	0.21
11	1.82	0.26
12	1.92	0.27
13	1.89	0.24
14	1.88	0.26
15	1.80	0.23
16	1.75	0.29
17	1.84	0.26
18	1.72	0.14
19	1.85	0.08

As diferenças entre as médias são pequenas, os desvios-padrões são também muito aproximados. Como para os ♂, procedi a uma análise da variância pelo processo descrito.

Os elementos para esta análise estão calculados na *Tabela XIII*.

TABELA XIII

Anos	T_i	n'_i	T_i^2/n'_i	
7	22.3	12	41.44	42.43
8	62.9	33	119.89	122.57
9	68.9	36	131.86	137.01
10	66.2	35	125.21	126.78
11	100.0	55	181.82	185.42
12	86.3	45	165.50	168.81
13	111.6	59	211.09	214.34
14	86.3	46	161.91	164.85
15	74.0	41	133.56	135.72
16	52.5	30	91.88	94.37
17	34.9	19	64.11	65.29
18	17.2	10	29.58	29.76
19	11.1	6	20.54	20.57
	<hr/> 794.4	<hr/> 427	<hr/> 1478.39	<hr/> 1507.92

A partir da tabela, obtém-se para a soma de quadrados *total*

$$\begin{aligned}\Sigma (x - \bar{x})^2 &= 1507.92 - 794.2^2 / 427 \\ &= 30.75\end{aligned}$$

e para a soma de quadrados *entre os grupos*

$$\begin{aligned}n_i' \Sigma_1^k (\bar{x}_i - \bar{x})^2 &= 1478.39 - 794.2^2 / 427 \\ &= 1.22.\end{aligned}$$

Manifestamente, a soma de quadrados entre os grupos é muito pequena, de forma que o resultado final deve ser a verificação de homogeneidade. Na *Tabela XIV* está expresso o resultado da análise.

TABELA XIV

	S. q.	G. L.	S. q. m.	F	F 5%
Entre os grupos	1.22	12	0.102	1.437	1.78-1.77
Nos grupos	29.53	414	0.071		
Total	30.75	426	0.07218		

Os valores de F que vêm nas tabelas são :

$$\begin{aligned}\text{para } P = .05 \quad n_1 &= 12 \\ n_2 &= 400 \quad F = 1.78 \\ n_1 &= 12 \\ n_2 &= 500 \quad F = 1.77\end{aligned}$$

Portanto, o valor de F obtido é inferior ao correspondente ao nível 5% — não há heterogeneidade.

Como para o masculino, também *para o sexo feminino não há heterogeneidade, isto é, entre os 7 e os 19 anos não se demonstra, com os processos usados, nenhum escurecimento com a idade.*

Sendo assim, é possível calcular uma média geral válida. O seu valor é :

$$\begin{aligned}\bar{x} &= 794.2 / 427 \\ &= 1.86\end{aligned}$$

e o desvio-padrão geral :

$$\begin{aligned}s &= \sqrt{0.07218} \\ &= 0.269\end{aligned}$$

A média geral é representativa, como se vê calculando o respectivo t :

$$\begin{aligned} t &= 1.86 \cdot \sqrt{427} / 0.269 \\ &= 142.58 \end{aligned}$$

Para o caso em que $n = n' - 1 = 400$ é $t = 2.588$ no ponto 1%; para $n = 500$ $t = 2.586$, também no ponto 1%. A média é, portanto, altamente significativa, como era de esperar.

Podia-se calcular igualmente o *erro-padrão* da média:

$$e_{\bar{x}} = 0.0130.$$

*

* *

Outra questão que aparece é a da diferença entre as médias gerais dos dois sexos. É interessante verificar se existe qualquer diferença apreciável por meio destas determinações quantitativas, tanto mais que as diferenças na pigmentação até agora assinaladas entre os dois sexos são geralmente estabelecidas a partir de estatísticas que apenas consideram categorias de ordem qualitativa. Entre as duas médias há uma diferença

$$\begin{aligned} \bar{x}_m - \bar{x}_f &= 1.983 - 1.859 \\ &= 0.124. \end{aligned}$$

Para se saber o significado de uma diferença, o processo mais exacto consiste em achar o estatístico t correspondente:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s} \sqrt{\frac{(n_1 + 1)(n_2 + 1)}{n_1 + n_2 + 2}}$$

em que

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_1 - \bar{x}_1)^2 + \sum (x_2 - \bar{x}_2)^2}{n_1 + n_2}}$$

Nestas expressões as letras têm o significado que lhe tem

sido atribuído anteriormente; x_1 , bem como \bar{x}_1 e n_1 referem-se aos ♂ e x_2 , \bar{x}_2 e n_2 referem-se às ♀. No presente caso é:

$$s = \sqrt{\frac{60 \cdot 20 + 30 \cdot 75}{253 + 426}} = 0.3660$$

$$t = \frac{0.124}{0.3660} \cdot \sqrt{\frac{254 \cdot 427}{253 + 426 + 2}} \\ = 4.276$$

Nas respectivas tabelas não vem t para $n = n_1 + n_2 = 679$, mas vem para

$$P = .01 \quad n = 500 \quad t = 2.586 \\ n = 1000 \quad t = 2.581.$$

Portanto, o valor obtido para t é altamente significativo e a diferença entre as médias não pode ser atribuída ao acaso. Segundo os dados que obtive pelos processos descritos, os ♂ têm a pele mais escura que as ♀ e a diferença é de cerca de 0.1 da escala do pigmentómetro.

A interpretação desta diferença não me parece muito aparente. A sua grandeza não justifica que se façam hipóteses de ordem genética a que é costume recorrer, sem grande êxito, em tais casos. A cor da pele foi determinada no antebraço esquerdo, tanto num como noutro sexo. Na época em que foram efectuadas as determinações — Abril-Maio — já devia ter passado completamente, ou quási, o efeito do calor e «sol» do verão anterior. Contudo, muitos dos rapazes apresentavam ainda vestígios de forte exposição aos agentes exteriores. As raparigas apresentavam êste efeito menos freqüentemente. Todos os casos em que era notório o efeito da exposição, não foram considerados, mas é possível que os resultados se ressentam destas causas. A diferença de 0.1, embora significativa, é, na verdade, pequena, mas sugere a crença de realmente haver um pouco mais de «preto» na pele dos ♂, mesmo atêndendo a tôdas estas explicações. São necessárias mais determinações e em vários pontos do país antes de apresentar qualquer hipótese que não seja meramente especulativa.

*

*

*

Para os filtros «amarelo» e «vermelho» empregados na determinação da côr da pele das ♀ obtêm-se as médias da *Tabela XV*.

TABELA XV

Anos	F. amarelo	F. vermelho
7	2.29	2.93
8	2.36	2.97
9	2.44	3.05
10	2.35	2.92
11	2.23	2.82
12	2.39	2.93
13	2.33	2.82
14	2.33	2.62
15	2.17	2.69
16	2.16	2.60
17	2.19	2.74
18	2.07	2.47
19	2.37	2.67

As diferenças entre as médias das várias idades são pequenas e mais ou menos desordenadas, donde se conclui que é muito provável a homogeneidade da população quanto à côr medida pelos dois filtros, tal como para o «preto». A côr geral das ♀ portuguesas será, em unidades do pigmentómetro (as médias gerais para o «amarelo» e o «vermelho» são respectivamente 2.299 e 2.810):

$$2.81 : 2.30 : 1.86 .$$

As médias do «amarelo» e «vermelho» são também maiores do que para os ♂ em cêrca de 0.2 a 0.3 e as diferenças devem, igualmente, ser significativas. *Os ♂ das amostras por mim analisadas são em média um pouco mais fortemente pigmentados do que as ♀.*

*

*

*

Côr dos olhos — ♂. — A côr dos olhos foi determinada da maneira descrita anteriormente. Os dados aqui analisados referem-se apenas à zona interna, atendendo às razões expostas.

Outras conclusões interessantes se tirariam, sem dúvida, do estudo comparativo da estrutura e côr, mas esta parte fica reservada para trabalhos ulteriores.

A distribuição das observações quanto à idade é a mesma que para a pele. As médias e desvios-padrões para cada idade estão expostos na *Tabela XVI*. Os números de observações são os mesmos da tabela seguinte.

TABELA XVI

Anos	Média	Desvio-padrão
8	14.53	3.17
9	14.28	2.56
10	15.68	2.06
11	14.85	2.31
12	14.83	2.56
13	13.51	4.61
14	15.00	2.53
15	15.69	2.75
16	14.87	2.04
17	15.06	3.08
18	14.72	2.69
19	13.01	5.56
20	15.73	1.14
21	15.10	1.66
22	15.23	1.37

Não se observa qualquer variação regular das médias, de forma que parece não haver heterogeneidade. O desvio-padrão é bastante maior nalgumas idades, o que coincide quasi sempre com a existência de olhos puramente azuis, a que foi atribuído um valor 0. O cálculo das médias e desvios continua a ser feito por intermédio das fórmulas já descritas.

Tal como para a côr da pele, procedi a uma análise da variância. Os valores necessários para ela estão dispostos na *Tabela XVII*.

Para a soma de quadrados *total* obtém-se

$$\begin{aligned}\Sigma (x - \bar{x})^2 &= 57973.22 - 3784.0^2/257 \\ &= 2258.61\end{aligned}$$

e para a soma de quadrados *entre os grupos*

$$\begin{aligned}n'_i \Sigma_1^k (x_i - \bar{x})^2 &= 55811.23 - 3784.0^2/257 \\ &= 96.62.\end{aligned}$$

O valor da soma de quadrados entre os grupos é pequeno comparado com o total, de forma que é de esperar que não

TABELA XVII

Anos	T_i	n_i'	T_i^2/n_i'	$\sum_1^{n_i'} x^2$
8	305.1	21	4432.66	4635.13
9	242.8	17	3467.76	3555.42
10	256.3	17	3864.10	3931.81
11	326.8	22	4854.47	4966.82
12	459.7	31	6816.91	7014.81
13	297.3	22	4017.60	4463.89
14	344.9	23	5172.00	5372.15
15	298.1	19	4677.03	4812.95
16	342.0	23	5085.39	5176.94
17	331.4	22	4992.09	5191.68
18	250.3	17	3685.30	3801.15
19	130.1	10	1692.60	1970.67
20	62.9	4	989.10	993.03
21	90.6	6	1368.06	1386.88
22	45.7	3	696.16	699.89
	<u>3784.0</u>	<u>257</u>	<u>55811.23</u>	<u>57973.22</u>

h: ja heterogeneidade. A análise encontra-se na *Tabela XVIII*.

TABELA XVIII

	S. q.	G. l.	S. q. m.	F	F 5%
Entre os grupos	96.62	14	6.901	1.295	2.13
Nos grupos	<u>2161.99</u>	<u>242</u>	<u>8.934</u>		
Total	<u>2258.61</u>	<u>256</u>	<u>8.8227</u>		

F é, neste caso, muito menor do que o correspondente ao ponto 5%, visto que:

$$\text{para } n_1 = \infty \\ n_2 = 14 \quad P = .05 \quad F = 2.13,$$

Tem que se tomar $n_1 = \infty$ pela razão já apontada a propósito da cor da pele nos δ . Conclui-se, portanto, que há homogeneidade no material estudado.

Como para a cor da pele, no sexo masculino não se demonstra um escurecimento com a idade que se faça notar no aumento ou diminuição aparente do «preto» da zona interna dos olhos. É possível que haja uma certa variação na distribuição do pigmento, na dependência dos processos metabólicos do estroma da íris, ou de outras causas, mas tais variações não se fazem notar sensivel-

mente no «preto» da coloração da zona interna de forma que depois dos 7 anos e até aos 22 se encontre um escurecimento médio evidente.

Como há homogeneidade, calculei a *média geral* :

$$\begin{aligned}\bar{x} &= 3784.0 / 257 \\ &= 14.72.\end{aligned}$$

O *desvio-padrão geral* pode também ser calculado a partir da soma de quadros total :

$$\begin{aligned}s &= \sqrt{8.82269} \\ &= 2.970.\end{aligned}$$

O desvio-padrão é relativamente alto comparado com o da pele. De facto, a coloração dos olhos mostra uma grande variabilidade, desde a ausência de pigmentos na região anterior ou estroma da iris até ao castanho muito escuro.

É natural que a média geral tenha significância, o que se pode comprovar calculando o respectivo *t* :

$$\begin{aligned}t &= 14.72 \cdot \sqrt{257} / 2.970 \\ &= 79.488.\end{aligned}$$

Para $n = 200$ é $t = 2.601$ no ponto $P = .01$ e para $n = 300$ é $t = 2.592$ igualmente no ponto 1% . A média merece, portanto, confiança — é altamente significativa. Aliás, para média de tal grandeza e com o desvio-padrão encontrado bastava $n' = 3$ para se obter um *t* significativo.

O *erro-padrão* da média é :

$$e_{\bar{x}} = 0.1075.$$

*

* * *

As médias para os outros dois filtros (*Tabela XIX*) são um tanto semelhantes, e não mostram qualquer tendência com a idade, são mais ou menos desordenadas. Como para o «preto», é natural que não haja heterogeneidade no colectivo estudado ;

as médias gerais são $\bar{x} = 18.81$ para o «amarelo» e $\bar{x} = 16.92$ para o «vermelho». A coloração geral da zona interna dos

TABELA XIX

Anos	F. amarelo	F. vermelho
8	18.66	16.80
9	18.74	16.95
10	19.59	17.41
11	19.03	17.33
12	18.91	16.77
13	16.90	15.13
14	19.26	17.30
15	19.46	16.63
16	19.17	17.15
17	18.99	17.27
18	18.75	17.02
19	16.73	15.14
20	20.15	18.25
21	19.33	17.20
22	19.93	18.00

olhos dos Portugueses, supondo que depois dos 22 anos não há escurecimento com a idade, tal como acontece entre os 7 e 22, será:

$$16.92 : 18.81 : 14.72,$$

respectivamente para os filtros «vermelho», «amarelo» e «azul».

Côr dos olhos — ♀. — Na determinação da côr dos olhos no sexo feminino foi seguido o mesmo método que nos ♂. As médias para o «preto» nas várias idades estão, conjuntamente com os desvios-padrões, na *Tabela XX*, em que o número de observações é o mesmo que se encontra na tabela XXI, coluna n_i' .

TABELA XX

Anos	Média	Desvio-padrão
7	12.90	5.68
8	15.24	2.66
9	14.33	3.40
10	14.54	3.15
11	15.08	3.33
12	14.88	2.82
13	14.55	2.56
14	15.18	2.76
15	13.90	2.72
16	13.37	3.77
17	14.92	2.63
18	14.69	3.15
19	16.02	2.28

A julgar pela irregularidade da distribuição das médias, não deve haver heterogeneidade. A análise da variância foi feita utilizando os dados da *Tabela XXI*.

TABELA XXI

Anos	T_i	n_i'	T_i^2/n_i'	$\sum_1^{n_i'} x^2$
7	154.8	12	1996.92	2352.40
8	502.8	33	7660.84	7887.72
9	515.8	36	7390.27	7795.26
10	508.8	35	7396.50	7734.12
11	829.4	55	12507.35	13106.76
12	669.4	45	9957.70	10308.00
13	858.4	59	12488.99	12868.46
14	698.5	46	10606.57	10949.00
15	570.1	41	7927.17	8222.37
16	414.6	31	5544.94	5942.22
17	283.4	19	4227.13	4351.36
18	146.9	10	2157.96	2242.09
19	96.1	6	1539.20	1565.23
	<hr/> 6249.0	<hr/> 428	<hr/> 91401.54	<hr/> 95324.99

A soma de quadrados *total* é

$$\begin{aligned}\Sigma (x - \bar{x}) &= 95324.99 - 6249.0^2 / 428 \\ &= 4086.67\end{aligned}$$

e a soma *entre os grupos*

$$\begin{aligned}n_i' \Sigma_1^k (\bar{x}_i - \bar{x})^2 &= 91401.54 - 6249.0^2 / 428 \\ &= 163.22.\end{aligned}$$

A soma de quadrados entre os grupos é bastante maior do que a correspondente para os δ (mesmo em relação ao total); contudo, é de esperar que não haja heterogeneidade. Na *Tabela XXII* está realizada a parte final da análise.

TABELA XXII

	S. q.	G. l.	S. q. m.	F	F 5%
Entre os grupos	163.22	12	13.602	1.438	1.78-1.77
Nos grupos	<hr/> 3923.45	<hr/> 415	<hr/> 9.454		
Total	<hr/> 4086.67	<hr/> 427	<hr/> 9.5706		

O valor obtido para F é menor do que o correspondente ponto 5%, visto que para $P = .05$ é:

$$\begin{array}{l} \text{para } n_1 = 12 \\ n_2 = 415 \quad F = 1.78 \end{array}$$

$$\begin{array}{l} n_1 = 12 \\ n_2 = 500 \quad F = 1.77. \end{array}$$

Como F diminui quando n_1 e n_2 aumentam, pode-se concluir que realmente o F encontrado significa que não há heterogeneidade.

Também *no sexo feminino a análise atrás exposta não suporta a conclusão da existência dum escurecimento com a idade, na zona interna da iris, depois dos 7 anos e até aos 19.*

Os resultados são concordes nos dois sexos: na zona interna não há escurecimento demonstrável com os métodos usados. Parece provável que, a haver escurecimento da iris com a idade, a zona interna se ressentisse também. O estroma da iris é natural que se modifique um pouco com várias acções do «meio» interno, porém a zona interna, como elemento mais constante, não se deve modificar muito, pelo menos depois dos 7 anos, e até o comêço da velhice.

Vários autores, como já referi, dizem que há escurecimento da côr dos olhos com a idade. Por exemplo, HESCH 1931 diz que aparecem mais zonas internas escuras quando a idade vai aumentando; mas, na realidade, parece que o método de que HESCH se serviu não era muito próprio para tirar estas conclusões, visto ter estudado populações de várias idades qualitativa e não quantitativamente, isto é, agrupando os olhos em castanhos, claros, escuros, etc. O estudo de GODIN também não assenta sôbre dados quantitativos e não considera as colorações das diversas zonas em separado. As conclusões a que cheguei com o método usado devem, portanto, ser válidas.

A *média geral* para o sexo feminino é:

$$\begin{aligned} \bar{x} &= 6249.0/428 \\ &= 14.60. \end{aligned}$$

Para o *desvio-padrão geral* obtém-se

$$s = \sqrt{9.5706} \\ = 3.094.$$

A média é significativa, como se demonstra calculando o respectivo t :

$$t = 14.60 \cdot \sqrt{428/3.094} \\ = 97.674,$$

emquanto que o valor de t para os correspondentes graus de liberdade e $P=.01$ é 2.588 (para $n=400$, $P=.01$ é $t=2.588$ e para $n=500$, $P=.01$ $t=2.586$). Também se chegava à conclusão de que a média é representativa calculando o respectivo *erro-padrão*:

$$e_{\bar{x}} = 0.0850.$$

Embora o fim dêste trabalho não seja, pròpriamente, averiguar das diferenças sexuais, é interessante ver se existe alguma diferença estatisticamente comprovável entre as duas médias para o «preto» da zona interna da iris.

A média para os \mathcal{J} é maior, com uma diferença:

$$x_m - x_f = 14.723 - 14.600 \\ = 0.123$$

e para julgar o seu significado calcula-se t , como para o caso da diferença na côr da pele:

$$s = \sqrt{\frac{2258.61 + 4086.67}{256 + 427}} = 3.048 \\ t = \frac{0.123}{3.048} \sqrt{\frac{257 \cdot 428}{257 + 428}} \\ = 0.551$$

Nas tabelas vem para $n=500$, $P=.05$ $t=1.965$ e para $n=1000$, $P=.05$ $t=1.962$; conclui-se que o valor encontrado para a diferença não é significativo, embora seja quasi exactamente igual à diferença entre a côr da pele nos dois

sexos. A probabilidade de ocorrência fortuita de um valor de t como o obtido, é muito grande; tomando $n = \infty$ nas táboas de FISHER encontra-se um valor de t aproximado do que está acima para $P = .6.$, isto é, aproximadamente 60%.

*

* *

As determinações para o sexo feminino fornecem ainda as médias do filtro «amarelo» e do «vermelho» expostas na *Tabela XXIII*, em que os números de observações são os mesmos da tabela referente ao «preto».

TABELA XXIII

Anos	F. amarelo	F. vermelho
7	16.03	14.58
8	19.31	17.28
9	18.23	16.38
10	18.41	16.63
11	18.93	17.06
12	18.88	17.21
13	18.91	16.89
14	19.82	17.21
15	18.43	16.44
16	17.31	15.37
17	19.13	17.13
18	18.90	17.14
19	19.85	18.00

As médias apresentam diferenças da ordem das correspondentes ao «preto», de forma que é muito provável que também aqui haja homogeneidade.

As respectivas médias são $x = 18.720$ e $x = 16.760$, o que dá para coloração geral da zona interna dos olhos, nas φ :

$$16.76 : 18.72 : 14.60,$$

respectivamente para os filtros «vermelho», «amarelo» e «azul».

Côr do cabelo — δ . — Para a côr do cabelo, os vários autores são unânimes em admitir um escurecimento com a idade, pelo menos em certas populações. As observações têm sido quasi sempre de natureza qualitativa e as percentagens estabelecidas por certos autores nem sequer têm significado estatístico seguro. O melhor seria também para este caso, seguir os

mesmos indivíduos durante vários anos. Estão nestas condições as observações de GODIN, efectuadas entre os 13 e os 17 anos. Para GODIN o que é decisivo na mudança da cor do cabelo, como na dos olhos, é a puberdade. Tal interpretação parece um tanto levada ao extremo, pois facilmente se observa em muitas crianças (por exemplo, muitas crianças portuguesas) que as mudanças mais profundas da cor do cabelo se dão em regra antes, ou próximo e pouco depois, dos 10 anos, e por vezes logo nos primeiros meses de vida extra-uterina. O escurecimento dá a impressão de ser mais ou menos contínuo.

O tratamento estatístico dos dados que colhi fornece algumas indicações interessantes sobre o assunto. As médias e desvios-padrões para o «preto» nas várias idades estão na *Tabela XXIV*. O número de observações é o mesmo da tabela seguinte, coluna n_i' .

TABELA XXIV

Anos	Média	Desvio-padrão
8	13.12	0.95
9	12.78	0.75
10	13.08	0.97
11	13.34	1.37
12	13.52	1.36
13	13.13	1.11
14	13.28	1.15
15	14.13	1.34
16	13.70	0.93
17	14.13	1.30
18	14.12	1.47
19	13.92	1.65
20	14.95	0.86
21	14.10	1.69
22	14.80	0.63

Nota-se uma tendência para as médias aumentarem com a idade, dentro do período considerado; é natural que se verifique um aumento da pigmentação com a idade. Em todo o caso, é preciso, em primeiro lugar, verificar se há heterogeneidade, ou se, pelo contrário, as diferenças entre as médias se podem atribuir a flutuações ocasionais. Na *Tabela XXV* estão os principais dados para o estabelecimento das somas de quadrados.

A soma de quadrados *total* é:

$$\begin{aligned} \Sigma (x - \bar{x})^2 &= 46930.06 - 3431.0^2 / 253 \\ &= 401.37 \end{aligned}$$

e a soma de quadrados *entre os grupos*

$$n'_i \sum_1^k (\bar{x}_i - \bar{x})^2 = 46587.47 - 3431.0^2 / 253 \\ = 58.78.$$

TABELA XXV

Anos	T_i	n'_i	T_i^2/n'_i	$\sum_1^{n'_i} x^2$
8	275.5	21	3614.30	3632.37
9	217.2	17	2775.05	2784.16
10	209.3	16	2737.91	2751.97
11	293.5	22	3915.56	3954.77
12	419.2	31	5668.67	5723.96
13	262.5	20	3445.32	3468.69
14	305.5	23	4057.85	4086.75
15	254.4	18	3595.52	3626.04
16	315.2	23	4319.61	4338.54
17	310.8	22	4390.76	4426.08
18	240.0	17	3388.24	3414.21
19	139.2	10	1937.66	1962.08
20	59.8	4	894.01	895.40
21	84.6	6	1192.86	1207.14
22	44.3	3	654.16	657.90
	<u>3431.0</u>	<u>253</u>	<u>46587.47</u>	<u>46930.06</u>

Com estes valores realiza-se a análise da variância exposta na *Tabela XXVI*.

TABELA XXVI

	S. q.	G. l.	S. q. m.	F	F 0%	F 0%
Entre os grupos	58.78	14	4.198	2.917	1.80-1.79	2.28-2.24
Nos grupos	<u>342.59</u>	<u>238</u>	<u>1.439</u>		<u>1.57-1.54</u>	<u>1.88-1.85</u>
Total	401.37	252				

O valor de F é maior do que o correspondente ponto 1 0% e, com maioria de razão, do que o ponto 5 0%. Com efeito, nas tabelas de F encontra-se:

para $n_1 = 12$			
$n_2 = 200$	P = .01	F = 2.28	
$n_1 = 12$			
$n_2 = 300$	P = .01	F = 2.24	
$n_1 = 24$			
$n_2 = 200$	P = .01	F = 1.88	
$n_1 = 24$			
$n_2 = 300$	P = .01	F = 1.85	

Não é preciso interpolar para se ver que o F obtido é altamente significativo, visto ser maior que o F correspondente a menos graus de liberdade. A variância entre as médias das várias idades é significativamente maior que o erro; portanto, há heterogeneidade. Os ♂ das várias idades não formam, a respeito da cor do cabelo, uma única população: a heterogeneidade deve provir do escurecimento com a idade.

Pode-se concluir desta análise que *no sexo masculino há, quanto à cor do cabelo, diferenças entre os 8 e 22 anos e existe um escurecimento com a idade* (1). Esta conclusão refere-se ao «preto», mas pode igualmente aplicar-se aos outros filtros, como exponho a seguir.

*

*

*

As graduações dos outros dois filtros são muito aproximadas das do «azul», de forma que as respectivas médias mostram diferenças da ordem das do «preto». Na *Tabela XXVII* estão expostas as médias obtidas, sendo os números de observações os já conhecidos para a análise da variância.

TABELA XXVII

Anos	F. amarelo	F. vermelho
8	13.35	13.87
9	13.76	13.74
10	13.91	13.89
11	14.07	14.05
12	14.30	14.37
13	13.92	13.90
14	14.17	14.15
15	14.66	14.71
16	14.39	14.47
17	14.80	14.94
18	14.62	14.69
19	14.58	14.64
20	15.58	15.40
21	14.70	14.55
22	15.20	15.07

Verifica-se que as médias do «amarelo» e do «vermelho» são quasi iguais para cada ano. O paralelismo entre os dois

(1) A prova da última proposição encontra-se adiante.

filtros, e entre cada um deles e o «azul», é tal que parece poder-se legitimamente inferir que as conclusões que se tiraram para o último são válidas geralmente.

*

* *

Em virtude de haver heterogeneidade, não é lícito calcular uma média geral como representativa de tódã a população, principalmente quando se fazem comparações com adultos. Igualmente, um desvio-padrão geral não se pode calcular em virtude de haver heterogeneidade e o número de observações ser diferente para cada grupo (idade).

Como se vê pelos resultados da análise que efectuei, é conveniente traçar a linha de regressão a partir da respectiva equação, o que permite provar que o escurecimento com a idade é a causa da heterogeneidade.

Como é usual, a primeira linha que se procura ajustar é a recta de regressão. A equação da recta é da forma :

$$Y = a + bx, \quad \dots\dots\dots (1)$$

equação que para o caso de se entrar em linha de conta com as médias de y (representada por \bar{y}) e de x (representada por \bar{x}) se transforma em

$$Y - \bar{y} = a + b(x - \bar{x}), \quad \dots\dots\dots (2)$$

onde a e b são constantes e Y funciona como variável dependente. Pelo método dos «menores quadrados» (v. por exemplo YULE E KENDALL 1937, ou TIPETT 1931) conclui-se que a equação dá o melhor ajustamento quando a soma dos desvios dos valores achados para os calculados é mínima, isto é, quando $\Sigma (y - Y)^2 = \text{mínimo}$. A equação (2) dá o melhor ajustamento quando

$$a = 0 \quad \text{e} \quad b = \frac{\Sigma y (x - \bar{x})}{\Sigma (x - \bar{x})^2}.$$

Nestas condições, a equação (2) transforma-se em

$$Y = \bar{y} + b(x - \bar{x}) \quad \dots\dots\dots (3)$$

No presente caso, y representa o «preto» do cabelo, tal como é dado pela escala do pigmentómetro, Y representa os respectivos valores *calculados*, isto é, computados a partir da linha de regressão, e x representa a idade em anos. É preciso calcular b , o chamado *coeficiente de regressão*. Uma fórmula conveniente para tal fim é a seguinte:

$$b_{yx} = \frac{\Sigma (x.y) - T_x \cdot T_y / n'}{\Sigma (x^2) - T_x^2 / n'}$$

em que T_x e T_y são os totais de x e de y , respectivamente; n' é o número de pares de observações de x e y conjuntamente; b_{yx} significa regressão de y sobre x e Y serve como variável independente (correspondendo a y).

No caso de que estou tratando, calculei b da seguinte forma:

$$\begin{aligned} b_{yx} &= \frac{47255.0 - 3467.0 \cdot 3431.0 / 253}{50447.0 - 3467.0^2 / 253} \\ &= 0.0811. \end{aligned}$$

A equação de regressão é, portanto:

$$Y = 13.561 + 0.0811 (x - 13.704),$$

ou

$$Y = 12.450 + 0.0811 x,$$

visto que as médias de y e x são respectivamente 13.561 e 13.704.

Esta recta está representada na *fig. 5*, conjuntamente com a linha que se obtém unindo as médias das várias idades (página seguinte).

Verifica-se que o ajustamento da recta não parece muito satisfatório. As médias mostram uma tendência a aumentar com a idade, mas há irregularidades, provenientes, pelo menos em parte, do pequeno número de observações. Para julgar com exactidão se o ajustamento é razoável, é preciso efectuar outras análises, a que vou proceder.

*

*

*

Em primeiro lugar, convém verificar o significado da regressão, o que se pode fazer, ou por intermédio do estatístico t , ou

efectuando uma análise da variância. Pelo primeiro processo é preciso calcular :

$$t = b_{yx} / s_b,$$

em que

$$s_b = \sqrt{\frac{\sum (y - Y)^2}{n' - 2}} / \sqrt{\sum (x - \bar{x})^2}.$$

s_b representa o erro de b_{yx} . O numerador de s_b corresponde ao erro da regressão calculada. Para o cálculo de $\sum (y - Y)^2$ recorre-se à equação de regressão e à identidade $\sum (y - Y)^2 = \sum [(Y - \bar{y}) - (y - \bar{y})]^2$, que conduzem à seguinte expressão final, que se usa na prática : $\sum (y - Y)^2 = \sum (y - \bar{y})^2 - b^2 \cdot \sum (x - \bar{x})^2$.

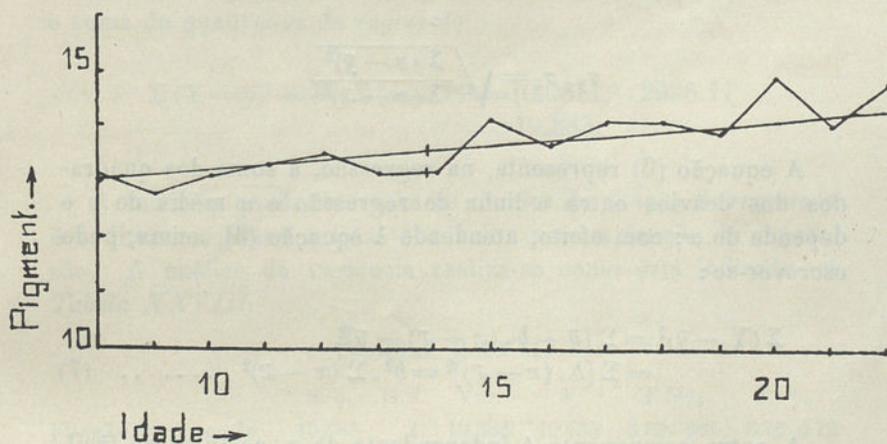


FIG. 5

Recta de regressão para o «preto» (em unidades do pigmentómetro) da cor do cabelo, nos \mathcal{J} . Conjuntamente, as médias das várias idades (em anos).

Depois de calculado o t , procura-se o valor que vem nas tabelas, para ver qual a sua significação; os graus de liberdade são $(n' - 2)$, visto que 2 graus são absorvidos quando do cálculo de a e b , as duas constantes da equação de regressão.

O outro método consiste em comparar a variância devida à função de regressão com o erro, ou seja, com a variância dos desvios desta função. A equação fundamental para a análise é :

$$\sum (y - \bar{y})^2 = (1 - r^2) \cdot \sum (y - \bar{y})^2 + r^2 \cdot \sum (y - \bar{y})^2, \dots (4)$$

que é, evidentemente, uma identidade. A soma $\Sigma (y - \bar{y})^2$ representa a soma de quadrados *total* para a variável dependente. Pode-se considerar constituída por duas partes adicionáveis :

$$(1 - r^2) \cdot \Sigma (y - \bar{y})^2 = \Sigma (y - Y)^2 \quad \dots \dots \dots (5)$$

e

$$r^2 \cdot \Sigma (y - \bar{y})^2 = \Sigma (Y - \bar{y})^2 \quad \dots \dots \dots (6)$$

As igualdades (5) e (6) verificam-se atendendo a que ao coeficiente de correlação r corresponde uma equação de regressão $Y = a + bx$, sendo $r_{xy} = b_{yx} / \sigma_y / \sigma_x$ ou $r_{xy} = b_{xy} / \sigma_x / \sigma_y$ onde b_{xy} representa o coeficiente de regressão de x sobre y ; σ_x e σ_y são os desvios-padrões de x e y , respectivamente, sendo

$$\sigma_y / \sigma_x = \sqrt{\frac{\Sigma (y - \bar{y})^2}{\Sigma (x - \bar{x})^2}}$$

A equação (6) representa, na regressão, a soma dos quadrados dos desvios entre a linha de regressão e a média de y e depende de x ; com efeito, atendendo à equação (3), acima, pode escrever-se :

$$\begin{aligned} \Sigma (Y - \bar{y})^2 &= \Sigma [\bar{y} + b \cdot (x - \bar{x}) - \bar{y}]^2 \\ &= \Sigma [b \cdot (x - \bar{x})]^2 = b^2 \cdot \Sigma (x - \bar{x})^2 \quad \dots \dots \dots (7) \end{aligned}$$

A outra componente é independente de x , como se vê facilmente atendendo ao que se disse acima, a propósito da maneira prática de calcular $\Sigma (y - Y)^2$, quando se tratou de t . A equação (5) mede, na regressão, a soma dos quadrados dos desvios entre os pontos calculados Y e os observados y . (5) pode, portanto, ser usada para comparação com (6), servindo a primeira como êrro. Assim se verifica se a função de regressão calculada é significativa, comparada com o êrro que ela envolve. Os graus de liberdade correspondentes a (5) e (6) são, respectivamente, $(n' - 2)$ e 1. O total envolve $n' - 1$ graus e a regressão apenas 1, visto que, atendendo a (7), se verifica que $\Sigma (Y - \bar{y})^2$ apenas depende, para a regressão, do estatístico b . Os desvios $\Sigma (y - Y)$ absorvem os restantes $(n' - 2)$ graus.

A partir dos valores encontrados para b e $\Sigma (x - \bar{x})^2 =$

$= \Sigma (x^2) - T_x^2/n'$, que já estão calculados, e de $\Sigma (y - \bar{y})^2$, também já conhecido da análise da variância para verificação da heterogeneidade da côr do cabelo, obtêm-se todos os estatísticos necessários. Para o cálculo de $\Sigma (y - Y)^2$ entra-se em conta com a igualdade (8), já conhecida :

$$\Sigma (y - Y)^2 = \Sigma (y - \bar{y})^2 - b^2 \cdot \Sigma (x - \bar{x})^2 \quad \dots \quad (8)$$

No caso de que estou tratando, as somas de quadrados são :
Soma de quadrados *total*

$$\Sigma (y - \bar{y})^2 = 401.37$$

e soma de quadrados da *regressão*

$$\begin{aligned} \Sigma (Y - \bar{y})^2 &= b^2 \cdot \Sigma (x - \bar{x})^2 = (0.0811)^2 \cdot 2936.77 \\ &= 19.383. \end{aligned}$$

A soma de quadrados para os *desvios da função de regressão* é a diferença entre o total e o valor para a função de regressão. A análise da variância realiza-se como está indicado na *Tabela XXVIII*.

TABELA XXVIII

	S. q.	G. l.	Var.	F	F 5%	F 1%
Função de regressão	19.383	1	19.383	12.735	3.89-3.87	6.76-6.72
Desvios da regressão	381.987	251	1.522			
Total	401.370	252				

O coeficiente calculado é altamente significativo, como se vê comparando o F obtido com o F correspondente, no ponto 1 0/0 :

$$\begin{aligned} \text{para } P = .01 \quad n_1 &= 1 \\ & n_2 = 200 \quad F = 6.76 \\ & n_1 = 1 \\ & n_2 = 300 \quad F = 6.72. \end{aligned}$$

Em relação ao ponto 5 0/0 ainda a diferença entre o F obtido e o da tabela é maior, evidentemente.

*

*

*

Outra questão, até certo ponto independente da significação, é a da verificação da *não-linearidade*.

Pela simples observação, parece que a recta de regressão se não ajusta muito bem aos dados. Procede-se à verificação da não-linearidade (ou linearidade) recorrendo a uma análise especial da variância. A equação fundamental para essa análise é:

$$\Sigma (y - \bar{y})^2 = \Sigma n'_p (y_p - \bar{y})^2 + \Sigma \Sigma (y - \bar{y}_p)^2, \quad \dots \quad (9)$$

em que \bar{y}_p é a média de cada grupo de valores de y , correspondente a cada valor \bar{x}_i da média de x ; n'_p é o número de observações em cada grupo.

A equação (9) é semelhante à equação fundamental da análise da variância e verifica-se algebricamente. Pode-se, pois, dividir a soma de quadrados total em duas:

$$\Sigma n'_p (\bar{y}_p - \bar{y})^2, \quad \dots \dots \dots \quad (10)$$

que representa a soma de quadrados devida aos *desvios entre as médias das linhas* (1) e a *média geral*;

$$\Sigma \Sigma (y - \bar{y}_p)^2, \quad \dots \dots \dots \quad (11)$$

que representa a soma de quadrados *nas linhas* [para cada linha $\Sigma (y - \bar{y}_p)^2$].

Para o julgamento da linearidade utiliza-se (10) vendo quò:

$$\Sigma n'_p (\bar{y}_p - \bar{y})^2 = \Sigma n'_p (\bar{y}_p - Y)^2 + b^2 \Sigma (x - \bar{x})^2, \quad \dots \dots \dots \quad (12)$$

o que se demonstra atendendo à igualdade (7). Nesta equação, $\Sigma n'_p (\bar{y}_p - Y)^2$ representa a soma dos quadrados dos *desvios entre as médias das linhas e a recta de regressão*; $b^2 \Sigma (x - \bar{x})^2$ é a soma de quadrados *devida à função de regressão (linear)*, como já tinha exposto.

(1) As «linhas» referem-se aos grupos considerados em relação à variável y , ou linhas dum quadro de correlação.

Se se consideram q grupos ou linhas, os *graus de liberdade* correspondentes a (10) são $(q - 1)$ e ao total $(n' - 1)$. A (11) correspondem $[(n' - 1) - (q - 1)]$. Para o caso do julgamento de linearidade, 1 grau de liberdade dos que pretencem a (10) é absorvido pela função de regressão, como se vê facilmente atendendo a (12).

Para atestar a linearidade faz-se a comparação entre (10) e (11), entrando em conta com os respectivos graus de liberdade para achar a variância. Pelo que disse acima, os graus de liberdade são: para a soma de quadrados dos desvios das médias das linhas $(q - 2)$; para a soma dentro das linhas ficam $[(n' - 2) - (q - 2)]$. A soma dentro das linhas é usada como erro.

Para o caso de que me estou ocupando, parte-se da soma de quadrados *total*, já conhecida da análise precedente:

$$\Sigma (y - \bar{y})^2 = 401.37.$$

A soma de quadrados *entre as linhas*, ou, mais explicitamente, a soma de quadrados dos *desvios entre as médias das linhas e a função de regressão*, é:

$$\begin{aligned} \Sigma n'_p (y_p - Y) &= \Sigma n'_p (\bar{y}_p - y)^2 - b^2 \Sigma (x - \bar{x})^2 \\ &= 58.78 - 19.383 \\ &= 39.387; \end{aligned}$$

nesta soma, já era conhecido $\Sigma n'_p (\bar{y}_p - \bar{y})$ da outra análise da variância. A soma de quadrados *dentro das linhas* é:

$$\begin{aligned} \Sigma \Sigma (y - \bar{y}_p)^2 &= \Sigma (y - \bar{y})^2 - \Sigma n'_p (\bar{y}_p - \bar{y})^2 \\ &= 401.37 - 58.78 \\ &= 342.59 \end{aligned}$$

Os graus de liberdade para $q = 15$ são os da *Tabela XXIX*, onde está efectuada a parte final da análise de não-linearidade.

TABELA XXIX

	S. q.	G. l.	Var.	F	F 5%	F 1%
Desvios entre as médias das linhas e a função de regressão	39.397	13	3.031	2.106	1.80 — 1.79	2.28 — 2.24
Dentro das linhas	342.590	238	1.439		1.57 — 1.55	1.88 — 1.85
		251				

O valor encontrado para F é superior ao F no ponto 5%, pois que:

para $P = .05$	$n_1 = 12$	
	$n_2 = 200$	$F = 1.80$
	$n_1 = 12$	
	$n_2 = 300$	$F = 1.79$
	$n_1 = 24$	
	$n_2 = 200$	$F = 1.57$
	$n_1 = 24$	
	$n_2 = 300$	$F = 1.55,$

mas um pouco menor do que no ponto 1%. Interpolando nas tabelas de SNEDECOR, para n_1 em progressão harmónica, para n_2 em progressão aritmética, obtém-se para valor de F correspondente a $n_1 = 13$, $n_2 = 232$: $F = 2.216$, número superior ao que se obteve para o caso da análise acima.

O que tem importância é ser o F obtido maior do que o correspondente ao ponto 5%, e estar próximo do ponto 1%. Desta análise conclui-se, portanto, que há evidência de não-linearidade: os dados devem ajustar-se melhor a uma outra espécie de curva.

Quando se procura uma curva representativa da regressão de y sobre x deve proceder-se primeiramente ao ajustamento de uma recta e apenas quando há provas de não-linearidade se deve procurar outra equação. No caso do escurecimento da côr do cabelo com a idade é conveniente, portanto, procurar outra equação.

É sabido que as curvas de crescimento se assemelham bastante às curvas de auto-catálise e, em última análise, são curvas logarítmicas, isto é, curvas em que a variável dependente e a independente estão ligadas por meio de relações em que entram logarítmicos. Várias curvas se podem ajustar aos mesmos dados (cf. por exemplo o caso da população de Inglaterra em YULE e KENDALL 1937, comparando com PEARL 1930). Em regra, as curvas de grau superior (polinómios do 2.º, 3.º, etc. grau) parece ajustarem-se melhor a uma série de pontos à medida que o número de constantes e de potências da variável independente aumentam. Por vezes, a melhoria de ajustamento é apenas aparente e convém, sendo possível, ir verificando o significado do novo grau de liberdade que se vai usando.

Contudo, a escolha da forma geral da curva que se vai ajustar é um pouco arbitrária e deve ser feita com base em considerações derivadas da natureza do assunto. Como muito bem friza PEARL 1924, a semelhança quantitativa do desenrolar no tempo de dois fenómenos, nada diz sobre a existência ou não-existência de igualdade ou diferença *qualitativa* entre eles — duas curvas idênticas não implicam, pois, a mesma natureza.

PEARL descreve uma curva já conhecida de autores anteriores e a que é dado o nome de «logística», de fórmula geral

$$Y = \frac{k}{1 + m \cdot e^{F(x)}}$$

e na prática pode tomar-se $F(x)$, desenvolvida em série de TAYLOR, apenas com as três primeiras potências, de forma que fica:

$$Y = \frac{k}{1 + m \cdot e^{a_1 x + a_2 x^2 + a_3 x^3}}$$

Esta equação convém, tanto para a descrição do crescimento de populações, como de indivíduos isolados, para populações humanas e para o crescimento (pêso) do frato de «Cucurbita pepo». É de notar, porém, que aos mesmos dados podem igualmente ser ajustadas outras curvas logarítmicas. Parece, portanto, que no caso geral do crescimento se podem utilizar curvas logarítmicas para a descrição quantitativa dos dados.

Como para o presente caso, do escurecimento da côr do cabelo com a idade, apenas existem dados desde os 8 aos 22 anos nos ♂ e desde os 7 aos 19 anos nas ♀, não se justifica, por enquanto, que se procure o ajustamento duma curva de grau elevado. Experimentei, por isso, o ajustamento de uma curva da forma

$$Y = a + b \cdot \log x.$$

O cálculo das constantes é em tudo parecido com o da recta em x , sendo, também, um caso particular da aplicação do método dos «menores quadrados»; a modificação consiste em se tomarem para x os respectivos logarítmicos (decimais). Fazendo $\log x = x_1$ a equação acima toma a forma

$$Y = a + b \cdot x_1$$

e o cálculo de b executa-se da mesma maneira que anteriormente

$$\begin{aligned} b_{yx_1} &= \frac{\Sigma (x_1 \cdot y) - T_{x_1} \cdot T_y / n'}{\Sigma (x_1^2) - T_{x_1}^2 / n'} \\ &= \frac{14.685183}{3.445311} \\ &= 4.2624. \end{aligned}$$

A equação de regressão é, portanto:

$$\begin{aligned} Y &= \bar{y} + b_{yx_1} \cdot (x_1 - \bar{x}_1) \\ &= 13.561 + 4.2624 (\log x - 1.12023) \end{aligned}$$

e finalmente vem

$$Y = 8.7861 + 4.2624 \cdot \log x.$$

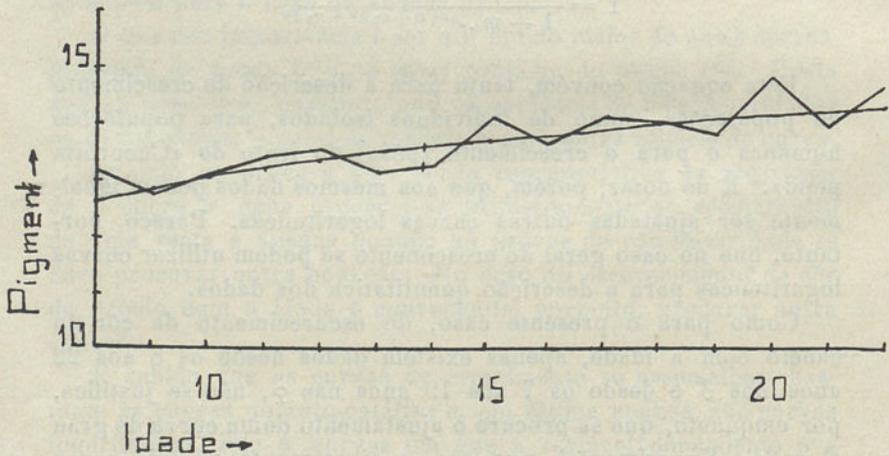


FIG. 6

Curva logarítmica ajustada para o « preto » da cor do cabelo, nos ♂ (conjuntamente com as médias observadas). Idade em anos, pigmentação em unidades do pigmentómetro.

Como se vê comparando a *fig. 6* com a *fig. 5*, a curva calculada parece ajustar-se melhor que a recta. A *fig. 6* representa a curva logarítmica, conjuntamente com os dados observacionais.

Para se poder ajuizar convenientemente do ajustamento é preciso, no entanto, ver se a curva calculada é significativa,

isto é, ver o significado da regressão calculada com a curva logarítmica, pelo processo usado para a recta.

A demonstração de significação nada diz, contudo, sobre a questão de se poder conseguir um melhor ajustamento com uma outra curva.

O julgamento do significado da regressão logarítmica faz-se como para o caso da recta. A sôma de quadrados *para a função de regressão* é:

$$\begin{aligned} b^2 \cdot \Sigma (x - \bar{x})^2 &= 4.2624^2 \cdot 3.445311 \\ &= 62.595363, \end{aligned}$$

emquanto que a sôma de quadrados *para os desvios da regressão* é:

$$\begin{aligned} \Sigma (y - Y)^2 &= \Sigma (y - \bar{y})^2 - b^2 \cdot \Sigma (x - \bar{x})^2 \\ &= 401.37 - 62.595363 \\ &= 338.774637. \end{aligned}$$

A análise da variância está exposta na *Tabela XXX*.

TABELA XXX

	S q.	G. L.	Var.	F	F 5%	F 1%
Função de regressão	62.595363	1	62.595363	46.377	3.89—3.87	6.76—6.72
Desvios da f. de regressão	338.774637	251	1.349700			
Total	401.370000	252				

Obtém-se um F muito superior ao respectivo valor no ponto 1%, como se pode ver pela Tabela XXX e conforme está explicado depois da Tabela XXVIII. A curva pode representar os dados.

Comparando esta análise com a da Tabela XXVIII para o caso da recta, verifica-se que, para os mesmos graus de liberdade, o F se tornou maior, passando aproximadamente de 13 para 46. Isto por si não justificaria a preferência de uma ou de outra curva. O que faz com que se deva preferir a curva logarítmica é a existência de outros factos de natureza semelhante, fenómenos de crescimento, regidos por leis semelhantes, ou melhor, que se podem exprimir quantitativamente por curvas logarítmicas. Com efeito, as curvas de crescimento parece serem sempre aproximadamente semelhantes na forma. A inspecção

de curvas para o crescimento no homem, desenhadas em WEISENBERG 1911 ou em GODIN 1935, sugere também uma forma logarítmica.

Para o caso em que se vai sucessivamente ajustando uma curva de grau superior, pode-se verificar se cada grau de liberdade que se vai usando ainda tem significado estatístico em relação ao anterior; no caso presente não se trata, porém, da mesma forma de curva, de maneira que a preferência de uma ou de outra, da curva logarítmica ou da recta, deve assentar sôbre motivos diferentes.

A conclusão a tirar é que o *escurecimento com a idade parece seguir para os ♂ uma curva de forma logarítmica, semelhante à dos processos de crescimento.*

A curva ajustada (logarítmica) permite ainda prever para o

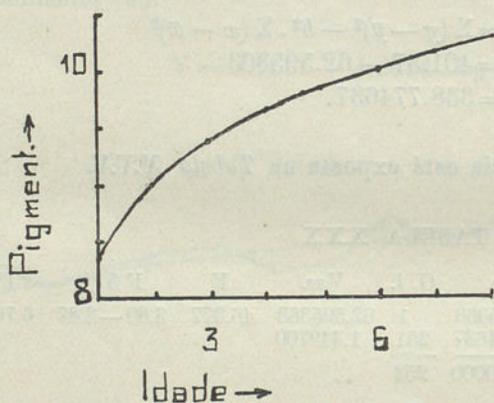


FIG. 7

Curva logarítmica para as idades em que não há dados, no sexo ♂.

caso de outras idades não estudadas, como se vê na fig. 7. Nas primeiras idades é que se daria, segundo esta curva, o escurecimento mais intenso, o que parece estar de acôrdo com o que se observa freqüentemente entre nós — rápido escurecimento logo nos primeiros anos, em que se opera a mudança do loiro para acastanhado.

O escurecimento com a idade deve praticamente estar terminado por volta dos 25 anos. A curva calculada não tem limite superior, que deve ter uma curva que melhor se ajuste. A logística já tem a possibilidade de apresentar um limite, mas reconhece-se que, com os dados actuais, os cálculos não deviam ser levados muito mais longe. Dados mais extensos quanto às idades e em maior número, realizados quantitativamente com aparelho semelhante ao pigmentómetro ou melhor do que este, é que poderão definir melhor uma curva de escurecimento médio da cor do cabelo. É de desejar que os dados sejam colhidos noutros trabalhos.

Côr do cabelo — φ . — Os resultados do estudo da côr do cabelo nas φ são em tudo semelhantes aos obtidos para o sexo masculino. Os métodos de análise são também os mesmos.

As médias e desvios-padrões para o «preto» nas várias idades, fundadas sobre o número de observações da coluna n'_i da tabela XXXII, estão expostos na *Tabela XXXI*.

TABELA XXXI

Anos	Média	Desvio-padrão
7	12.37	0.92
8	12.66	1.41
9	12.71	1.08
10	12.87	0.89
11	13.28	1.29
12	13.08	1.26
13	13.13	0.96
14	13.22	1.27
15	13.18	0.94
16	13.45	1.25
17	13.47	1.10
18	13.19	1.22
19	15.25	0.98

Emquanto que os desvios-padrões são aproximadamente iguais para as diferentes idades, nota-se um certo aumento, embora pequeno, para as médias. Também deve haver escurecimento com a idade.

A prova de heterogeneidade encontra-se na seguinte análise da variância, feita com os dados da *Tabela XXXII*.

TABELA XXXII

Anos	T_i	n'_i	T_i^2/n'_i	$\sum_1^{n'_i} x^2$
7	148.4	12	1835.21	1844.26
8	417.7	33	5287.07	5350.51
9	457.7	36	5819.15	5859.83
10	450.6	35	5801.15	5828.02
11	730.3	55	9697.06	9786.51
12	588.8	45	7704.12	7774.22
13	774.5	59	10166.95	10220.11
14	607.9	46	8033.53	8105.40
15	540.2	41	7117.46	7153.24
16	417.1	31	5612.01	5484.39
17	255.9	19	3446.56	3468.47
18	132.9	10	1766.24	1779.43
19	91.5	6	1395.38	1400.31
	5613.5	428	73681.89	74054.70

A soma de quadrados *total* é:

$$\begin{aligned}\Sigma (x - \bar{x})^2 &= 74054.70 - 5613.5^2 / 428 \\ &= 429.98\end{aligned}$$

e a soma *entre os grupos*:

$$\begin{aligned}n'_i \Sigma_1^k (\bar{x}_i - \bar{x})^2 &= 73681.89 - 5613.5^2 / 428 \\ &= 57.17\end{aligned}$$

A soma de quadrados entre os grupos é relativamente pequena, mas o F é significativo, como se vê procedendo à análise da variância exposta na *Tabela XXXIII*.

TABELA XXXIII

	S. q.	G. l.	S. q. m.	F	F 5%	F 1%
Entre os grupos	57.17	12	4.764	5.305	1.78—1.77	2.23—2.22
Nos grupos	372.81	415	0.898			
Total	429.98	427				

Comparando o F obtido com o F 1% das tabelas:

$$\begin{aligned}\text{para } P = .01 \quad n_1 &= 12 \\ n_2 &= 400 \quad F = 2.23\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}n_1 &= 12 \\ n_2 &= 500 \quad F = 2.22,\end{aligned}$$

verifica-se que este último é altamente significativo. Portanto, há manifesta heterogeneidade entre as médias do sexo feminino para a cor do cabelo («preto») desde os 7 aos 19 anos.

*

* *

Os outros dois filtros mostraram resultados muito semelhantes. As médias da *Tabela XXXIV* dizem-lhes respeito; verifica-se que há diferenças da mesma ordem das existentes para o

«preto». Os números de observações são, como é habitual, iguais aos do filtro «azul» (que dá o «preto»).

TABELA XXXIV

Anos	F. amarelo	F. vermelho
7	13.47	13.41
8	13.12	13.21
9	13.64	13.55
10	13.74	13.72
11	14.02	13.98
12	13.83	13.85
13	13.90	13.96
14	14.04	14.08
15	14.01	13.98
16	14.21	14.15
17	14.10	14.18
18	13.85	13.83
19	15.52	15.53

As conclusões a que cheguei, a respeito do «preto», devem também ser válidas para os filtros «amarelo» e «vermelho». As médias são também muito aproximadas.

*

*

*

Foi calculada para o sexo feminino uma *recta de regressão* pelos mesmos processos anteriormente usados. O coeficiente de regressão é:

$$\begin{aligned}
 b_{yx} &= \frac{(x \cdot y) - T_x \cdot T_y / n'}{(x^2) - T_x^2 / n'} \\
 &= \frac{69941.3 - 5306.0 \cdot 5613.5 / 428}{69296.0 - 5306.0^2 / 428} = \frac{349.64}{3616.48} \\
 &= 0.0994 .
 \end{aligned}$$

A equação de regressão será, pois,

$$\begin{aligned}
 Y &= \bar{y} + b_{yx} \cdot (x - \bar{x}) \\
 &= 13.116 + 0.0994 (x - 12.397)
 \end{aligned}$$

$$Y = 11.884 + 0.0994 x .$$

A recta correspondente a esta equação está representada, conjuntamente com a linha de união das médias observadas, na *fig. 8*. O ajustamento parece razoável, o que é natural, dadas as pequenas diferenças que fazem as médias vizinhas. Os resultados para as ♀ devem, contudo, ser semelhantes qualitativamente aos obtidos para o outro sexo e apenas diferir quantitativamente; por estas razões, é natural que uma curva logarítmica se adapte melhor. Convém, portanto, verificar o significado da regressão linear e, depois, atestar a linearidade.

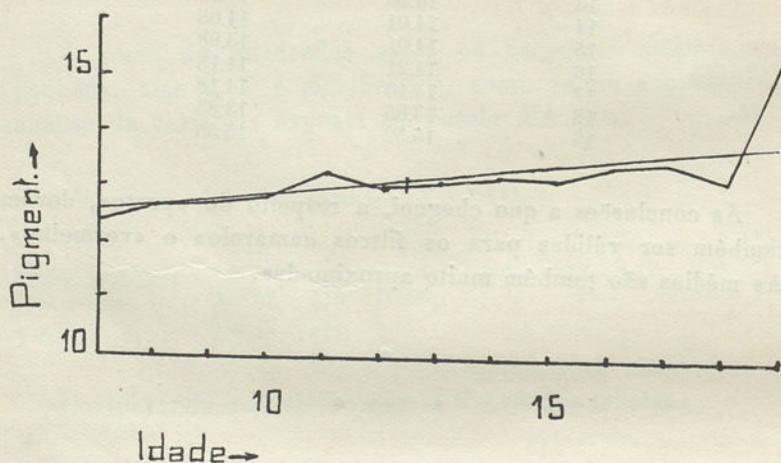


FIG. 8

Recta de regressão calculada para o «preto» (em unidades do pigmentómetro) da côr do cabelo, nas ♀. Conjuntamente, as médias das várias idades (anos).

A significação foi julgada pelo processo da análise da variância, como para o outro sexo. A soma de quadrados *total* é a mesma da anterior análise:

$$\Sigma (y - \bar{y})^2 = 429.98,$$

e a soma de quadrados correspondentes à *função de regressão*:

$$\begin{aligned} b^2 \cdot \Sigma (x - \bar{x})^2 &= 0.0994^2 \cdot 3516.48 \\ &= 34.74. \end{aligned}$$

A análise final está na *Tabela XXXV*.

TABELA XXXV

	S. q.	G. l.	Var.	F	F 5%	F 1%
Função de regressão	34.74	1	34.740	37.435	3.86	6.70 — 6.69
Desvios da f. de regressão	395.24	426	0.928			
Total	429.98	427				

O F obtido é muito superior ao correspondente 1% (e, portanto, ainda mais em relação ao ponto 5%). Para o ponto 1% vem nas tabelas :

$$\text{para } P = .01 \quad n_1 = 1 \\ n_2 = 400 \quad F = 6.70$$

$$n_1 = 1 \\ n_2 = 500 \quad F = 6.69.$$

A recta de regressão é significativa em relação ao erro que envolve.

*

* *

Para se atestar a *não-linearidade* (ou linearidade) usei o processo anteriormente empregado. As somas de quadrados necessárias são : Soma de quadrados dos *desvios das médias das linhas para a função de regressão*

$$\begin{aligned} \sum n'_p (\bar{y}_p - Y)^2 &= \sum n'_p (\bar{y}_p - \bar{y})^2 - b^2 \cdot \sum (x - \bar{x})^2 \\ &= 57.17 - 34.74 \\ &= 22.43 \end{aligned}$$

e para dentro das linhas

$$\begin{aligned} \sum \sum (y - \bar{y}_p)^2 &= \sum (y - \bar{y})^2 - \sum n'_p (\bar{y}_p - \bar{y})^2 \\ &= 429.92 - 57.17 \\ &= 372.81 \end{aligned}$$

A análise da variância encontra-se na *Tabela XXXVI*.

TABELA XXXVI

	S. q.	G. l.	Var.	F	F 5%	F 1%
Desvios entre as médias das linhas e a função de regressão	22.43	11	2.039	2.270	1.96	2.56 — 2.55
Dentro das linhas	372.81	415	0.898		1.78 — 1.77	2.23 — 2.22
		426				

Nas tabelas de F encontram-se os seguintes valores :

para P = .05	$n_1 = 8$		
	$n_2 = 400, 500$	F = 1.96	
	$n_1 = 12$		
	$n_2 = 400$	F = 1.78	
	$n_1 = 12$		
	$n_2 = 500$	F = 1.77.	

Esta análise demonstra que *há evidência de não-linearidade*. O valor calculado para o ponto P = .01, interpolando nas tabelas, para $n_1 = 11$ e $n_2 = 415$, é F = 2.29, aproximadamente o valor achado para F. Uma outra equação, representando uma curva, diferente da recta de regressão, poderá ajustar-se melhor. Como para os $\hat{\beta}$, é natural pensar-se numa curva logarítmica da forma:

$$Y = a + b \cdot \log x$$

$$= a + b \cdot x_1$$

O respectivo coeficiente de regressão é :

$$b_{yx_1} = \frac{\Sigma (x_1 \cdot y) - T_{x_1} \cdot T_y / n'}{\Sigma (x_1^2) - T_{x_1}^2 / n'}$$

$$= \frac{6081.681872 - 462.73096 \cdot 5613.5 / 428}{504.908815 - 462.73096^2 / 428} = \frac{12.662610}{4.628492}$$

$$= 2.73579.$$

A equação é, portanto:

$$\begin{aligned} Y &= \bar{y} + b_{yx_1} \cdot (x_1 - \bar{x}_1) \\ &= 13.116 + 2.7358 (x_1 - 1.08115) \\ &= 10.1582 + 2.7358 \cdot x_1 \\ Y &= 10.1582 + 2.7358 \log x. \end{aligned}$$

Esta equação fornece a curva representada na *fig. 9*, conjuntamente com as médias observadas. O ajustamento é razoável, talvez um pouco melhor que o da recta. A significação da regres-

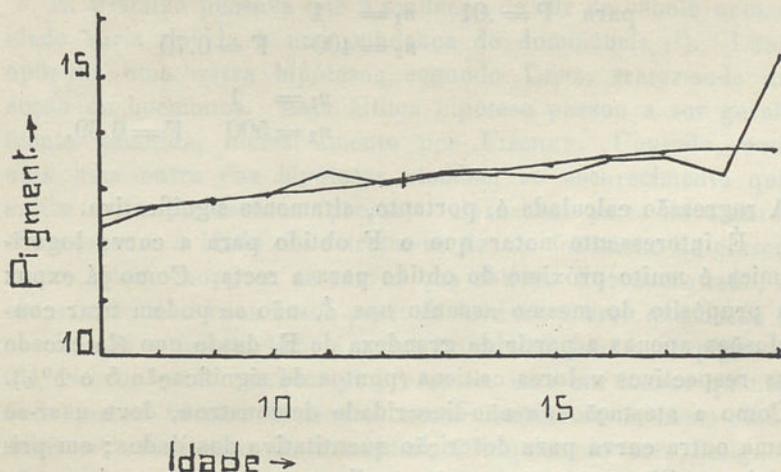


FIG. 9

Curva de regressão logarítmica, para as ♀, comparada com as médias das várias idades. Ordenadas em unidades do pigmentómetro, idade em anos.

são logarítmica foi atestada pela análise da variância. As somas de quadrados necessárias são as seguintes: Soma de quadrados para a função de regressão

$$\begin{aligned} b^2 \cdot \Sigma (x - \bar{x})^2 &= 2.7358^2 \cdot 4.628492 \\ &= 34.647503 \end{aligned}$$

e para os desvios da função de regressão

$$\begin{aligned} \Sigma (y - Y)^2 &= \Sigma (y - \bar{y})^2 - b^2 \cdot \Sigma (x - \bar{x})^2 \\ &= 429.98 - 34.647503 \\ &= 395.332497. \end{aligned}$$

A parte final da análise encontra-se na *Tabela XXXVII*.

TABELA XXXVII

	S. q.	G. L.	Var.	F	F 5%	F 1%
Função da regressão	34.647503	1	34.647503	37.335	3.86	6.70—6.69
Desvios da f. de regressão	395.332497	426	0.928011			
Total	429.980000	427				

O F é muito maior do que o correspondente ponto 1%, visto que:

$$\text{para } P = .01 \quad n_1 = 1 \\ n_2 = 400 \quad F = 6.70$$

$$n_1 = 1 \\ n_2 = 500 \quad F = 6.69.$$

A regressão calculada é, portanto, altamente significativa.

É interessante notar que o F obtido para a curva logarítmica é muito próximo do obtido para a recta. Como já expuz a propósito do mesmo assunto nos ♂, não se podem tirar conclusões apenas a partir da grandeza de F, desde que ele excede os respectivos valores críticos (pontos de significação 5 e 1%). Como a atestação da não-linearidade demonstrou, deve usar-se uma outra curva para descrição quantitativa dos dados; em primeira análise e enquanto não se dispuser de dados mais extensos, pode tomar-se, como representativa, a curva logarítmica calculada.

Do que fica dito, e ainda por analogia com o que sucede nos ♂, conclui-se que *no sexo feminino o escurecimento da cor do cabelo com a idade pode descrever-se quantitativamente por intermédio de uma curva logarítmica.*

*

* *

A partir da semelhança quantitativa de dois fenómenos não se pode concluir para a sua identidade, como já referi citando PEARL, o que, de resto, é perfeitamente compreensível. Entre o crescimento da estatura ou do peso do corpo, no homem, e

entre o crescimento de «Cucurbita pepo», ou outro qualquer crescimento de seres vivos — há de comum a qualidade. O escurecimento com a idade, segundo a análise efectuada, parece seguir as mesmas curvas; é semelhante, quantitativamente, ao crescimento em geral e, aliás, era de esperar «a priori» que fôsse uma das formas de crescimento. Evidentemente, quando me refiro ao escurecimento com a idade faço-o sempre em relação ao «crescimento médio» analisado, e não ao individual. Têm aplicação, neste caso, tôdas as restricções a que estatisticamente estão sujeitas as conclusões baseadas sôbre as médias.

E. FISCHER pensava que a mudança de côr do cabelo com a idade seria devida a uma mudança de dominância (1). LENZ opôs-lhe uma outra hipótese; segundo LENZ, tratar-se-ia de acção de hormonas. Esta última hipótese passou a ser geralmente admitida, inclusivamente por FISCHER. Contudo, nem uma nem outra das hipóteses atendem ao escurecimento que existe em raças escuras (pretos). Para uma parte do escurecimento com a idade deve tratar-se de um fenómeno de crescimento, como mostram as curvas que obtive. Por outro lado, a observação de vários casos pessoais leva-me a crer que desde o nascimento o cabelo tem já o tom do adulto, isto é, os pigmentos escuros estão também já presentes, mas em menor quantidade que no adulto. O escurecimento ulterior seria, neste caso, antes um fenómeno de crescimento, implicando esta designação que o escurecimento com a idade dependeria não simplesmente das hormonas (sexuais), mas de todos os factores de que depende o crescimento em geral. Genes especiais seriam responsáveis, também, por uma parte do escurecimento.

Evidentemente, o crescimento é um conjunto complexo dependente de várias causas e, notòriamente, das hormonas em geral (e não só das hormonas sexuais). A hipótese de LENZ explicaria, pois, uma parte da realidade. O crescimento está também na dependência directa de certos genes, como é bem conhecido. Pode supor-se que as coisas se passam, para a pigmentação, da

(1) *Dominância* em vez de dominação, como *variância* em vez de variação, *significância* por significação e *reflectância* em vez de reflexão — são neologismos, mas prestam, sem dúvida, grandes serviços por serem termos bem definidos, que permitem evitar a ambigüidade dos termos vulgares.

seguinte forma: A cor à nascença dependeria do genótipo de que o indivíduo é portador, havendo genes que condicionam o pigmento claro, outros que condicionam o pigmento escuro, e outros o pigmento ruivo (cf. adiante constituição química dos pigmentos). Quando existam conjuntamente genes para as duas colorações, apenas a coloração clara se poderia manifestar com um pouco mais de intensidade porque, em virtude da sua maior afinidade para uma oxidase que deve intervir na realização da pigmentação, o pigmento claro consome quasi toda esta oxidase e, portanto, o pigmento escuro mal se notará. Com o crescimento modificam-se as condições do «meio interno» e, havendo ou não maior quantidade de enzima, já se pode realizar o pigmento escuro. Mesmo nos casos em que apenas há genes para uma espécie de pigmento, o crescimento se faria sentir. Esta hipótese é quasi puramente especulativa, como, de resto, as outras hipóteses sobre o escurecimento com a idade. Adiante voltarei a esta questão depois de discutir a constituição dos pigmentos.

Correlações — Compleição

Um outro problema que anda ligado de perto ao da hereditariedade da pigmentação é o da correlação entre a cor da pele, cabelo e olhos. Admite-se, por analogia com o que se passa por exemplo no coelho, a existência de um factor geral que influencia toda a pigmentação e cuja falta, ou existência no estado recessivo «albino», causa ausência total de pigmento. Outros genes alelos da mesma série, causam estados intermédios entre o albino e o de completa pigmentação, originando os fenótipos da série albina. Em virtude da existência deste factor geral, podem realizar-se pigmentações semelhantes para a pele, cabelo, pêlos e olhos, aparecendo, assim, uma determinada «compleição» pura (1). Factores particulares para cada região ou órgão, causariam «compleições» mais ou menos características.

(1) No sentido usual, empregado, por exemplo, por E. FISCHER a pág. 133 de BAUR-FISCHER-LENZ, 1936.

A correlação será, até certo ponto, uma medida d'êste factor basilar, depois de deduzidas as modificações de carácter somático. A determinação das correlações terá, portanto, muito interesse, aumentado ainda pela circunstância de se tratar de determinações quantitativas. Correlações estabelecidas a partir de categorias de ordem qualitativa, por processos de cálculo apropriados, existem há muito para várias populações (v., por exemplo, PEARSON 1904). O método usado neste trabalho permite abordar o problema directamente pelo coeficiente de correlação. Além disto, são efectuadas algumas análises para a covariância, que podem ter algum interesse.

Correlação entre a côr da pele e a dos olhos — \mathcal{J} . — As correlações foram apenas calculadas para o «preto».

Como se sabe, o coeficiente de correlação é:

$$r = \frac{\Sigma [(x - \bar{x}) \cdot (y - \bar{y})]}{n' \cdot \sigma_x \cdot \sigma_y}$$

Para os cálculos, esta fórmula não é muito prática e deve substituir-se por outras, directamente dela derivadas, atendendo à definição de desvio-padrão e de média. A fórmula que usei é a seguinte:

$$r = \frac{\Sigma (x \cdot y) - T_x \cdot T_y}{\sqrt{[n' \cdot \Sigma (x^2) - T_x^2] \cdot [n' \cdot \Sigma (y^2) - T_y^2]}}$$

Os coeficientes calculados para cada idade, bem como o número de pares de observações, encontram-se na *Tabela XXXVIII*.

Os coeficientes para as varias idades são bastante aproximados, exceptuando os três últimos, que se fundam sobre um pequeno número de observações. Não considerando as três últimas idades, o maior coeficiente é o de 16 anos.

O significado do coeficiente de correlação pode conhecer-se achando o seu êrro médio, ou melhor, calculando o respectivo t :

$$t = \frac{r \cdot \sqrt{n}}{\sqrt{1 - r^2}}$$

t depende apenas de r e do número de graus de liberdade n ; o número de graus de liberdade é, no caso do coeficiente de correlação, menos 2 que o número de pares de observações: $n = n' - 2$. Para os diferentes valores de n e de r existem tabelas que dão o respectivo P (probabilidade de ocorrência ocasional) para vários níveis de significação. Está neste caso a tabela V-A de FISHER 1932. Verifica-se por esta tabela que para a significância 5%, o nível adoptado como significativo, o valor correspondente a $n = 20$ é $r = 0.4227$ e para $n = 25$ é $r = 0.3809$, enquanto que para $n = 5$ será $r = 0.7545$. O

TABELA XXXVIII

Anos	n'	Coef. de correl.
8	21	0.190
9	17	0.128
10	17	0.151
11	21	0.101
12	30	0.076
13	22	0.054
14	23	0.137
15	19	0.313
16	23	0.347
17	21	0.281
18	17	0.341
19	10	0.339
20	4	0.605
21	6	0.606
22	3	0.759

maior dos coeficientes de correlação não é, portanto, significativo e, com maioria de razão, todos os outros também o não são. É possível que se conseguisse obter um coeficiente significativo desde que se juntassem vários anos, ou, mesmo, todas as observações. Mas, para que tal se possa fazer legitimamente é necessário analisar previamente a covariância, isto é, verificar se existe homogeneidade ou heterogeneidade quanto aos coeficientes de correlação calculados (ou, o que é o mesmo, se há diferenças significativas entre as correspondentes regressões).

O processo de análise é aproximadamente semelhante ao da análise da variância; de novo, é preciso calcular além das somas de quadrados, as somas de produtos.

*

*

*

A equação fundamental em que se baseia a *análise da covariância* é, na sua forma mais geral:

$$\begin{aligned} \sum_1^{n^k} (x - \bar{x}) \cdot (y - \bar{y}) = \Sigma \sum_1^{n^k} (x - \bar{x}_i) \cdot (y - \bar{y}_i) + \\ + n' \cdot \sum_1^k (\bar{x}_i - \bar{x}) \cdot (\bar{y}_i - \bar{y}), \dots \dots \dots (1) \end{aligned}$$

em que a notação é a já usada para as análises da variância.

Nesta equação, o primeiro membro representa a *soma de produtos total* (expressão abreviada de «soma de produtos dos desvios da média»); o primeiro termo do 2.º membro corresponde à *soma de produtos dentro dos grupos* e o segundo termo à *soma de produtos entre os grupos*.

Esta análise pode ampliar-se para outros casos mais complexos, em que há dois ou mais critérios de classificação (caso de classes e grupos, ainda com sub-classes, etc.).

A igualdade (1) ainda se verifica quando o número de observações é diferente de grupo para grupo, tal como acontece para a análise da variância; basta substituir em (1) n' por n'_i e $\sum_1^{n^k}$ por $\sum_1^k n'_i$.

Pode comparar-se a soma de produtos entre os grupos com a dentro dos grupos, servindo esta como êrro. Na prática, recorre-se, para a efectuação dos cálculos, às seguintes igualdades: Para o *total*

$$\Sigma \Sigma (x - \bar{x}) \cdot (y - \bar{y}) = \Sigma (x \cdot y) - T_x \cdot T_y / N' \dots (2)$$

e para a *soma entre os grupos*

$$n'_i \cdot \sum_1^k (\bar{x}_i - \bar{x}) \cdot (\bar{y}_i - \bar{y}) = \sum_1^k (T_{x_i} \cdot T_{y_i}) / n'_i - T_x \cdot T_y / N' \dots (3)$$

Para *dentro dos grupos* acha-se a diferença (2)-(3).

Nestas igualdades, $N' = \sum_1^k n'_i$. Facilmente se demonstram (2) e (3) atendendo à definição de média (como para a análise da variância).

Estes processos são próprios para o caso em que ainda se não calcularam os coeficientes de correlação e se requerem aná-

lises de covariância com outras finalidades. Quando, porém, os coeficientes já estão calculados, o método mais simples consiste em achar primeiro a soma de produtos dentro dos grupos e, por subtração para o total, a soma de produtos entre os grupos. A maneira de proceder está indicada praticamente, para o presente caso, na *Tabela XXXIX*. É preciso calcular para dentro dos grupos:

$$\begin{aligned} & \Sigma (y - \bar{y}_i)^2 - [\Sigma (x - \bar{x}) \cdot (y - \bar{y})]^2 / \Sigma (x - \bar{x}_i)^2 = \\ & = \Sigma \left\{ (y - \bar{y}_i)^2 - b_{y_i x_i} \cdot [\Sigma (x - \bar{x}_i) \cdot (y - \bar{y}_i)] \right\}. \end{aligned}$$

Para o *total* servem os mesmos processos de cálculo, apenas se entrando também com os totais das respectivas colunas, como se vê pela tabela, sem haver necessidade de se calcularem os desvios em relação à média geral e depois achar as respectivas somas de produtos.

TABELA XXXIX

Anos	1) G. l.	2) $\Sigma (x - \bar{x}_i)^2$	3) $\Sigma (y - \bar{y}_i)^2$	4) $\Sigma (x - \bar{x}_i)(y - \bar{y}_i)$	4) ²	5) = 4 ² / 2)	6) = 3) - 5)	G. l.
8	20	3.16	204.46	4.81	23.1361	7.32	195.14	19
9	16	1.51	87.66	1.47	2.1609	1.43	86.23	15
10	16	2.32	67.71	1.89	3.5721	1.54	66.17	15
11	20	2.41	329.88	2.85	7.8961	3.28	326.60	19
12	29	12.10	197.79	3.71	13.7641	1.14	196.65	28
13	21	3.29	446.29	2.08	4.3264	1.32	444.97	20
14	22	3.37	200.15	3.56	12.6736	3.76	196.39	21
15	18	9.83	135.92	11.44	130.8736	13.31	122.61	17
16	22	5.69	91.55	7.91	62.5681	11.00	80.55	21
17	20	6.39	191.75	9.85	97.0225	15.18	176.57	19
18	16	3.90	111.85	7.25	52.5625	13.48	98.37	15
19	9	3.88	278.07	11.13	123.8769	31.93	246.14	8
20	3	0.97	3.93	1.18	1.3924	1.44	2.49	2
21	5	3.70	18.82	5.06	25.6036	6.92	11.90	4
22	2	0.42	3.73	0.95	0.9025	2.15	1.58	1
						<u>115.20</u>	<u>2252.36</u>	<u>224</u>
	239	62.94	2367.56	75.14	5646.0196	90.35	2277.21	

Esta maneira de proceder aos cálculos é conveniente para se compreender como aparecem os graus de liberdade para cada soma de produtos. Nos cálculos entra-se implicitamente com o coeficiente de regressão (ou o de correlação); *para o total* perde-se um grau de liberdade por cada grupo e mais um grau para o coeficiente geral; *para os grupos* perde-se um grau, como é costume; e *para dentro dos grupos* perde-se mais um

grau por cada grupo, além do que já se tinha perdido para o total. Os *graus de liberdade* serão, portanto: para o total $[(\sum_1^k n'_i - k) - 1]$, sendo k o número de grupos; para *entre os grupos* $(k - 1)$; para *dentro dos grupos* a diferença, igual a $[\sum_1^k (n'_i - 2)]$.

Na *Tabela XXXIX* estão expostos os cálculos.

A soma de produtos (soma de quadrados de produtos) *total* é:

$$\begin{aligned}\Sigma \Sigma (x - \bar{x}) \cdot (y - \bar{y}) &= 2367.56 - 90.35 \\ &= 2277.21\end{aligned}$$

e a soma de produtos *dentro dos grupos*:

$$\Sigma \left\{ (y - \bar{y}_i)^2 - b_{yx_i} \cdot [\Sigma (x - \bar{x}_i) \cdot (y - \bar{y}_i)] \right\} = 2252.36.$$

A análise final está exposta na *Tabela XL*.

TABELA XL

	S. q. p.	G. l.	Var.	F	F 5%	F 1%
Total	2277.21	238				
Dentro dos grupos	2252.36	224	10.005			
Entre os grupos	24.85	14	1.755	5.729	2.13	3.00

A soma de produtos (nesta e seguintes tabelas S. q. p. representa a soma de quadrados de produtos), correspondente a *entre os grupos*, é muito pequena comparada com a soma *dentro dos grupos*. A variância *entre os grupos* é muito menor do que o *erro* (*dentro dos grupos*). No entanto, o F obtido é muito superior ao correspondente ponto 1%, visto que é:

$$\begin{aligned}\text{para } P = .01 \quad n_1 &= \infty \\ n_2 &= 14 \quad F = 3.00.\end{aligned}$$

A atestação da variância consiste no julgamento da diferença de duas variâncias. No caso presente, nota-se que o *erro* é muito maior que a variância que se quer atestar — a variância *entre os grupos* é anormalmente baixa. A análise da covariância revelou heterogeneidade, provavelmente derivada desta causa. É também provável que uma variância *dentro dos grupos* com esta grandeza, seja em parte devida ao método usado, particularmente para a determinação da *côr dos olhos*.

Nestas condições, não se pode usar um só coeficiente de correlação para representar a correlação entre a cor da pele e da zona interna dos olhos no caso das amostras do sexo masculino que constituem o material analisado. O julgamento seguro baseado na análise da covariância levou a um resultado um tanto inesperado: era-se tentado a calcular um único coeficiente de correlação para todas as observações, o que, no entanto, não se pode fazer. Seria interessante investigar a causa da anormal variância encontrada entre os grupos (comparada com a anormalmente alta dentro dos grupos). Voltarei a esta questão mais adiante.

Correlação entre a cor da pele e dos olhos — ♀. — Foram aplicados ao sexo feminino os mesmos processos descritos para o outro sexo. Assim, foram calculadas as correlações para cada idade — e os respectivos coeficientes, bem como o número de observações, são os da *Tabela XLI*.

TABELA XLI

Anos	n'	Coef. de correl.
7	12	0.637
8	33	0.306
9	36	0.402
10	35	0.179
11	55	0.114
12	45	0.236
13	59	0.106
14	46	0.072
15	41	0.075
16	30	0.168
17	19	0.378
18	10	0.141
19	6	0.697

Alguns dos coeficientes são significativos (significativamente diferentes de zero) — estão nestas condições os de 7 e 9 anos, os restantes são insignificativos. Por este rápido exame se reconhece que deve haver heterogeneidade na covariância. Para se poderem tirar conclusões seguras efectuei a respectiva análise com os dados contidos na *Tabela XLII*.

Calculando o valor das somas de quadrados de produtos, obtém-se: Para o *total*

$$\begin{aligned} \Sigma \Sigma (x - \bar{x}) \cdot (y - \bar{y}) &= 3923.04 - 181.61 \\ &= 3741.43 \end{aligned}$$

e para dentro dos grupos

$$\Sigma \left\{ (y - \bar{y}_i)^2 - b_{y_i x_i} \cdot [\Sigma (x - \bar{x}_i) \cdot (y - \bar{y}_i)] \right\} = 3537.05.$$

TABELA XLII

Anos	1) G. l.	2) $\Sigma (x - \bar{x}_i)^2$	3) $\Sigma (y - \bar{y}_i)^2$	4) $\Sigma (x - \bar{x}_i)(y - \bar{y}_i)$	4) ²	5)-4) ² / 2)	6)-3) - 5)	G. l.
7	11	0.99	355.49	11.94	142.5636	144.01	211.48	10
8	32	2.68	226.88	7.55	57.0025	21.27	205.61	31
9	35	5.17	404.99	18.35	336.7225	65.13	339.86	34
10	34	1.57	337.62	4.12	16.9744	10.81	326.81	33
11	54	3.60	599.41	5.30	28.0900	78.03	521.38	53
12	44	3.51	550.30	8.03	64.4809	18.37	331.93	43
13	58	3.25	379.46	3.32	10.3684	3.19	376.27	57
14	45	3.32	342.43	2.41	5.8081	1.75	340.68	44
15	40	2.16	295.20	1.89	3.5721	1.65	293.55	39
16	29	2.50	396.87	5.30	28.0900	11.24	385.63	28
17	18	1.19	124.23	4.59	21.0681	17.70	106.53	17
18	9	0.18	84.13	0.54	.2916	1.62	82.51	8
19	5	0.04	26.03	0.67	.4489	11.22	14.81	4
						385.99	3537.05	401
	414	30.16	3923.04	74.01	5477.4801	181.61	3741.43	

A análise final, baseada sobre estes dados, está exposta na *Tabela XLIII*.

TABELA XLIII

	S. q. p.	G. l.	Var.	F	F 5%	F 1%
Total	3741.43	413				
Dentro dos grupos	3537.05	401	8.821			
Entre os grupos	204.38	12	17.032	1.931	1.78 — 1.77	2.23 — 2.22

Para F, nos pontos 5% e 1%, encontra-se:

$$\begin{aligned} \text{para } P = .05 \quad n_1 &= 12 \\ & n_2 = 400 \quad F = 1.78 \\ & n_1 = 12 \\ & n_2 = 500 \quad F = 1.77 \\ \text{para } P = .01 \quad n_1 &= 12 \\ & n_2 = 400 \quad F = 2.23 \\ & n_1 = 12 \\ & n_2 = 500 \quad F = 2.22. \end{aligned}$$

O F encontrado é superior ao F correspondente ao ponto 5%, mas é inferior ao ponto 1%. A conclusão é que há heteroge-

neidade na covariância analisada. A explicação desta diferença parece ser um tanto difícil. Na tabela XLI nota-se uma diminuição do coeficiente de correlação nos anos médios da tabela, a partir dos 10 e até aos 15, coincidindo mais ou menos com o período que habitualmente se considera de evolução da puberdade. Poder-se-ia pensar em alterações da compleição; mas as análises da variância, realizadas sobre a cor da pele e dos olhos, não suportam esta conclusão.

Outra circunstância a ponderar é a de o F não exceder tanto o ponto .05 que se possa considerar este resultado como firmemente estabelecido. Também se poderiam supor outras hipóteses relativas à constituição das amostras de cada idade; porém ressalta claramente do que disse, que convém, antes de ir mais longe em explicações, analisar material mais numeroso e de diferentes proveniências.

Como resultado adquirido, pode afirmar-se que *segundo a análise efectuada, não se pode calcular para os representantes do sexo feminino que constituem as amostras, um único coeficiente de correlação representativo de todo o colectivo para a correlação entre o «preto» da cor da pele e da zona interna da iris.*

Correlação entre a cor da pele e a do cabelo — δ . — Continuando com os mesmos métodos, obtive para as correlações entre o «preto» da cor da pele e o «preto» da cor do cabelo os valores da *Tabela XLIV*. Da tabela constam também os números de observações para cada idade.

TABELA XLIV

Anos	n'	Coef. de correl.
8	21	0.221
9	17	0.331
10	16	0.147
11	21	— 0.068
12	30	— 0.100
13	20	— 0.221
14	23	0.349
15	18	0.423
16	23	0.352
17	21	0.072
18	17	0.626
19	10	0.557
20	4	0.737
21	6	0.277
22	3	0.577

Apenas a correlação 0.626 para os 18 anos, com $n = n' - 2 = 15$ graus de liberdade, é significativa; as restantes, embora algumas bastante altas, não são fundadas sobre número suficiente de observações, ou então, os seus valores são realmente baixos. Aparentemente deve haver heterogeneidade. A análise da covariância pode efectuar-se com os dados da *Tabela XLV*.

TABELA XLV

Anos	1) G. l.	2) $\Sigma(x-\bar{x}_i)^2$	3) $\Sigma(y-\bar{y}_i)^2$	4) $\Sigma(x-\bar{x}_i)(y-\bar{y}_i)$	4) ²	5)-4) ² /2)	6)-3)-5)	G. l.
8	20	3.16	18.07	1.67	2.7889	0.88	17.19	19
9	16	1.51	9.11	1.22	1.4884	0.99	8.12	15
10	15	2.29	14.06	0.83	0.6889	0.30	13.76	14
11	20	2.41	38.76	-0.66	0.4356	0.18	38.58	19
12	29	12.31	54.75	-2.60	6.6700	0.55	54.20	28
13	19	2.35	23.38	-1.64	2.6896	1.14	22.84	18
14	22	3.37	28.91	3.45	11.9025	3.53	25.38	21
15	17	9.80	30.52	7.31	53.4361	5.45	25.07	16
16	22	6.50	18.93	3.91	15.2881	2.35	16.58	21
17	20	6.39	26.68	0.94	0.8836	0.13	26.55	19
18	16	3.90	25.97	6.30	39.6900	10.18	15.79	15
19	9	3.38	24.41	5.42	29.3764	8.69	15.72	8
20	3	0.97	1.39	0.86	0.7396	0.76	0.63	2
21	5	3.70	14.28	2.01	4.0401	1.09	13.19	4
22	2	0.42	0.78	0.33	0.1089	0.26	0.52	1
						36.48	293.52	220
	235	62.46	330.00	29.35	861.4225	13.79	316.21	

A soma de produtos *total* é:

$$\Sigma \Sigma (x - \bar{x}) \cdot (y - \bar{y}) = 330.00 - 13.79 = 316.21$$

e para *dentro dos grupos*:

$$\Sigma \{ (y - \bar{y}_i)^2 - b_{y,x_i} \cdot [\Sigma (x - \bar{x}_i) \cdot (y - \bar{y}_i)] \} = 293.52.$$

Na *Tabela XLVI* está representada a análise final.

TABELA XLVI

	S. q. p.	G. l.	Var.	F	F 5%	F 1%
Total	316.21	234				
Dentro dos grupos	293.52	220	1.334			
Entre os grupos	22.69	14	1.621	1.215	1.73	2.28-2.24-1.88-1.85

O F obtido não tem a necessária significância. Com efeito, nas tabelas encontra-se para o ponto 5%:

$$\begin{array}{ll} \text{para } P = .05 & n_1 = 12 \\ & n_2 = 200 \quad F = 1.80 \\ & n_1 = 12 \\ & n_2 = 300 \quad F = 1.79 \\ & n_1 = 24 \\ & n_2 = 200 \quad F = 1.57 \\ & n_1 = 24 \\ & n_2 = 300 \quad F = 1.55. \end{array}$$

Será talvez conveniente interpolar para este caso, a fim de se ver com mais aproximação a diferença entre o F obtido e o correspondente para $P = .05$. Interpolando como é habitual, encontra-se o valor 1.73 que figura na tabela XLVI. Pode afirmar-se, portanto, que *não há heterogeneidade quanto à covariância*.

Observa-se na tabela XLIV uma tendência para os coeficientes aumentarem a partir dos 14 anos, ao mesmo tempo que existem correlações pequenas e negativas entre os 10 e os 14 anos, dando o conjunto a impressão de uma certa heterogeneidade, que não foi confirmada pela análise. Pode proceder-se ao cálculo de um coeficiente de correlação geral, visto não haver heterogeneidade. O coeficiente geral é:

$$r = 0.2044.$$

O coeficiente é relativamente baixo, mas é significativo, como se vê pela tabela própria de FISHER 1932. Calculando o estatístico t , pode apreciar-se mais precisamente a significação do coeficiente. Encontra-se (1):

$$\begin{aligned} t &= \frac{0.2044}{\sqrt{(1 - 0.2044)^2}} \cdot \sqrt{250} \\ &= 10.44, \end{aligned}$$

emquanto que no ponto $P = .01$, para $n = 300$ é $t = 2.592$.

(1) Podem usar-se tábuas de $1 - r^2$ e $\sqrt{1 - r^2}$, como as de J. R. MINER.

Também podia usar-se o erro médio do coeficiente para dar uma ideia da sua significância:

$$e_r = 0.01917.$$

Correlação entre a côr da pele e a do cabelo — ♀. — As correlações encontradas para o « preto » da pele e da zona interna da iris no sexo feminino, estão na *Tabela XLVII*.

TABELA XLVII

Anos	n'	Coef. de correl.
7	12	0.509
8	33	0.803
9	36	0.535
10	35	— 0.132
11	55	0.039
12	45	0.275
13	59	0.129
14	46	0.076
15	41	— 0.004
16	30	0.297
17	19	— 0.174
18	10	0.122
19	6	— 0.012

São significativos os coeficientes para os 8 e os 9 anos. Dada a diversidade dos coeficientes, parece que deve haver heterogeneidade. A *Tabela XLVIII* fornece os dados para uma análise, como é usual.

TABELA XLVIII

Anos	1) G. l.	2) $\Sigma(x-\bar{x}_i)^2$	3) $\Sigma(y-\bar{y}_i)^2$	4) $\Sigma(x-\bar{x}_i)(y-\bar{y}_i)$	4 ²)	5)=4 ² /2)	6)=3)-5)	G. l.
7	11	0.99	9.04	1.52	2.3104	2.33	6.71	10
8	32	2.68	355.48	24.78	614.0484	229.12	126.36	31
9	35	5.17	40.68	7.73	59.7529	11.56	29.12	34
10	34	1.57	20.87	— 0.85	0.7225	0.46	20.41	33
11	54	3.60	89.45	0.70	0.4900	0.14	89.31	53
12	44	3.31	70.09	4.18	17.4724	5.28	64.81	43
13	58	3.25	53.16	1.69	2.8561	0.88	52.28	57
14	45	2.94	70.89	1.10	1.2100	0.41	70.48	44
15	40	2.16	35.53	— 0.03	0.0009	0.00	35.53	39
16	29	2.50	46.55	3.21	10.3041	4.12	42.43	28
17	18	1.19	21.90	— 0.89	0.7921	0.67	21.23	17
18	9	0.18	39.67	0.32	0.1024	0.57	39.10	8
19	5	0.04	4.14	— 0.01	.0001	0.00	4.94	4
						255.54	602.71	401
	414	29.58	858.25	43.45	1887.9025	63.82	794.43	

As respectivas somas de produtos são: Para o *total*:

$$\begin{aligned}\Sigma \Sigma (x - \bar{x}) \cdot (y - \bar{y}) &= 858.25 - 63.82 \\ &= 794.43\end{aligned}$$

e para *dentro dos grupos*:

$$\Sigma \left\{ (y - \bar{y}_i)^2 - b_{yx_i} \cdot [\Sigma (x - \bar{x}_i) \cdot (y - \bar{y}_i)] \right\} = 602.71,$$

o que dá a análise da covariância da *Tabela XLIX*.

TABELA XLIX

	S. q. p.	G. L.	Var.	F	F 5%	F 1%
Total	794.43	413				
Dentro dos grupos	602.71	401	1.503			
Entre os grupos	191.72	12	15.977	10.630	1.78 — 1.77	2.23 — 2.22

O F obtido é altamente significativo, como se reconhece comparando-o com o ponto 1% correspondente; nas tabelas de F encontra-se:

$$\begin{aligned}\text{para } P = .01 \quad n_1 &= 12 \\ n_2 &= 400 \quad F = 2.23 \\ n_1 &= 12 \\ n_2 &= 500 \quad F = 2.22.\end{aligned}$$

Há manifesta heterogeneidade na covariância entre o «preto» da cor da pele e o dos olhos (zona interna), tal como se pode determinar pelo método usado. No sexo masculino o resultado foi diferente. Era de esperar «a priori» que nas correlações onde entra a cor do cabelo houvesse heterogeneidade, dado o que se sabe do escurecimento da cor do cabelo com a idade. O resultado negativo que se obteve para os ♂, pode ser atribuído a uma excessiva variabilidade dentro dos grupos, o que se torna provável se se atender à tabela X, da análise da variância da cor da pele nos ♂. São necessárias outras observações para o esclarecimento desta e outras questões.

O que é certo, é que não se pode estabelecer uma única correlação entre a cor da pele e a do cabelo (num e noutro caso, considerando apenas o respectivo «preto») nas amostras do sexo feminino estudadas.

Correlação entre a côr do cabelo e a dos olhos — δ . — As correlações para êste caso estão expostas na *Tabela L*.

TABELA L

Anos	n'	Coef. de correl.
8	21	0.568
9	17	0.248
10	16	0.711
11	22	0.405
12	31	— 0.044
13	20	0.634
14	23	0.221
15	18	0.562
16	23	0.311
17	22	0.650
18	17	0.284
19	10	0.819
20	4	0.400
21	6	0.825
22	3	— 0.094

São significativos os coeficientes para os 8, 10, 13, 15, 17, 19 e 21 anos. Os coeficientes das várias idades diferem muito e não se nota uma ordem de aumento ou de diminuição correspondendo à idade. A julgar pelas diferenças dos coeficientes, deve haver heterogeneidade. Os dados da *Tabela LI* servem para a efectuação de uma análise da covariância.

TABELA LI

Anos	1) G. l.	2) $\Sigma (x-\bar{x}_i)^2$	3) $\Sigma (y-\bar{y}_i)^2$	4) $\Sigma (x-\bar{x}_i)(y-\bar{y}_i)$	4) ²	5)=4) ² /2)	6)=3) - 5)	G. l.
8	20	18.07	202.46	34.38	1181.9844	65.41	137.05	19
9	16	9.11	87.66	7.01	49.1401	5.39	82.27	15
10	15	14.06	67.70	21.94	481.3636	34.24	33.46	14
11	21	37.58	112.35	26.89	723.0721	19.24	93.11	20
12	30	55.29	197.90	—4.55	20.7025	0.37	197.53	29
13	19	23.38	432.83	63.76	4065.3376	173.88	258.95	18
14	22	28.91	200.15	16.81	282.5761	9.77	190.38	21
15	17	30.52	135.42	36.14	1306.0996	42.79	92.63	16
16	22	18.93	91.55	13.39	179.2921	9.47	82.08	21
17	21	35.32	199.59	54.55	2975.7025	84.25	115.34	20
18	16	25.97	115.85	15.59	243.0481	9.36	106.49	15
19	9	24.41	278.06	67.49	4554.9001	186.60	91.46	8
20	3	1.39	3.93	0.93	0.8649	0.63	3.30	2
21	5	14.28	18.82	13.53	183.0609	12.82	6.00	4
22	2	0.78	3.72	—0.16	0.0256	0.03	3.69	1
						654.25	1493.74	223
	238	338.00	2147.97	367.70	135203.2900	400.01	1747.96	

Da tabela extraem-se: Soma de produtos *total*:

$$\begin{aligned}\Sigma \Sigma (x - \bar{x}) \cdot (y - \bar{y}) &= 2147.97 - 400.01 \\ &= 1747.96\end{aligned}$$

e dentro dos grupos:

$$\Sigma \left\{ (y - \bar{y}_i)^2 - b_{y \cdot x_i} \cdot [\Sigma (x - \bar{x}_i) \cdot (y - \bar{y}_i)] \right\} = 1493.74$$

A análise final encontra-se na *Tabela LII*.

TABELA LII

	S. q. p.	G. l.	Var.	F	F 5%	F 1%
Total	1747.96	237				
Dentro dos grupos	1493.74	223	6.698			
Entre os grupos	254.22	14	18.199	2.711	1.73	2.28-2.24—1.88-1.85

O valor que figura na tabela para o ponto 5% é um valor interpolado, já anteriormente obtido. Porém, o F desta análise é superior ao correspondente ponto 1%, como se vê comparando-o com os valores seguintes:

para P = .01	$n_1 = 12$		
	$n_2 = 200$	F = 2.28	
	$n_1 = 12$		
	$n_2 = 300$	F = 2.24	
	$n_1 = 24$		
	$n_2 = 200$	F = 1.88	
	$n_1 = 24$		
	$n_2 = 300$	F = 1.85.	

Há, portanto, manifesta heterogeneidade e não se pode calcular um só coeficiente de correlação abrangendo tôdas as observações.

Correlação entre a côr do cabelo e dos olhos — φ . — No sexo feminino obtive os coeficientes de correlação da *Tabela LIII*.

São significativos os coeficientes correspondentes aos 7 e 12 anos, o dos 9 anos está aproximadamente no limiar da signi-

ficância. De resto, parece haver heterogeneidade, como para os \bar{X} .

TABELA LIII

Anos	n'	Coef. de correl.
7	12	0.664
8	33	0.274
9	36	0.339
10	35	0.113
11	55	0.217
12	45	0.524
13	59	0.244
14	46	0.153
15	41	0.045
16	31	0.438
17	19	0.360
18	10	-0.310
19	6	-0.126

Na Tabela LIV estão os dados para a análise da variância.

TABELA LIV

Anos	1) G. l.	2) $\Sigma(x-\bar{x}_i)^2$	3) $\Sigma(y-\bar{y}_i)^2$	4) $\Sigma(x-\bar{x}_i)(y-\bar{y}_i)$	4) ²	5)=4) ² /2)	6)=3)-5)	G. l.
7	11	9.05	355.49	37.69	1420.5361	156.97	198.52	10
8	32	63.44	226.88	32.91	1083.0681	17.27	209.61	31
9	35	40.68	404.99	43.48	1890.5104	46.47	358.52	34
10	34	26.87	337.62	10.73	115.1329	4.29	333.33	33
11	54	89.45	599.41	50.28	2528.0784	28.26	571.15	53
12	44	70.09	350.30	82.12	6743.6944	96.21	254.09	43
13	58	53.16	379.46	34.70	1204.0900	22.65	356.81	57
14	45	71.89	342.43	23.86	569.2996	7.92	334.51	44
15	40	35.78	295.20	4.64	21.5296	0.60	294.60	39
16	30	46.62	397.27	59.64	3556.9296	76.30	320.97	29
17	18	21.90	124.23	18.79	353.0641	16.12	108.11	17
18	9	13.19	84.13	-10.32	106.5024	8.07	76.06	8
19	5	4.94	26.03	-1.43	2.0449	0.41	25.62	4
						481.54	3441.90	402
	415	547.04	3923.44	387.09	149838.6681	373.98	3649.46	

A partir da tabela calcula-se para soma de produtos *total*

$$\begin{aligned}\Sigma \Sigma (x - \bar{x}) \cdot (y - \bar{y}) &= 3923.44 - 273.98 \\ &= 3649.46\end{aligned}$$

e para dentro dos grupos

$$\Sigma \left\{ (y - \bar{y}_i)^2 - b_{y_i x_i} \cdot [\Sigma (x - \bar{x}_i) \cdot (y - \bar{y}_i)] \right\} = 3441.90.$$

A parte final da análise encontra-se na *Tabela LV*.

TABELA LV

	S. q. p.	G l.	Var.	F	F 5%	F 1%
Total	3649.46	414				
Dentro dos grupos	3441.90	402	8.562			
Entre os grupos	207.56	12	17.297	2.020	1.78 — 1.77	2.23 — 2.22

Encontra-se nas tabelas de F :

$$\begin{aligned} \text{para } P = .05 \quad n_1 &= 12 \\ & n_2 = 400 \quad F = 1.78 \\ & n_1 = 12 \\ & n_2 = 500 \quad F = 1.77 \end{aligned}$$

e, portanto, há heterogeneidade. O F obtido está abaixo do correspondente ponto 1%. Também *para o sexo feminino não se pode calcular um só coeficiente de correlação entre o «preto» da cor do cabelo e o da cor dos olhos*. Era de esperar que os resultados quanto à correlação entre a cor do cabelo e qualquer das outras, fossem a demonstração de heterogeneidade, em virtude de o cabelo escurecer com a idade. A excepção para o sexo masculino, no caso da pele e cabelo, deve ser causada por uma variância extraordinária na cor da pele, como referi.

* * *

Sumarizando os resultados destas análises, verifica-se que eles são um pouco diferentes conforme o sexo: enquanto que todas as covariâncias são heterogêneas no sexo feminino, no masculino há homogeneidade na covariância entre a pele e cabelo, e no caso da covariância da pele e olhos há diferença entre as variâncias, devida à variância que é tomada como erro. Estas diferenças entre os dois sexos podem explicar-se por uma distribuição anormal da variância total da cor da pele pelas duas categorias — entre os grupos e dentro dos grupos. Todas as análises em que entra a cor da pele concordam com esta hipótese. Podem supor-se várias causas desta anormal distribuição da variância, umas dizendo respeito à constituição das amostras, outras ao método empregado; uma causa provável e que explicaria tam-

bém a diferença (pequena, mas significativa) entre a cor da pele nos dois sexos, consiste na desigual distribuição dos efeitos dos agentes externos sobre a epiderme do ante-braço nos dois sexos, como expuz a propósito da diferença entre a cor da pele nos ♂ e ♀.

Outro ponto que ressalta das análises efectuadas é a impossibilidade de se calcular um só coeficiente de correlação para a maior parte dos casos; se não tivesse feito a análise da covariância era muito provável que calculasse um coeficiente geral, que, afinal, não era representativo de todos os casos.

*
* *
*

O problema de ordem prático que causou a execução de todas estas análises — correcção aos dados de genealogias para diferentes idades — levantou uma série de outros problemas, como sejam, os que dizem respeito à própria natureza e causas do escurecimento com a idade. Desde que as curvas do escurecimento com a idade sejam conhecidas, é possível corrigir os dados das genealogias para uma determinada idade, supondo que é legítimo substituir-se a curva de escurecimento individual pela do escurecimento médio. Na discussão final voltarei novamente a este assunto, conjuntamente com a discussão de outros dados que podem ajudar a esclarecer o problema.

Num certo número de análises da variância encontrou-se heterogeneidade entre as médias dos vários grupos. Em princípio, é sempre possível num material duma certa variância conseguir-se um arranjo em grupos, de tal forma que fique existindo heterogeneidade entre as respectivas médias. A heterogeneidade está na dependência da variação do colectivo e dos grupos arbitrários em que se divide. No caso que tenho analisado trata-se de agrupamentos naturais, como é a idade, e o intervalo de um ano aparece como uma escala perfeitamente ao nível da precisão e rigor exigidos. A heterogeneidade não será, pois, causada por esta distribuição em idades. Igualmente se aplicam estas considerações à covariância: a heterogeneidade demonstrada em certas das análises deve ser devida a causas de ordem experimental ou observacional, ou derivadas da natureza do material.

Constituição química das melaninas

O estudo da constituição e propriedades químicas dos pigmentos é, sem dúvida, muito importante para a compreensão de uma série de factos biológicos relativos à pigmentação, além de que só por si a investigação dos pigmentos constitui um tema interessante. O estudo dos compostos «*altos-polímeros*», pelas relações directas que têm muitos déles com a vida, é de primacial importância para o avanço da Bioquímica. Terei ocasião de referir alguns dos problemas fundamentais relacionando-se com estes estudos.

Depois, a hereditariedade só se pode abordar em certos casos por analogia, pelo menos enquanto se não usarem métodos diferentes dos actuais; está neste caso o estudo de várias questões da hereditariedade no homem. Para que se possam tirar conclusões válidas por analogia, convém demonstrar que realmente a analogia existe ou é muito provável. Por exemplo, para a hereditariedade da pigmentação no homem, E. FISCHER partiu, em grande parte, dos resultados de NACHTSHEIM sobre os coelhos, procedendo por analogia — e esta analogia é muito incompletamente fundada. Não se sabia se os pigmentos existentes no coelho (pêlos) têm os seus homólogos no homem, não se sabia mesmo quantas espécies diferentes de pigmentos existem no coelho como compostos químicos diferentes. É claro que este desconhecimento não impediu a descoberta e firme estabelecimento da hereditariedade da pigmentação no coelho, mas é conveniente que, para se tirarem legitimamente analogias, se conheça um certo número de factos basilares.

Ponderando estas circunstâncias, parece que seria desejável a efectuação de algumas investigações sobre a química dos pigmentos melânicos. Contando com a natural dificuldade dos estudos neste campo, era preciso previamente executar várias tentativas com o fim de verificar até que ponto era possível com os métodos de que dispunha, aprofundar um pouco os conhecimentos sobre o assunto. Relato a seguir as investi-

gações que efectuei neste sentido, depois de uma resenha do estado actual destas questões.

*

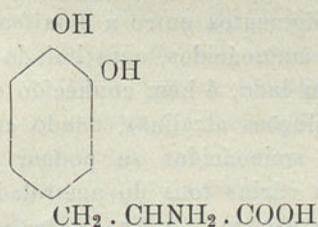
*

*

A constituição dos pigmentos melânicos foi estudada principalmente nos pigmentos da pele do homem. Já me referi à impropriedade da pele para tais estudos, pois é difícil isolar da pele as respectivas melaninas. Pelo contrário, os cabelos e pêlos prestam-se melhor ao isolamento e ulterior investigação.

Os vários autores referem-se à melanina, ou às melaninas, da pele, quasi indistintamente, e da maneira como expõem os resultados conclui-se que alguns admitem implicitamente a existência de uma só espécie de melanina na pele.

As investigações anteriores a 1927 estão mais ou menos sumarizadas e criticadas em BLOCH 1927. BLOCH presume que o pigmento (refere-se principalmente ao pigmento da pele e escreve «pigmento»), como se considerasse um só pigmento) provém de *dioxfenilalanina*, ou abreviadamente *dopa*, por oxidação provocada por um fermento oxidante — a *dopaoxidase*. A dopa tem por fórmula:



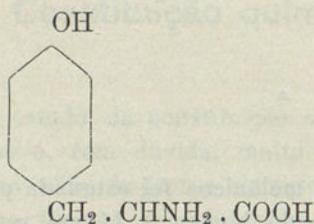
É um derivado da pirocatequina (ortodioxibenzeno).

A reacção de BLOCH, para demonstração da existência do fermento que produz o pigmento da pele, consiste no tratamento das células

com dopa. Se existe uma oxidase específica (verificou-se que substâncias vizinhas da dopa já não são oxidadas) as células mostram uma coloração escura. A reacção dá-se, tanto em pedaços da pele, como nos seus sucos («Pressaftten»).

Outros autores eram partidários da opinião que considerava os pigmentos como derivando da *tirosina* (amina do ácido

paraoxifeniloxipropiónico), um dos mais importantes e mais espalhados aminoácidos, cuja fórmula é:



Uma oxidase mais ou menos específica, a *tirosinase* faria aparecer o pigmento, por oxidação.

A teoria da dopa, de BLOCH, encontrou mais partidários, devido sobretudo à reacção dopa e ao facto de

se não demonstrar com facilidade a existência de tirosinase nos animais superiores. Por outro lado, encontram-se nas urinas dos melanúricos derivados da pirocatequina, de forma que é mais provável que existam compostos destes nos pigmentos e, segundo BLOCH, é mais provável que a dopa seja a profase do pigmento e não a tirosina. Outro facto em favor da hipótese de BLOCH consiste na ausência de reacção na pele dos albinos e nos «vitiligos». A composição elementar da melanina também se não sabe com exactidão, em virtude da impossibilidade de se obter no estado puro.

A reacção da dopa não constitui razão suficiente para se aceitar que os pigmentos melânicos derivam da dioxifenilalanina; sabe-se que a maior parte dos compostos aminados do organismo são mais complicados, e não é por simples analogias que se pode proceder nestas questões. Pode acontecer que realmente numa parte dos pigmentos entre a dioxifenilalanina em combinação com outros aminoácidos, constituindo polipeptidos ou proteínas. Por outro lado, é bem conhecido que a dopa se oxida facilmente nas soluções alcalinas, dando «melanóides»; igualmente de outros aminoácidos se podem obter «melanóides» que apresentam os vários tons do amarelado ao acastanhado e ao castanho muito escuro. A tirosinase, obtida de várias maneiras, reage com tirosina, tiramina e adrenalina, dando «melanóides» (FLORENCE, ENSELME e POZZI 1935); também com a dioxifenilalanina se podem obter os vários tons (VOGE 1935).

Recentemente LINELL e RAPER 1935 investigaram a constituição do cromogénico da melanúria, que parece ser um derivado simples do 5,6 — dioxiindol, isto é, um composto pirrólico-ben-

zénico, derivado do ácido aminoamigdálico. Portanto, a provar-se esta opinião, o argumento de BLOCH, sôbre a existência de derivados da pirocatequina, na urina dos melanúricos, nada diz sôbre a probabilidade de os derivados pirrólicos não entram também na melanina.

A opinião geral supõe que as melaninas são derivados de albuminas vizinhas da adrenalina, ou da dioxifenilalanina, tirosina, etc., contendo anéis aromáticos. Esta opinião é simplesmente fundada em leves analogias e suspeições. A composição química da melanina (ou melaninas) aparece, portanto, como ainda completamente por esclarecer: nem sequer se sabe se há uma ou várias, se são ou não derivados pirocatequínicos ou pirrólicos, e não se conseguiu separá-las de várias outras impurezas.

Além destas investigações sôbre os pigmentos da pele, efectuadas sobretudo no homem, outras há, mais recentes, sôbre os pigmentos dos pêlos nos coelhos, ratos e outros mamíferos e um certo número de estudos, principalmente de carácter especulativo, de JANKOVSKY, SALLER e outros autores. Com respeito aos pigmentos dos cabelos e pêlos, pode concluir-se que o estado dos conhecimentos até à data da publicação do citado livro de BLOCH (1927) se traduz pelas próprias palavras dêste: as causas das côres qualitativamente diferentes dos cabelos, são-nos desconhecidas.

JANKOVSKY 1932 *a*) e *b*) trata das várias teorias existentes sôbre a côr do cabelo, constituição e morfologia dos pigmentos, etc. Em 1935 (JANKOVSKY 1935) volta ao assunto para rebater opiniões de SALLER, segundo as quais êste último autor e MAROSKE (1933) teriam conseguido, por redução, tornar cabelos claros em escuros. JANKOVSKY 1932 funda-se principalmente nas suas experiências de oxidação para procurar demonstrar várias conclusões. Era já conhecida a acção de água oxigenada, sobretudo em meio alcalino, sôbre os pigmentos; JANKOVSKY estudou esta acção sistematicamente em cabelos humanos de várias cores. Verificou que os cabelos pretos se transformam em loiros e brancos com passagem sucessivamente pelo castanho-avermelhado, vermelho e vermelho-loiro. Os cabelos vermelhos ficam logo loiros e os loiros descoram directamente para o branco. Cabelos castanhos e loiro-escuros podem passar pelo vermelho, ou não, até chegarem ao loiro claro e branco; cabe-

los castanhos e loiros-escuros, muito parecidos na côr, podem, quando oxidados, dar côres diferentes, isto é, uns passam pelo vermelho outros não. A oxidação dá-se muito mais rapidamente em meio alcalino; com meio ácido ou neutro a descoloração pode levar muito tempo.

Segundo JANKOVSKY, na oxidação deve intervir uma enzima oxidase-peroxidase, visto que algumas gotas de KCN foram suficientes para causarem um retardamento da oxidação. Sabe-se, porém, que o cianeto de potássio a quente é redutor, as suas propriedades redutoras são muito menores, quasi nulas, a frio; em todo o caso, pode acontecer que não se tratasse de um fenómeno de «envenenamento» da superficie da enzima, pelo cianeto, mas de uma simples acção contrária à da H_2O_2 . O meio alcalino favorecia, segundo o autor, a acção da enzima e a penetração do oxidante no interior do cabelo. Contudo, não parece necessário admitir a acção de uma enzima quando da oxidação pela água oxigenada, e o meio alcalino favorece certamente a penetração do oxidante pela «dissolução» da queratina e ainda poderia favorecer a acção directa sobre os pigmentos, pois que os álcalis «dissolvem» (e provavelmente modificam) os pigmentos (1). Evidentemente que isto não quer dizer que não se deve aceitar a acção de uma enzima quando se formam na célula os pigmentos a partir das suas profases incolores.

Contrariamente à oxidação, as experiências sobre a redução de cabelos previamente oxidados, não levaram a resultados positivos.

A partir destas observações de oxidação, JANKOVSKY quer tirar conclusões acerca dos pigmentos naturais do cabelo. Diz que é provável que existam vários pigmentos, pelo menos três: preto, vermelho e loiro; mas também diz que é possível que exista só um pigmento. No caso de existirem vários pigmentos, poderia suceder que fossem derivados duma substância por oxidações graduais.

Como se vê por esta exposição resumida, as conclusões de

(1) Verifiquei que fervendo os cabelos a oxidação se dá da mesma maneira e aparentemente com a mesma intensidade. Sabe-se que as oxidases em regra são inactivadas, quando levadas a temperaturas de 100° em meio húmido. De forma que a intervenção de um fermento não parece necessária e parece pouco provável.

JANKOVSKY fundam-se apenas nas oxidações. No entanto, estas oxidações não constituem, só por si, uma base segura; compreende-se perfeitamente que não é muito legítimo a partir de simples oxidações de compostos tão complicados como parecem ser os pigmentos, inferir a própria natureza dos pigmentos, sem se conhecerem as substâncias oxidadas, nem os produtos de oxidação, nem a oxidação em si.

Realizei também oxidações de cabelos de homem e pêlos de coelho, com H_2O_2 amoniacal. Prèviamente eram determinadas as respectivas côres com o pigmentómetro. Verifiquei que a côr primitiva se mantinha (com menor intensidade) nas primeiras fases da oxidação, depois aparecia sempre o loiro. Em cabelos castanhos com um tom amarelo predominante, ficava sempre êste excesso de amarelo predominante, até às fases finais. No caso de haver um excesso de alaranjado (cabelos «vermelhos») continuava, nos primeiros estados da oxidação, a aparecer esta côr em excesso, depois aparecia um excesso de amarelo. Nos cabelos castanhos aparece primeiramente um excesso de côr igual à que tinham já em excesso antes da oxidação: assim se explicaria o que diz JANKOVSKY sôbre a possibilidade de os castanhos passarem ou não pelo tom vermelho (na realidade alaranjado). Tal facto exprime apenas que um tom dominante, e já existente, foi posto em evidência pelo embranquecimento provocado pela oxidação.

Concordam com esta interpretação os resultados de GARDNER e MAC ADAM 1934; pela oxidação com peróxido, como dizem os autores, o comprimento de onda dominante não mudou, apenas aumentaram a pureza e o brilho. A côr dominante não se alterou, portanto. Parece que GARDNER e MAC ADAM não levaram muito longe as oxidações, visto que no caso relatado o brilho apenas passou de 0.054 para 0.086, ou seja de 5.4 para 8.6%. Se tivessem levado mais longe as oxidações, é natural que o resultado fôsse a verificação dum certo deslocamento para o lado dos menores comprimentos de onda. O comprimento de onda dominante da maioria dos castanhos está no amarelo, e nalguns castanhos com tom avermelhado está no alaranjado inferior. O tratamento com a água oxigenada pouco altera o comprimento de onda dominante, que se mantém nas primeiras fases da oxidação.

As conclusões de JANKOVSKY aparecem como pouco prováveis quando se consideram estes resultados espectrofotométricos

cos, os mais seguros até agora obtidos. A oxidação actua principalmente destruindo os pigmentos e então fica mais em evidência a côr dominante já existente.

Os tratamentos com água oxigenada sôbre pêlos de coelho, realizados por mim, levaram-me a concluir que no coelho selvagem, quando se pode distinguir um excesso de côr (quando não são completa ou quási completamente pretos) o excesso é de filtro «vermelho», corrépondendo a um comprimento de onda situado no amarelo ou alaranjado inferior. Antes, como depois do tratamento, o comprimento de onda dominante é sensivelmente o mesmo. Os resultados são os mesmos, quer se considere o tom geral, quer cada uma das zonas que se distinguem nos pêlos do dorso.

Continuando a revisão da literatura: SALLER manifesta em alguns dos seus trabalhos a opinião de que se pode tratar, para o caso do homem, de um só pigmento, que dá tôdas as côres e tons apenas pelo estado de agregação, ou então, que pelo menos a côr preta e a castanha provêm de um só pigmento. SALLER funda-se principalmente sôbre as suas experiências, já citadas, da redução com cloreto de zinco; JANKOVSKY, criticando-o, viu que com cabelos de vidro e nitrato de prata se obtêm vários tons de cabelos e o mesmo se consegue com permanganato de potássio. A deposição da prata ou de óxidos de manganésio fornecia os agregados, que causavam depois, por absorção da luz, as várias côres. A espectroscopia dos «cabelos artificiais» assim obtidos, levou à conclusão que a côr não difere, quer seja o nitrato de prata, quer o permanganato que dê origem aos depósitos. Nem a espectroscopia, nem as várias experiências realizadas com modelos podem, portanto, resolver a antiga questão da existência de um ou de vários pigmentos. As espectroscopias de BUNAK e SOBOLEVA também não levaram a conclusões quanto a este ponto.

Resta ainda mencionar vários trabalhos referentes aos pigmentos de alguns Mamíferos, principalmente no coelho e no rato, devidos a NACHTSHEIM, SCHULTZ, ENGELMEIER, DANEEL e colaboradores.

SCHULTZ 1932 e ENGELMEIER 1934 observando a produção da pigmentação no coelho russo (em que normalmente só as extremidades são pigmentadas), verificaram que o pigmento só se produz quando a temperatura local é inferior a 33-34° C.

Abaixo desta temperatura, que pode ser provocada por exemplo cortando os pêlos à navalha numa certa área, aparece pigmento em qualquer ponto do corpo; acima desta temperatura «crítica» o animal, ou certas áreas, ficam brancos.

DANEEL verificou que a ausência de oxigénio ou a presença de cianeto de potássio impedem a formação de pigmento. Para a formação do pigmento admitia-se, com SCHULTZ, que há duas reacções finais:

profermento → fermento

+ cromogéneo → pigmento.

Se a pele tiver já sido exposta ao frio antes da falta de oxigénio ou presença de cianeto, produz-se a pigmentação. DANEEL concluiu deste facto que o oxigénio só era empregado na 2.^a reacção. SCHULTZ também já conhecia que era preciso oxigénio para aparecer a pigmentação. Outros estudos de DANEEL (1936) com raios Roentgen, não levaram mais longe as conclusões.

ENGELMEIER investigou também o aparecimento das áreas pigmentadas em relação com outros factores, homo e heterozigotismo, etc. A temperatura mínima para o aparecimento da coloração é 30-34° C., conforme a constituição genética; com a constituição genética varia também o tempo mínimo que é necessário para que, abaixo da temperatura crítica, apareça pigmentação.

A interpretação de SCHULTZ explica, em regra, os fenómenos, embora não seja única. Em todo o caso, estes resultados não se podem generalizar a todas as raças, sem mais investigações.

Em novos estudos, DANEEL e SCHAUMANN 1938 conseguiram demonstrar, nos extractos da pele de coelhos pigmentados, a existência da dioxifenilalanina; pelo contrário, não existe esta substância nos coelhos albinos e nos russos (excepto nas extremidades destes últimos). A substância activa precipita dos extractos da pele, pela saturação com sulfato de amónio, o qual, como é sabido, precipita as albuminas. Com a tirosina não pôde ser demonstrada a mesma acção, talvez em virtude de a concentração da substância não ser suficiente — a tirosina é muito menos sensível que a dopa. Nos coelhos russos nota-se que, por arrefecimento, pode aparecer mais substância oxidante. A

substância que favorece a oxidação deve ser um fermento, visto que actua em muito pequenas quantidades.

Afinal, estas experiências correspondem às de BLOCH repetidas, para o caso dos coelhos, «in vitro», e podem-se criticar como as de BLOCH.

NEUMANN 1937 estudou os pigmentos sob o ponto de vista da sua solubilidade, espécies de pigmentos diferentes e constituição química. Os métodos de que se serviu para a resolução destes problemas não parecem, contudo, muito apropriados — e as questões postas não foram resolvidas. NEUMANN parte da idea de que há duas espécies de melaninas, diferentes quanto à solubilidade nos álcalis: feomelaninas e eumelaninas, as primeiras de côr amarela e facilmente solúveis, as segundas castanhas ou pretas e difficilmente solúveis, ou mesmo insolúveis (GOERNITZ 1923 — cit. NEUMANN). A existência destas feo- e eumelaninas, umas solúveis outras insolúveis, é pouco provável, ou antes, muito improvável, como terei ocasião de referir adiante. NEUMANN procurou determinar a côr das soluções de pêlos de várias raças, comparando-as com um padrão que o autor tinha previamente conseguido, dissolvendo um certo pêso de pêlos duma das raças. As comparações entre o padrão e as soluções faziam-se visualmente. Por meio deste processo crê NEUMANN ter demonstrado que as curvas da «dissolução» dos pigmentos das várias raças apresentavam formas diferentes: nas raças em que há amarelo, as curvas mostrariam duas componentes, uma dum pigmento facilmente solúvel, outra dum pigmento difficilmente solúvel. O método usado não parece, contudo, muito próprio para as determinações da intensidade da côr, pois podia acontecer, o que realmente se dá, que o padrão e a solução diferissem não só na intensidade ou «quantidade», como também na «qualidade» da côr. Observando com certo cuidado, verifica-se que realmente parece existir uma diferença de côr entre as soluções da raça «sandfarbig» que forneceu o padrão e, por exemplo, as soluções de «preto» ou de «havana». Para isolar os pigmentos, os pêlos duma raça com côr amarela foram dissolvidos por NEUMANN em KOH, em seguida tratados com HCl. A parte alcool-insolúvel do precipitado foi dissolvida em NH_4OH e evaporada à secura no vazio, retomada com água e precipitada com ácido. Assim obtive a fracção que o autor supoz que era idêntica às feomelaninas. Outras fracções foram ficando que

não mereceram atenção de maior. É curioso que obteve também resíduos insolúveis (que seriam feomelaninas!) a partir de coelhos albinos. Parece natural atribuir alguns destes resultados à não-consideração da outra parte importante que forma os pêlos — a queratina.

O autor refere-se ainda a uma determinação do peso molecular da fracção que corresponde às suas « feomelaninas », supondo que apenas um átomo de prata se ligava a cada molécula, o que de forma alguma está provado, nem é sabido. Estes resultados de NEUMANN apenas se podem tomar como vagamente tentando um pouco o conhecimento de substâncias tão complicadas, como parecem ser os pigmentos e como na realidade são as queratinas (¹).

Outro estudo que também se refere à solubilidade é o de EINSELE 1937. Neste caso, o material constava de ratos das culturas de DUNN e o fim era a determinação quantitativa da melanina existente nos vários alelomorfos da série albina, quando combinados com as cores amarela, castanha e preta, estas últimas formando também uma outra série de alelomorfos. EINSELE usou como método de separação da queratina e melaninas a hidrólise da queratina com HCl 6 n, fervendo hora e meia em condensador de refluxo. Obtinha um preparado amarelado, formado por grânulos de melaninas com uma certa quantidade dos produtos da hidrólise da queratina adsorvida à superfície. Os grânulos deste preparado eram retomados com água destilada, por centrifugação. Este processo originava grandes perdas de pigmentos, pois que no caso de genótipos claros a quantidade de preparado era nula ou quási nula. Isto pode também significar que os pigmentos são atacados pelo HCl com a concentra-

(¹) Há ainda certos aspectos do trabalho de NEUMANN que são inesperados: Pêlos de coelho albino foram tratados com NaOH n/20 durante 16 horas, e de novo tratados mais 7 dias com nova quantidade de NaOH. A 2.ª solução obtida diz o autor que era amarela. Soluções de pêlos de coelho albino por mim obtidas com NaOH n/20 durante muitos dias (até dois meses), não mostraram tal fenómeno, ficaram sempre incolores. Também não posso confirmar a obtenção de várias fracções coradas a partir dos albinos, tratando as soluções como as dos pigmentados. É notório que pequenas impurezas que vêm agarradas aos pêlos podem, ao fim de certo tempo, conferir uma coloração às soluções de albinos. Também é sabido que o contacto da potassa ou da soda cáustica com as rólhas de cortiça pode dar produtos corados.

ção usada. Pêlos de albinos tratados da mesma maneira deixavam um resíduo insolúvel e dêles resultava uma solução turva. Juntando a esta solução turva os pigmentos obtidos da maneira descrita e deixando-os depositar, a solução tornava-se clara, o que levou à conclusão que os produtos de decomposição da queratina eram em grande parte adsorvidos pelos grânulos dos pigmentos. A quantidade de queratina, isto é, da queratina e produtos de decomposição, ou só dêstes, fornecia um termo de correção para o julgamento da quantidade de pigmento de cada genotipo. A quantidade adsorvida depende do estado da solução de queratina hidrolisada e não da quantidade de pigmento com que se faz a adsorção.

A questão da existência de uma só ou de várias melaninas é abordada por EINSELE, mas não resolvida. Quando em solução, diz o autor que as melaninas dão tôdas a mesma côr (com tons diferentes), quer provenham de ratos amarelos, quer de castanhos ou pretos. Quando sêcos, os preparados mostram côres com diferenças da mesma ordem das existentes nos respectivos genotipos. Não se podem, portanto, tirar daqui quaisquer conclusões, tanto mais quanto é certo que o autor verificou que os grânulos dos pigmentos claros eram menores que os dos pigmentos escuros; poderia pensar-se em diferenças de ordem puramente quantitativa na agregação dos grânulos. Como resultado geral, EINSELE concluiu que a quantidade de melanina é maior para os genotipos escuros do que para os claros.

DUNN e EINSELE 1938 estudaram mais ou menos o mesmo material sob aspectos similares; verificaram que as diferenças mais tangíveis entre os vários genotipos são constituídas pelos diferentes tamanhos dos grânulos, diferenças quantitativas, portanto.

JANET 1938 estudou as curvas de absorção das melaninas preparadas por EINSELE, com um espectrofotômetro KÖNIG-MARTENS. Observou pequenas diferenças nas curvas de absorção, que podem ser devidas a impurezas. O método fotométrico não parece muito próprio para a resolução da questão da existência de um só ou de vários pigmentos; seriam precisas soluções realmente puras e não se poderia evitar o efeito da dispersão, que necessariamente deve ser considerável em soluções como as dos pigmentos, com luz de Tyndall tão forte.

Parece poder-se concluir desta breve revista da literatura, que os problemas envolvidos pelos factos químicos mais elementares relativos aos pigmentos melânicos, estão ainda por esclarecer e resolver. Discute-se se há uma só ou várias melaninas, se há ou não um pigmento difuso, e eventualmente procura-se a explicação da possível natureza dos pigmentos, por intermédio de modelos mais ou menos simplistas. O primeiro problema a resolver é o da separação dos pigmentos e queratina; em seguida, o da verificação da unidade ou diversidade dos pigmentos dentro de cada espécie e em grupos mais ou menos extensos. Outros problemas não menos importantes, como a fenogénese, com todos os seus aspectos particulares, estão dependentes da solução dos primeiros. É natural concluir-se que as soluções só poderão provir da utilização de novos métodos. Depois duma descrição sucinta do estado actual dos conhecimentos mais recentemente adquiridos sobre proteínas, é relatada a utilização de alguns destes métodos e dos resultados com eles obtidos.

Composição e estrutura das proteínas

Quero apenas referir-me aos dados recentes da química e da roentgenoscopia das proteínas que são de imediata importância para os problemas de que me ocupo no presente trabalho; conhecimentos gerais e básicos sobre as proteínas estão expostos em livros como por exemplo o de PAULI e VALKÓ 1933.

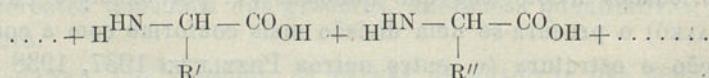
Em primeiro lugar, nota-se, logo que se procura tomar conhecimento com as proteínas, um excesso de terminologia. Assim, as classificações propostas para os corpos albuminóides são várias e todas manifestamente artificiais, baseadas mais sobre propriedades fisiológicas que químicas (v. por exemplo PAULI e VALKÓ) e procura-se uma divisão mais conforme com a constituição e estrutura (v. entre outros PRZYLECKI 1937, 1938 ou HAUROWITZ 1936). As investigações tendem a demonstrar a unidade de estrutura ou plano fundamental de constituição das proteínas e os resultados que mais influência exerceram na nova direcção impressa a estes estudos devem-se principalmente à descoberta da estrutura da queratina e alguns outros biocolóides muito importantes. Estes resultados interessam ainda e particularmente aos problemas da pigmentação, visto que é a queratina que constitui quasi todo o pelo ou cabelo.

Com base na estrutura e composição, HAUROWITZ divide as proteínas em *esferoproteínas* e *linearproteínas*, conforme a molécula é mais ou menos esferóide, ou é alongada (ou fibrosa). Nas *esferoproteínas* ha dois grupos principais: as *não-agregantes*, que não formam agregados em meios desprovidos de sais (sem grupos negativos exoiónicos) — albuminas, hemoglobinas, pseudoglobulinas; e as *agregantes*, que não se dissolvem na água pura (com grupos exoiónicos positivos e negativos) — englobulinas e fosfoproteínas, prolaminas. As *linearproteínas* podem dividir-se, quanto à solubilidade, em: *solúveis* em água, podendo agregar-se em certos estados desde que a água seja desprovida de sais — gelatina, fibrinogéneo; e *insolúveis* na água, com ligações em ponte dentro ou entre as «moléculas» — queratina, colagénico, fibrina.

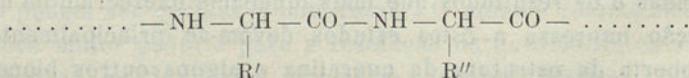
Como se vê, a solubilidade ocupa neste quadro o papel principal, depois da estrutura. Segundo parece, a solubilidade está em relação directa com a existência de grupos exoiónicos, podendo dar ligações salinas ou outras mais fortes ainda, como por exemplo as da queratina, constituídas por «pontes» entre os enxôfres de dois radicais da cystina.

A divisão em esfero e linearproteínas não é absoluta (1), visto que há termos de transição, com moléculas em vareta mais ou menos longa. Mas parece, de facto, ser muito provável a unidade de tôdas as proteínas no que respeita ao seu plano fundamental, quer se trate de corpusculares, quer de fibrosas.

A hipótese mais aceite quanto à composição das proteínas é a de EMIL FISCHER. Segundo FISCHER, as proteínas são formadas pela reunião de cadeias de polipeptidos. Êstes polipeptidos provêm da união de dois ou mais aminoácidos por condensação:



resultando uma cadeia:



(1) Segundo ASTBURY 1937 o nome «globular» é preferível ao de esferóide e ainda melhor (ASTBURY 1938) será o de «corpuscular».

em que R', R'', etc. indicam radicais diferentes, os *restos* dos aminoácidos. Por hidrólise das proteínas obtêm-se os α aminoácidos correspondentes, o que está de acôrdo com a ligação polipeptídea acima indicada (1). O estudo da fibroína da sêda (a que se poderá chamar também «setofibroína») pelos raios X, feito por vários autores e finalmente interpretado por MEYER e MARK em 1928 (v. HALLE 1937) veio impulsionar fortemente os estudos roentgenográficos. Outro grande impulso foi dado pela descoberta de ASTBURY da existência de dois estados diferentes da queratina. Por extensão forçada da queratina vulgar — queratina α (cabelos ou lã) — depois da acção da água a frio, obtêm-se a queratina β ; o diagrama de raios X da queratina β é muito semelhante ao da setofibroína. Nas fotografias da queratina β , como nas da fibroína da sêda, observa-se uma distância periódica de 3.5 \AA ao longo da cadeia polipeptídea. Esta distância de 3.5 \AA deve representar a distância a que se repetem os restos aminoácidos R (R', R'', R''', etc.) — v. HALLE 1937, com a sua bibliografia, ou ASTBURY 1934, 1938.

Na setofibroína êstes restos são principalmente restos da glycina e da alanina, os dois aminoácidos mais simples. Na queratina encontraram-se muitos aminoácidos (2), entre os quais a *tirosina*, com núcleo aromático, a *prolina*, com radical pirrólico, e o *triptofano*, com um anel pirrólico e benzénico condensados. A *fenilalanina* não aparece mencionada como aminoácido derivado da queratina.

A queratina β e a fibroína da sêda terão, segundo os roentgenogramas, a mesma estrutura fundamental, ao passo que a queratina α tem apenas metade da extensão da queratina β e deve ser um estereoisómero obtido da queratina α por uma transformação lactama-lactima. Tais formas de isomeria encontram-se freqüentemente nos aminoácidos e na série úrica, por exemplo em compostos contendo carbonilos e radicais amina.

(1) Convém notar que muitos autores não concordam com esta fórmula de EMIL FISCHER.

(2) O número de aminoácidos derivados das proteínas por hidrólise é actualmente de 22 (ASTBURY-Maio de 1938).

Não está ainda decidido qual das duas transformações se dá de facto (1); embora pareça provável que seja a primeira, outras observações estão mais de acôrdo com a segunda. Poderia ainda acontecer, segundo WRINCH e LLOYD 1936, que a ligação fôsse efectuada por um hidrogénio oscilando entre os dois grupos CR e CO ou N e CO.

Em água quente (vapores) obtém-se uma forma de queratina que tem apenas 2/3 do comprimento da queratina α e a que corresponderá a fórmula (4) — é a *queratina sobrecontractada*.

Os roentgenogramas são explicados por estas fórmulas da queratina, com que estão de acôrdo, igualmente, todos os factos conhecidos.

O que estabelece a distinção entre a estrutura da sôda e a da queratina (pêlos, cabelos, unhas, pele, etc.) é a existência, nesta última, da forma α , com a estrutura que foi referida. Quando se submete a queratina à acção do vapor de água ou dos álcalis e depois se expande, a fibra perde a propriedade de se contrair. Para explicar êste facto, admite-se que na queratina se formam ligações entre os restos aminoácidos de cadeias vizinhas, ligações de tipo salino entre NH_2 e COOH de dois restos vizinhos ($-\text{COO}^- - \text{N}_3\text{N}^-$) e, além destas, outras ligações mais importantes entre S vizinhos, dos restos cystina, (SPEAKMANN 1933). Verificou-se que, de facto, se encontram as ligações S-S realizadas na molécula da queratina e que a sua ruptura é originada por hidrólise (v. SPEAKMANN). Êste mecanismo entra em acção quando se dissolve a queratina para a obtenção dos pigmentos, por exemplo. A sôbrecontractação só se dá depois de rôtas as ligações S-S, ou pelo menos uma parte destas ligações.

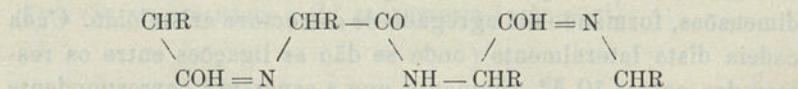
As cadeias de queratina dispõem-se lado a lado nas três dimensões, formando um agregado de estructura cristalóide. Cada cadeia dista lateralmente (onde se dão as ligações entre os restos) das outras 10 \AA , enquanto que a espessura correspondente a cada cadeia é de 4.5 \AA . Teremos, assim, uma réde em que as distâncias são, em planos perpendiculares ao eixo da fibra (e perpendiculares entre si), de 4.5 e 10 \AA , e verticalmente (paralelamente ao eixo da fibra) de 3.5 \AA .

(1) Pode mesmo acntecer que não se dê nem uma nem outra. Estas hipóteses não são aceites por vários autores.

O estudo detalhado da queratina poderia não ter grande significado para as proteínas em geral, se outros factos não viessem demonstrar que existem profundas analogias. Assim, os roentgenogramas dos músculos têm flagrantes semelhanças com os da queratina (ASTBURY e DICKINSON 1935, 1936, ASTBURY 1938). Dos resultados obtidos conclui-se que a *miosina*, a proteína responsável pelo mecanismo (não pela energia) da contracção muscular, tem uma estrutura em cadeia polipeptídica como a da queratina. A forma normal do músculo corresponde à forma α da queratina e a contracção muscular é a passagem a uma forma correspondente à da queratina sobrecontraída. Para mais completo paralelismo entre as duas proteínas, pode-se conseguir, estendendo muito a miosina, um roentgenograma correspondente ao da queratina β . A miosina tem pouco S, de forma que as ligações S-S não impedem, a contracção (sobrecontração) visto que não existem, ou existem em pequena quantidade, o que distingue a elasticidade da queratina e da miosina. Há até quem compare a queratina à miosina quasi-vulcanizada (ASTBURY).

Ao mesmo grupo da queratina e miosina pertence a fibrina, ou proteína da coagulação do sangue (KATZ e ROOY 1933); a sua cadeia corresponde exactamente à da β -queratina.

O colagéneo e a gelatina dão um outro diagrama, diferente do da queratina, com uma distância de cerca de 2.85 \AA ($2.84\text{-}2.86$) sobre a direcção do eixo da fibra, o que se pode explicar supondo uma ligação com a forma «cis» entre os elementos da cadeia polipeptídica



de que a cadeia da β -queratina e da setofibroína é a forma «trans».

A distância calculada por esta fórmula concorda com o valor experimentalmente observado. O cauchú mostra uma conformação semelhante, com formas «cis» e «trans». Em certos reagentes e em água quente, o colagéneo contrai-se até $3/4$ do seu comprimento, correspondendo então à forma sobrecontraída da miosina e, como esta, mostra grande elasticidade.

Pertencem ao mesmo grupo do colagénico: a gelatina, derivado artificial do colagénico, e também a elastina e a elastoidina das fibras elásticas (tecido conjuntivo elástico). A constituição deste grupo de proteínas não está ainda, contudo, suficientemente esclarecida.

Tôdas as estruturas fundamentais das proteínas a que tenho feito referência se podem resumir com ASTBURY nos quatro esquemas da figura 10 (a contar da esquerda).

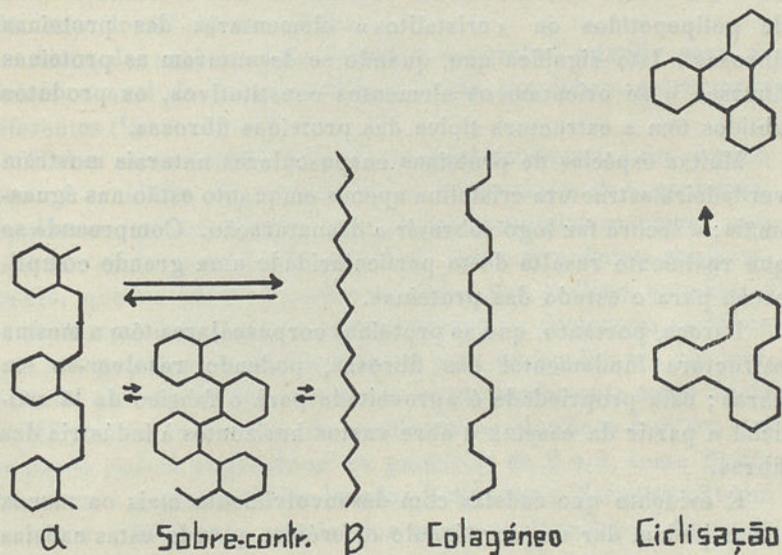


FIG. 10

Estruturas das proteínas. Da esquerda para a direita: queratina α ; queratina sobrecontraída; queratina β ; colagénico; formas cíclicas de WRINCH.

Além das proteínas fibrosas há ainda um outro grande grupo constituído pelas que têm estrutura corpuscular. Talvez, mesmo, a maior parte das proteínas pertençam a esta categoria. Podem apresentar-se cristalizadas, e quando sujeitas à acção de um campo centrifugo muito intenso comportam-se como se fôsem quasi-esféricas ou esferóides (SVEBERG 1934 e vários outros trabalhos do mesmo autor). Os roentgenogramas concordam com os dados da ultracentrifugação e demonstram um diâmetro médio de 40 A° para as moléculas. Êste mesmo tamanho se obteve pelo estudo de filmes monomoleculares.

Quando se dá a desnaturação (1), obtêm-se, a partir das proteínas corpusculares, filamentos ou fibras que mostram o diagrama característico das proteínas fibrosas (o diagrama da β -queratina), desde que estejam sujeitas a uma certa tensão. Dá-se então uma orientação das partículas, o que origina o aparecimento desta estrutura; quando as partículas não estão orientadas, então a proteína desnaturada mostra um diagrama como se fôsse quási-amorfa, no entanto já com as distâncias de 4.5 e de 10 Å, conhecidas como distâncias entre as cadeias de polipeptídeos ou «cristalitos» elementares das proteínas fibrosas. Isto significa que, quando se desnaturam as proteínas fibrosas e se orientam os elementos constitutivos, os produtos obtidos têm a estrutura típica das proteínas fibrosas.

Muitas espécies de proteínas corpusculares naturais mostram verdadeira estrutura cristalina apenas enquanto estão nas águas-mãis; a secura faz logo sobrevir a desnaturação. Compreende-se que realmente resulte desta particularidade uma grande complicação para o estudo das proteínas.

Parece, portanto, que as proteínas corpusculares têm a mesma estrutura fundamental das fibrosas, podendo resolver-se em fibras; esta propriedade é aproveitada para o fabrico da lã artificial a partir da caseína e abre vastos horizontes à indústria das fibras.

É evidente que cadeias com desenvolvimento mais ou menos linear podem dar um corpúsculo esférico, quando estas cadeias e certas das suas porções estão mais ou menos enoveladas. Quanto à maneira como se faz o enovelamento destas porções de cadeia, tanto como o das várias cadeias, parece provável que seja também da forma já descrita para a queratina, isto é, que seja um desenvolvimento das uniões do tipo anel de seis membros, como deduziu WRINCH a partir da simetria dos cristais das proteínas (WRINCH 1936 *a*) e *b*) e 1937). Para explicar a unidade de comportamento, principalmente na cristalização, admitiu WRINCH que a partir da forma lactima se dá uma ciclização como está representado na figura 10 à direita; formar-se-iam assim os chamados «ciclois». Cada ciclol contém um certo

(1) Por desnaturação entendem-se mudanças no estado natural da proteína, principalmente aparentes na sua solubilidade.

número de grupos CHR, sempre múltiplos do 6 e é este número que dá o nome ao ciclol. A estrutura dos ciclois explica porque existem nas moléculas das proteínas apenas aminoácidos esquerdos, para o que é suficiente supôr que na fórmula cíclica ficam todos para o mesmo lado da cadeia, para o lado de dentro. Esta teoria presta-se a interessantes desenvolvimentos em relação, por exemplo, com a estrutura de cromosomas, substâncias carcinogénicas, etc. As várias cadeias que compõem uma molécula estão enoveladas de maneira que resulta um diâmetro de 40 A° em média.

Além do anel lactima, também é possível admitir para os ciclois o anel de forma enólica e então provinham estruturas diferentes (1).

Tôdas estas teorias e interpretações conduzem a um mesmo fim: à unidade de estrutura e composição das proteínas. Apoiam-se principalmente nos dados roentgenoscópicos, mas existem ainda provas, de natureza física e química conjuntamente, que se obtêm ligando os dados das análises químicas e os da ultracentrifugação e roentgenoscopia. SVEDBERG verificou que nas proteínas monodispersas o pêso molecular era um múltiplo de um número que êle tomou aproximadamente como sendo 34.500, o pêso molecular da ovoalbumina. Verificou também que os pesos podem exprimir-se em potências de 2 e 3, como $2^n \cdot 3^m$. Ao mesmo esquema foram levados BERGMANN e NIEMANN (cit. em ASTBURY 1937) pelo estudo dos restos aminoácidos. Segundo BERGMANN e NIEMANN, o número total de aminoácidos, bem como o número de cada das espécies que entram numa proteína, pode exprimir-se como $2^n \cdot 3^m$, o que dá para pêso molecular das proteínas, sendo 17.600 a unidade de pêso molecular, aproximadamente os resultados que encontrou SVEDBERG.

Emquanto que o método de ultracentrifugação só pode ser aplicado no caso de monodispersão, o método analítico de BERGMANN e NIEMANN pode aplicar-se mesmo às proteínas fibrosas em que aparece polidispersão quando se dissolvem, ou que são naturalmente polidispersas e fibrosas; neste último caso estão a caseína e globulinas. Os dados analíticos existentes referem-se a duas proteínas corpusculares — ovoalbumina e

(1) Muitos autores não admitem a existência dos ciclois.

hemoglobina e a duas fibrosas — fibrina do sangue e fibroína da sêda. A tôdas se adapta bem o mesmo esquema: os restos aminoácidos são em número $2^n \cdot 3^m$ e os pêsos moleculares concordam com os de SVEDBERG (v. ASTBURY 1938) (1).

Além das proteínas corpusculares e fibrosas — que se mantêm com estrutura respectivamente corpuscular e fibrosa quando em solução, desde que não sobrevenha ruptura da cadeia — outras há que estabelecem transição, como por exemplo as proteínas corpusculares desnaturadas e certas proteínas naturais, principalmente entre as últimas a queratina das penas das Aves e escamas e carapaças dos Réptis. Neste caso, das Aves e Réptis, o diagrama de raios X mostra uma estrutura complicada, que se pode interpretar supondo que existe uma parte semelhante à queratina β , e uma outra corpuscular.

Os virus cristalisáveis são outro caso interessante na história da estrutura das proteínas; é curioso terem também grande interêsse para o estudo do gene. Os virus são, notòriamente, proteínas solúveis e os seus «cristais» dão diagramas típicos. Por orientação numa corrente, podem obter-se dos virus roentgenogramas semelhantes aos das proteínas fibrosas, isto é, as partículas dispõem-se como se fôsem cristalitos duma fibra e não como se fôsem verdadeiros cristais. Os seus «cristais» terão apenas estrutura completamente cristalina em duas direcções e podem formar geles que interiormente são cristalinos. Os virus podem já ser classificados roentgenograficamente, mas a interpretação da sua estrutura está ainda pouco adiantada.

*

* *

Não quero passar sem me referir ainda a alguns trabalhos respeitantes à estrutura da queratina da pele. Segundo KLÖTZER e SAUPE 1936, a pele apenas mostra estrutura fibrosa nos roentgenogramas quando não está muito impregnada de água; quando está muito embebida a estrutura é amorfa. GIROUD e CHAMPETIER 1936 dizem que no extracto mucoso e nos apêndices

(1) As determinações de BERGMANN e NIEMANN estão, porém, sujeitas a muitos erros, o que torna os resultados um tanto incertos.

da pele se obtém o mesmo diagrama da α -queratina. Os autores interpretam êste resultado supondo que as fibrilhas existentes no extracto mucoso é que contêm a queratina, visto que são comuns a esta camada e à córnea, e assim se explicaria que ambas as camadas mostrassem o mesmo diagrama. A formação da camada córnea não alteraria, portanto, a cadeia polipeptidea, mas talvez as cadeias laterais ou o plasma em volta.

No que respeita à análise do extracto córneo, WILKERSON 1934 verificou a existência de arginina, lisina e histidina na proporção molecular de, respectivamente, 15:5:1. Deve notar-se que esta análise foi feita na epiderme de um doente com «dermatite exfoliativa»; o que analisou o autor foi, portanto, a queratina das células ainda com núcleos, ou paraqueratina. Estas proporções não serão válidas para a queratina vulgar e necessitam confirmação.

*

*

*

Finalmente, como particularidade, mas, para as questões de que me ocupo, muito importante, deve mencionar-se a diferenciação das proteínas segundo a origem, obtida também pelos raios X.

A maior parte dos trabalhos sobre proteínas têm sido efectuados principalmente com o fim de demonstrar que as proteínas têm tódas, fundamentalmente, o mesmo tipo de estrutura, o que parece muito provável. A luz Roentgen dá as linhas gerais, pelos menos em primeira análise, mas particularidades há que são muito importantes. Assim, sabe-se que nos cabelos a queratina mostra uma estrutura própria: dispõe-se em zonas e, dentro destas, em camadas aparentemente um pouco diferentes umas das outras. Os diagramas não dão essas diferenças; contudo, notam-se outras diferenças apreciáveis e que dependem da espécie de que provém a queratina. CLARK e WICKOFF (cit. em HALLE 1937) verificaram a existência de períodos mais longos do que os habitualmente considerados, múltiplos 10 a 100 vezes de 3.5 \AA , e que são característicos de cada espécie. Diferenciam-se bem, por exemplo, as queratínas de homem e de porco-espinho, quanto ao tamanho e estrutura destes macroperíodos múltiplos de 3.5 \AA . Trata-se, provavelmente, de restos aminoácidos que só se repetem de longe em longe, ou

então, de arranjos diferentes e característicos. As roentgenografias das proteínas ganham, assim, um novo papel analítico (já me referi também às análises de vírus feita por meio dos roentgenogramas).

*

* *

Esta menção, na verdade um tanto longa, dos dados novos relativos às proteínas, teve por fim o exame das bases sobre que poderá assentar o estudo das melaninas. Os resultados adquiridos são importantes: Assim, sabe-se que a substância em que estão incluídos os grânulos ou outros depósitos de melaninas é uma proteína fibrosa complexa e de estrutura interessante. Nas análises desta proteína não se revelou a existência de fenilalanina. Por outro lado, está demonstrado que há várias espécies de queratinas com diferenças relativamente pequenas, mas nítidas. Outra conclusão, de importância geral, é a que se refere à unidade do plano de estrutura de todas as proteínas. Sabe-se, também, que a solubilidade indica alguma coisa sobre a composição da proteína.

Nota-se qual a importância que pode adquirir o estudo detalhado de casos particulares — o exemplo da queratina é elucidativo — para a interpretação da estrutura das proteínas em geral, e é fácil imaginar-se a importância que o estudo das proteínas tem para toda a Biologia, ligados como andam estes problemas aos próprios fundamentos da vida.

Composição das melaninas

Material e métodos. — Foram estudados os pigmentos melânicos em pêlos e em cabelos, respectivamente no coelho e no homem.

Nos coelhos, foram estudadas as melaninas existentes nos pêlos do dorso de animais cujo genotipo, quanto à cor, era conhecido; as peles foram amavelmente cedidas pelo Prof. H. NACHTSHEIM⁽¹⁾,

(¹) Exceptuando o coelho azulado, que foi obsequiosamente oferecido pelo Prof. E. Tamagnini (Coimbra).

de Berlim. Há, portanto, segurança quanto à raça a que pertencem os coelhos.

Os cabelos de homem que serviram para as várias análises provinham de amostras com côres características.

As diferentes raças de coelhos analisadas são, empregando para os genes a representação alemã (NACHTSHEIM):

raça	fórmula
selvagem (wild)	A B C D G
preto (schwarz)	A B C D gg
azulado (blau)	A B C d gg
castanho (braun)	A B c D gg
cinzento (Marburger Feh)	A B c d gg
amarelo (Madagaskarfarbig)	A b C D gg
alaranjado (orange)	A b c D gg
côr de areia (sandfarbig)	A b c d gg
albino (weiss)	a (B C D G)

A descrição da distribuição da côr nos diferentes genótipos encontra-se feita no trabalho de HADJIDIMITROFF 1933, de forma que não vale a pena referir-me a ela.

Não foram ainda analisadas tôdas as raças que poderiam ter interesse: faltam, por exemplo, as raças em que entra o factor G (excepto a selvagem) e aquelas em que existem, em vez de A, factores chinchila (a_{chi}), etc., os outros termos da série albina, que aparentemente causam diferenças de ordem quantitativa (cf. trabalhos de DUNN e associados).

Segundo DANEEL, os pigmentos existentes nos coelhos, são, como já referi, de três espécies: preto, castanho e amarelo. O pigmento amarelo existiria em todos os coelhos com G e b desde que estivesse presente também o factor A. Adiante exporei os resultados a que fui levado, um tanto diferentes destes.

*

*

*

Os cabelos de homem eram de três côres: *preto*, sem vestígio de qualquer tom; *ruivo*, isto é, *vermelho* a tender para o alaranjado; e cabelos *loiros*, de tom amarelo-claro. O número de côres analisadas é relativamente pequeno e, como se não

conhece o genotipo, é impossível qualquer suposição em relação à pureza racial dos indivíduos que forneceram os cabelos.

*

*

*

Os pêlos e cabelos foram dissolvidos em NaOH n/20 e, nalguns casos, NaOH n/10. Prèviamente eram lavados com sabão e água e, em certos casos, com éter (depois da limpeza com sabão) em aparelho de extracção Soxhlet. Em todos os casos em que não houve uma extracção das gorduras no Soxhlet, era feita uma «lavagem» com NaOH n/20 a quente, e a acção da NaOH era terminada antes que começasse a aparecer pigmento em solução. Em seguida a estas operações de limpeza, efectua-va-se a dissolução em balões bem fechados. Era expulso o ar do solvente levando-o quási à fervura. No espaço entre a rôlha e o cimo do líquido ficava uma camada de parafina líquida, a fim de impedir o contacto com o ar. Estas precauções são justificadas, como adiante se verá.

Dissolvem-se mais rápidamente os pêlos e cabelos quando se ferve. Em certos casos usei êste processo para provocar uma dissolução com alteração dos pigmentos; nos restantes casos os balões foram colocados em um termostato de 37° C ou ficavam à temperatura ambiente. Em tôdas as experiências de separação cromatográfica a dissolução deu-se a temperaturas de 37° C ou menos.

As precipitações dos pigmentos, quando usei o processo de precipitação pelo HCl, foram feitas com HCl aproximadamente 2n.

*

*

*

Separação da queratina e melaninas. — A separação da queratina (ou seus produtos de decomposição) e melaninas, bem como das espécies de melaninas, foi feita pelo método da adsorção cromatográfica de TSWETT. Como adsorventes empreguei colunas de alumina MERCK «Aluminiumoxyd standard. nach Brockmann» e CaCO₃ «prec. leve», também MERCK, além de outros carbonatos conseguidos a partir de mármore triturado e depois crivado pelos crivos 100 e 120 e carbonato obtido de cal viva

MERCK «e. marmore» (1). Serviu sempre como dissolvente NaOH de determinadas concentrações. Para o caso do CaCO_3 serviu de eluente HCl cêrca de 2n.

A adsorção foi feita em colunas de vários tamanhos, de preferência de pequeno diâmetro (2-2,5 cm.) e suficiente altura (15-10 cm.), empregando, ou não, pressões reduzidas. Nos casos em que era requerida a pressão reduzida foi usada uma bomba eléctrica de óleo, que dá um vazio bastante alto. Duração das cromatografias: variável conforme as condições e a quantidade do líquido.

Os produtos resultantes da precipitação ou da elução, eram retomados com água destilada, centrifugando várias vezes e lavando para eliminar o excesso de HCl e o NaCl. Outras particularidades inerentes à técnica da adsorção cromatográfica foram seguidas como está exposto em ZECHMEISTER e CHOLNOKY 1937.

Resultados obtidos

Dissolução das melaninas. — Desde que a quantidade de soda seja suficiente, os cabelos e pêlos dissolvem-se completamente. Fervendo, por exemplo, uma pequena quantidade de pêlos de coelho preto ou selvagem com muita NaOH n/10 ou n/20, passados 15 a 20 minutos não resta aparentemente nada por dissolver. Se se continuar muito a fervura, ou se a quantidade de pêlos for muito grande, já aparecem restos insolúveis.

Quando se procede à dissolução, nota-se que a solução se começa a mostrar corada antes de se quebrarem os pêlos, quando apenas se observa neles um inchaço. Depois de uma dissolução prolongada, observa-se, por vezes, que aparecem pêlos incolores, inchados, que perderam o seu pigmento. Conclui-se daqui que é provável que os pigmentos sejam mais facilmente solúveis que a queratina. A dissolução desta última consiste numa decomposição (principalmente hidrólise) provocada pela soda cáustica.

O aspecto final das soluções depende, no caso do coelho, do

(1) Foram ainda experimentados outros adsorventes, como gesso e gele de sílica, mas sem resultado. Outros meios, corados, como as «Fullererden», estão naturalmente contra-indicados.

genotipo de que se trata, emquanto que as soluções de cabelos humanos (das três côres: preto, vermelho e amarelo) apresentavam tôdas uma côr semelhante, diferindo apenas na intensidade ou tom. A objectivação destas diferenças só se pode fazer por métodos apropriados, espectrofotométricos, que serão possivelmente abordados noutra trabalho.

Observei também que as raças de coelhos de côr clara, amarelada, têm pigmento mais solúvel do que as de côr escura, correspondendo às diferenças de solubilidade expressas em NEUMANN 1937, a que já fiz referência. Estas diferenças de solubilidade não implicam, porém, a existência de dois pigmentos diferentes, pois podem igualmente explicar-se supondo que o estado de agregação, o tamanho e arranjo dos grânulos pigmentares, é diferente.

O que não se pode verificar é a existência de feo- e eumelaninas, estas últimas insolúveis no álcalis. São tôdas solúveis desde que o tempo e a quantidade de dissolvente, bem como a concentração dêste, estejam entre certos limites.

Sobre a acção da soda cáustica, deve supor-se que as melaninas são, pelo menos em parte, atacadas, sendo a queratina completa ou parcialmente decomposta em aminoácidos e provavelmente outros compostos mais elevados.

Sabe-se das experiências de EINSELE 1937 que os grânulos de melanina adsorvem os produtos de decomposição da queratina pelo HCl 6n. A quantidade de derivados da decomposição da queratina, que são adsorvidos, vai até 7% do pêsô de melanina nos genotipos mais escuros. Certamente, EINSELE não teria conseguido pelo seu processo separar completamente as melaninas da queratina. Há ainda a contar com os produtos de decomposição das melaninas, decomposição que parece será inevitável quando se usa HCl 6n e se ferve. O processo seguido por EINSELE é demasiado brusco para o tratamento dêstes compostos. Pelo contrário, o tratamento usado neste trabalho é menos brusco e, como mostrarei adiante, pelo menos uma grande parte dos pigmentos parece ficar inalterada.

As soluções só de queratina (ou dos seus produtos de decomposição — hidrólise) apresentam luz de Tyndall muito forte. As soluções dos cabelos e pêlos corados, com queratina e melaninas, também apresentam luz de Tyndall muito intensa, e igualmente as soluções de melanina «purificada» pelo pro-

cesso de EINSELE ou as separadas cromatograficamente. Ao ultramicroscópio veem-se numerosos corpúsculos com movimento browniano, o que denota a existência de corpúsculos relativamente grandes.

Quando se precipitam os pigmentos com HCl 2n a partir das soluções em NaOH n/20, fica sempre, mesmo depois de uma centrifugação prolongada, um líquido amarelado. Esta cor é devida, segundo a opinião de vários autores, a «melanoides» formados pela acção dos reagentes (NaOH e HCl) sobre a queratina. Dissolvendo uma certa quantidade de pêlos de coelho albino (depois de cuidadosamente limpos, como ficou exposto atrás) em NaOH n/10 e em NaOH n/20, as soluções ficam incolores, mesmo depois de tratadas, da mesma forma que as de melanina, com HCl 2n. A conclusão a tirar é, portanto, que o amarelado do líquido centrifugado é devido ou a produtos de decomposição dos pigmentos, ou a partículas destes que ficaram ainda em solução e mais ou menos alteradas, ou inalteradas. Há probabilidade que se passem conjuntamente os dois fenómenos.

Outra observação que efectuei nas soluções dos pigmentos (pigmentos mais queratina) é a da sua fácil oxidação com H_2O_2 . A solução fica finalmente incolor ou quasi incolor, depois de 12 a 24 ou mais horas, conforme as quantidades empregadas.

Em conclusão, pode dizer-se que o método de precipitação pelo HCl é muito incompleto e, embora seja melhor que o processo de hidrólise pelos ácidos fortes e concentrados, usado por exemplo por EINSELE, conduz apenas a resultados quantitativamente pouco seguros. Não se sabe se por este processo da precipitação se poderão obter provas da existência de uma só ou de várias melaninas; permite, no entanto, a efectuação de algumas observações que passo a expor.

Melaninas obtidas por precipitação. — A partir das respectivas soluções em NaOH n/20, foram precipitadas as melaninas dos cabelos de homem das três cores já descritas. Obtive precipitados de cor semelhante à do cabelo de que tinha partido. O precipitado obtido do cabelo preto tinha cor castanha-escura, não era completamente preto, enquanto que o do cabelo vermelho era castanho-claro com um tom vermelho evidente. Do cabelo amarelo provinha um precipitado acastanhado, mais claro que o dos outros dois.

Considerações de várias espécies, levam a concluir que a queratina tem um papel importante no grau de agregação das melaninas (v. adiante o resultado das cromatografias) e, como se sabe, dá-se uma adsorção da queratina, ou melhor, dos seus produtos de decomposição. De forma que a cor diferente dos precipitados pode simplesmente ser devida ao tamanho dos grânulos e à maneira como estes estão ligados ⁽¹⁾ aos produtos de hidrólise da queratina, o que dependeria das concentrações relativas dos pigmentos e queratina, diferentes para cada caso.

Os precipitados foram de novo dissolvidos em NaOH n/20 e estas soluções serviram para a determinação no ultra-violeta e visível, utilizando um espectrofotômetro Hilger com um fotômetro Spekker para o ultra-violeta. O estudo das curvas, obtidas pelo processo da determinação dos pontos de igual escurecimento de chapas fotográficas, revelou uniformidade ou quase uniformidade na forma das curvas. Só em outros trabalhos se poderão considerar em detalhe estas curvas, ao mesmo tempo que o tratamento de outros dados.

Separação das melaninas

I. A teoria da adsorção cromatográfica e o caso presente. — Vista a impossibilidade de separar as melaninas, ou a melanina, dos produtos de hidrólise da queratina, pelos métodos empregados, tentei um outro ainda não aplicado a estes compostos e que é usado com bons resultados em outros grupos de corantes naturais; este método é o da adsorção cromatográfica de TSWETT.

O método da separação cromatográfica foi empregado pela primeira vez em 1906 pelo botânico russo TSWETT; ficou esquecido até 1931, data em que recomeçou a ser usado (v. ZECHMEISTER e CHOLNOKY 1937). Depois de 1931 o método tem sido cada vez mais usado e alargado, sobretudo pela introdução da observação em luz ultravioleta (as chamadas ultracromatografias), cromatograma líquido, etc.

As bases teóricas da adsorção cromatográfica são ainda mal conhecidas, devido às dificuldades inerentes à investigação dos

(1) Sem significado preciso; talvez por adsorção?

fenómenos respeitantes às superfícies, a maior parte de difícil explicação. Todo o processo cromatográfico se funda na possibilidade da existência de afinidades diferentes dos vários corpos existentes numa solução para um mesmo adsorvente, como já sabia TSWETT. A adsorção depende do adsorvente, do dissolvente ou dissolventes empregados e suas concentrações, além da natureza do adsorvente e do adsorvido. A temperatura tem pouca influência (v. LOTTERMOSER e EDELMANN 1938: no caso analisado de aminas e aminoácidos, as temperaturas baixas favoreciam a adsorção).

Para um mesmo adsorvente e iguais condições de adsorção, a constituição do adsorvido é que em grande parte condiciona o lugar que irá ocupar a substância na coluna. É desempenhado um papel preponderante pelas duplas ligações e pelo número de anéis ou cadeias fechadas: a adsorção é tanto mais forte quanto maior é o número de duplas ligações, quando as outras condições são mais ou menos constantes; a mesma acção tem o número de anéis, embora as duas acções sejam independentes. A existência de hidroxilos, carboxilos e outros radicais, desempenha também um papel importante. Para um mesmo tipo de constituição, a afinidade entre adsorvente e adsorvido cresce também com o tamanho da molécula deste.

No conjunto, pode dizer-se que os mais variados elementos influem na adsorção, podendo esta ser tão selectiva que se separam estereoisómeros (WINTERSTEIN e STEIN, WINTERSTEIN — *cits.* em ZECHMEISTER e CHOLNOKY 1937). Para um determinado grupo de compostos ainda não investigados, tem que se proceder experimentalmente quando se pretenda saber se a separação dos elementos de uma mistura é possível cromatograficamente, pois não há nenhuma regra geral que seja válida para todos os grupos.

As proteínas têm sido muito pouco separadas cromatograficamente, possivelmente em grande parte porque as adsorções têm que se fazer em meio aquoso, o que constitui quasi sempre uma circunstância desfavorável. Recentemente, LOTTERMOSER e EDELMANN 1938 procuraram investigar a adsorção de aminas alifáticas e produtos de desintegração das proteínas — uma série de aminoácidos de varias constituições, além de amoníaco e sais de amónio. Como adsorvente para todos os compostos, foi empregado principalmente Al_2O_3 , e os autores procuraram apenas traçar as isotérmicas da adsorção para os compostos estu-

dados, agitando a solução com o adsorvente. A maior parte dos aminoácidos são adsorvidos pela alumina. Nos ácidos aminomonocarboxílicos a adsorção diminui quando aumenta a molécula, as ramificações da cadeia e a estereoisomeria não têm influência aparente. Os vários ácidos aminodicarboxílicos são também adsorvidos, excepto o dicloreto de lisina, a tirosina e o seu derivado diiodado 3,5 diiodotirosina.

A maior parte dos aminoácidos são, portanto, adsorvidos pelos óxidos de alumínio, mas, como frisam LOTTERMOSER e EDELMANN, a partir destas observações nada se pode dizer sobre o comportamento dos aminoácidos em coluna, de forma que a cromatografia dos produtos de hidrólise das proteínas ainda não tem as suas bases estabelecidas.

Com as proteínas sucede a mesma coisa: poucas ainda estão investigadas e não se possuem bases que permitam qualquer teoria sobre o seu comportamento em coluna. Entre as mais estudadas contam-se as enzimas, muitas das quais são substâncias albuminoides ou a elas ligadas, cuja presença se reconhece pela acção catalisadora sobre sistemas apropriados. As investigações de WILLSTAETER e outros, fundam-se principalmente na adsorção cromatográfica, e em certos casos tem-se conseguido isolar as enzimas do meio em que estão e separá-las umas das outras. O adsorvente para estas separações tem sido principalmente Al_2O_3 .

A partir do que se sabe sobre a solubilidade, bem como das restantes observações a seguir relatadas, parece poder-se concluir que as melaninas são proteínas mais ou menos afins da queratina. Prèviamente, nada se podia dizer sobre uma possível separação cromatográfica dos pigmentos e queratina, que até agora não tinha sido conseguida. Pode-se concluir das experiências da precipitação das soluções em $NaOH$ $n/20$, com HCl $2n$, que há probabilidade de uma grande parte das melaninas ficarem aproximadamente no estado nativo, isto é, há probabilidade de se conseguir um produto igual ou muito semelhante aos pigmentos existentes antes da dissolução. Convém, no entanto, que o número de tratamentos antes da cromatografia seja no menor número possível, a fim de se evitar o fenómeno, tão freqüente nas proteínas, da desnaturação.

Como se verá no relato das várias cromatografias, em qual-

quer dos dissolventes empregados obtém-se logo à superfície, progredindo depois na seqüência da cromatografia, uma zona escura, de côr diferente conforme a raça (cf. resultados obtidos), e por elução desta zona obtém-se um preparado que deve ser muito semelhante à melanina natural de que se partiu. Além desta zona superior, existem, conforme a raça (isto é, conforme a côr dos pêlos) uma zona muito extensa e difusa e ainda, em alguns casos, zonas que se destacam e vão no líquido que passa a coluna quando da revelação. Estas zonas móveis e difusas devem ser formadas por vários produtos de desintegração das melaninas, obtidos pelo tratamento, mais ou menos hidrolisante, da dissolução. Que não se trata para êstes produtos côrados de derivados da hidrólise da queratina, é demonstrado pelas cromatografias da queratina. Uma discussão mais completa será efectuada após o relato das cromatografias.

II. Cromatografias. — Pigmentos existentes nos pêlos de coelhos de várias raças. — 1. *Coelho albino.* — Solução de pêlos de coelho albino (queratina pura ou quási pura) foram cromatografados sôbre Al_2O_3 Merck stand. n. Brockmann e sôbre $CaCO_3$ Merck prec. lev. Só a cromatografia sôbre $CaCO_3$ é que será relatada mais minuciosamente, visto que só com êste adsorvente é que se podem fazer as adsorções dos pigmentos de forma que seja possível a elução.

As soluções de queratina (produtos da sua hidrólise) mostram à luz ultravioleta uma fluorescência azul que se observa também facilmente na pele ou nas unhas. A adsorção estuda-se, portanto, iluminando com uma lâmpada usual de ultra-violeta.

Solução: Queratina (de coelho albino) em $NaOH$ n/20 à temperatura do laboratório, em dissolução aproximadamente durante um mês, tendo havido os cuidados anteriormente descritos. *Adsorvente:* $CaCO_3$ Merck prec. lev. tratado com $NaOH$. Foi usada uma coluna estreita, de cêrca de 2 cm. de diâmetro. *Revelação* também com $NaOH$.

Logo desde o início da adsorção passa líquido com fluorescência azul. Na região superior da coluna vai ficando uma zona, de fluorescência azul intensa, que aumenta até ficar relativamente extensa. Quando da revelação, destaca-se, logo na parte superior, uma zona ou anel característico de fluorescência azul intensa, que vai progredindo até passar para o líquido

inferior. A zona superior esbate-se cada vez mais, até a fluorescência desaparecer.

A zona ou anel «móvel», que se destaca quando da revelação, é característica das cromatografias de tôdas as soluções em que entra a queratina.

Não há coloração no visível, em qualquer parte da coluna, ou do líquido que passa.

A prova da existência de derivados proteínicos na coluna, foi feita eluindo várias regiões com HCl 2n e efectuando as reacções das proteínas descritas na discussão das cromatografias. Verifiquei que quanto maior era a quantidade de NaOH empregada para a revelação, menor ia sendo a quantidade de desintegrados queratínicos que ficava na coluna (a julgar pela intensidade das reacções), até que finalmente pelos processos usados se não demonstravam mais. No líquido que passa a coluna, as reacções das proteínas são positivas e muito intensas.

*

* *

1. *Melanina escura* — Os pêlos do dorso de coelho preto foram dissolvidos em NaOH n/20 durante aproximadamente 3 semanas, com os cuidados descritos quando expuz a técnica seguida. A solução que se obtém tem uma cor castanha de tom intenso. As cromatografias foram feitas como para a queratina, primeiro sobre alumina e depois sobre CaCO₃ Merck prec. lev.

Cromatografia com alumina: Adsorvente Al₂O₃ stand. n. Brock., tratada com NaOH. Revelação como para a cromatografia da queratina.

O resultado antes da revelação é conseguir-se uma zona logo desde o limite superior da coluna, de cor castanha-escura, e abaixo desta zona fica uma outra de cor também castanha, mas muito pouco intensa e difusa, e que rapidamente ocupa todo o resto da coluna, passando em seguida ao filtrado. A revelação não altera o aspecto da coluna.

A elução com vários meios não se pô le fazer: nem NaOH, nem outros reagentes e misturas, conseguiram retirar ao adsorvente uma porção das melaninas que corasse o líquido. Por esta razão, a alumina foi posta de parte para as outras cromatografias, no que respeita à elução.

Cromatografia com CaCO_3 : A coluna foi preparada como está descrito para o caso da queratina. O resto da técnica é exactamente o mesmo. Os resultados antes e depois da revelação são muito semelhantes; apenas, quando se revela a zona superior torna-se mais nítida, e a zona difusa passa em parte ao filtrado. O aspecto final, depois da revelação, está representado na figura 11. Obtém-se: Uma zona superior (zona 1) castanha-escura, que se estende desde o limite superior da coluna; logo em seguida ou quasi (leve separação? — difícil de precisar em virtude do tom difuso da zona inferior) está uma zona inferior muito extensa (zona 2), difusa e de côr acastanhada, que se estende finalmente quasi até ao extremo inferior da coluna. O tom desta zona difusa é pouco intenso.

No início da revelação destaca-se uma zona «móvel» queratinica, só visível ao ultra-violeta.

Elução com HCl, da forma descrita. Obtém-se preparados que serão mais demoradamente descritos adiante, na discussão das cromatografias.

Tal como o coelho preto, comportam-se igualmente as soluções dos pêlos do dorso de coelho *selvagem*, *azulado*, *cinzento* (*Marburger Feh*) e *castanho*. Para todos êles o aspecto das cromatografias era o mesmo. As eluções também forneceram para todos preparados aparentemente iguais.

As cromatografias foram repetidas com soluções de diferentes concentrações e levaram sempre aos mesmos resultados.

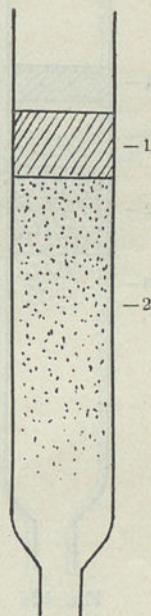


FIG 11

Cromatograma da melanina «escura» de coelho: 1—zona superior, castanha escura; 2—zona difusa, levemente castanha.

*

* *

3. *Melanina clara*—Pêlos do dorso de coelho côr de areia (sandfarbig) foram dissolvidos em NaOH n/20, como para o coelho preto. A solução ficou com uma côr diferente da dos

coelhos escuros (grupo anterior). A diferença na cor não é devida a concentração diferente: diluindo a solução mais escura, a diferença mantém-se, isto é, é uma diferença de cor e não de tom (intensidade).

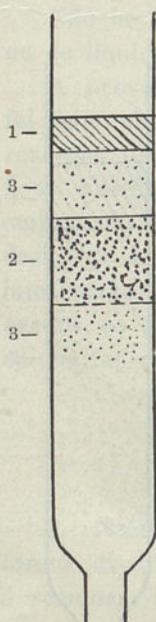


FIG. 12

Cromatograma da melanina « clara » de coelho: 1-zona superior, castanha-amarelada; 2-zona móvel, mais clara que a zona 1; 3-zona difusa, de tom levíssimo (talvez não existente).

Cromatografia com alumina: O resultado foi muito semelhante ao da melanina escura. Separou-se uma zona superior e uma zona contígua, difusa e mais clara que a superior. A zona superior tinha um tom mais claro do que a correspondente zona da melanina escura. Parecia que haveria uma zona muito pequena e levemente diferente do resto, situada na parte inferior da zona superior.

Esta cromatografia não levou a resultados seguros.

Cromatografia com CaCO_3 : Foi executada como para a melanina escura. Antes da revelação aparece uma zona desde o início da coluna, relativamente pouco intensa no tom, menos intensa, ainda, na parte inferior. Quando se revela, separa-se nitidamente uma zona inferior, de maneira que resulta o aspecto representado na figura 12: uma zona superior (zona 1), desde o limite superior da coluna, pouco extensa, de cor castanha-amarelada (menos escura que a zona superior da melanina escura, e outra cor); e uma zona inferior (zona 2), que vai progredindo à medida que se revela, até ficar difusa na coluna e passar finalmente ao filtrado.

Como o coelho cor de areia, comportam-se exactamente as soluções dos pêlos do dorso dos coelhos *alaranjado e amarelo*. Constituem, portanto, um segundo grupo de cromatografias, diferente do primeiro e iguais entre si. As várias concentrações forneceram o mesmo resultado.

Como para a melanina escura, separa-se, logo no início da revelação, uma zona ou anel de fluorescência azul, característica da queratina e só visível à luz ultra-violeta.

Há ainda a notar que é possível que exista um levíssimo acastanhado na coluna, abaixo e acima da zona «móvel». Na figura 12 este tom problemático está representado por um leve pontuado (zona 3). É provável, porém, que tal tom seja apenas ilusório.

Pigmentos existentes nos cabelos de homem. — 1. *Cabelos ruivos.* — Cabelos vermelhos foram tratados como os pêlos de coelho, dissolvendo-os em NaOH n/20. Com alumina obtém-se uma coluna que finalmente mostra a seguinte composição: uma zona superior (talvez um pouco mais intensamente corada na sua parte superior) de côr castanha avermelhada; passa para o filtrado um líquido amarelado.

Cromatografia com CaCO₃: Antes da revelação há uma zona desde a parte superior da coluna, muito extensa. Na parte superior desta zona distingue-se com dificuldade um tom mais intenso. O resto da coluna era incolor ou muito levemente amarelada (da solução que estava passando?). Quási desde o início do cromatografia, portanto antes da revelação, passava um líquido amarelado.

Quando se revela, a grande zona existente divide-se em duas: uma superior (zona 1) de côr acastanhada-avermelhada, que fica; e uma zona móvel (zona 2) de côr intensamente amarelada, que se destaca e vai progredindo até passar ao filtrado. Resta, entre a zona superior e a zona móvel, uma porção difusa (zona 3) de tom amarelado-acastanhado muito pouco intenso. O aspecto final obtido é o da figura 13. É possível que à superfície da zona superior, no limite da coluna, haja uma zona muito estreita de côr castanha mais escura. Caraterístico desta cromatografia é, porém, a zona «móvel» com o tom intensamente amarelo, de limites nítidos, e a passagem de líquido corado quási desde o início da cromatografia.

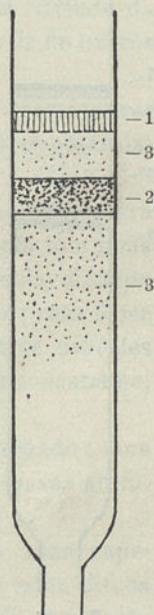


FIG. 13

Cromatograma da solução de cabelo ruivo, de homem: 1 - zona superior, castanha-avermelhada; 2 - zona móvel, amarela intensa; 3 - zona difusa, levemente acastanhada.

Soluções diluídas e concentradas forneceram o mesmo resultado. Uma solução em NaOH n/10 deu também o mesmo aspecto (apenas, a zona superior — zona 1 — apareceu com um limite inferior menos nítido depois da revelação, e parece que aumentou o tom difuso — zona 2).

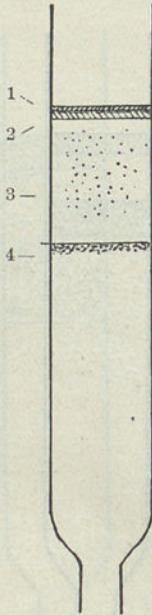


Fig. 14

Cromatograma da solução de cabelo loiro, de homem: 1 — zona superior, de cor castanha-escura; 2 — zona amarelada; 3 — zona difusa, de leve cor amarela-clara; 4 — zona móvel, queratínica com, conjuntamente, levíssimo tom amarelado.

de pigmento (zona 4), pois que há nesta zona um tom muito leve amarelo claro. Entre a zona 2 e a móvel (zona 4), vai ficando uma leve zona difusa (zona 3).

2. *Cabelo loiro.* — A dissolução foi feita, como habitualmente, em NaOH n/20; a solução ficou com um tom amarelado claro. Em coluna de *alumina* dá apenas uma zona superior castanha e passa um líquido amarelo palha; quando se revela, o aspecto fica sensivelmente o mesmo.

Cromatografia com CaCO₃: Cromatografia executada como está descrito anteriormente e observada ao ultra-violeta. A solução estava tão pouco concentrada que todas as zonas ficaram com pequena intensidade.

Antes de revelar vêm-se parte na superior da coluna duas zonas pouco extensas: uma no limite superior da coluna, (zona 1), de cor castanha-escura; outra logo em seguida, de cor amarelada (zona 2). Era abaixo desta zona que se notava a zona queratínica de fluorescência azul.

Quando se procede à revelação resulta o aspecto representado na figura 14: Superiormente ficam as duas zonas já descritas, contíguas ou com pequeníssima solução de continuidade; em seguida às duas zonas destaca-se um anel ou zona queratínica móvel, de fluorescência azul, e conjuntamente com o anel queratínico vai uma pequeníssima quantidade

Os resultados para o cabelo loiro não são, de forma alguma, definitivos. A distinção entre as zonas era difícil, dada a sua pequena extensão e intensidade de coloração. A zona difusa e a zona móvel eram tão debilmente coradas que resultava incerteza desde que se não observasse cuidadosamente. Foi repetida várias vezes a cromatografia sem melhores resultados, em virtude da diluição dos pigmentos na solução. É necessário partir de outras soluções para se conseguirem melhores resultados.

Contudo, verifica-se que há distinção entre esta cromatografia e a dos cabelos ruivos. A característica zona móvel amarela-intensa não aparece aqui.

3. *Cabelo preto*. — A cor da solução de cabelos pretos era sensivelmente a mesma da dos cabelos ruivos, com um tom mais intenso (mais escura). A cor também não diferia apreciavelmente da solução dos cabelos loiros, embora a solução do preto fosse muito mais intensamente corada que aquela. As três espécies de soluções tinham todas cor castanha-amarelada ou castanha, conforme a intensidade.

A *cromatografia em alumina* deu o resultado costumado: uma zona superior castanha e uma difusa, inferior, e que passa ao filtrado.

Na *cromatografia com CaCO₃* depositou-se uma zona superior (zona 1) um tanto extensa, e em seguida uma zona difusa (zona 2) também muito extensa. Depois da revelação o aspecto não se alterou sensivelmente. Pode-se representar o resultado pela mesma figura que serviu para o caso da melanina escura — figura 11. Aparentemente, as duas cromatografias são idênticas.

*

* *

III. Significado das cromatografias. — Como se deduz facilmente das considerações teóricas sobre a cromatografia, não é possível a partir da não-separação de dois ou mais compostos concluir a sua identidade, isto é, a unidade da mistura.

Pelo contrário, desde que duas misturas mostram cromatografias diferentes, quando as condições de experimentação são as mesmas ou aproximadas, as duas misturas têm componentes diferentes — há diferença pelo menos num componente. A par-

tir das cromatografias que efectuei é possível, portanto, concluir que há mais de um pigmento, tanto no homem como no coelho. *Há mais que uma melanina, as diferenças entre as melaninas contidas em pêlos e cabelos de côres diferentes são quantitativas e qualitativas.* Esta conclusão parece-me importante, pois resolve a velha questão da existência de um só ou de vários pigmentos. Não se podem explicar tôdas as diferenças entre as várias cromatografias supondo que as melaninas diforem apenas quantitativamente.

Nas raças de coelho que foram analisadas aparecem sòmente duas espécies de cromatografias, uma para o grupo «escuro», outra para o «claro». Convém saber, contudo, se, existindo as duas espécies diferentes de melaninas (correspondentes às duas espécies de cromatografias) numa mesma raça, se poderiam demonstrar cromatograficamente. Com êste fim, efectuei cromatografias de misturas de soluções de pigmentos escuros e de pigmentos claros.

Cromatografia da mistura de pêlos de coelho preto e de coelho côr de areia. — Quando se misturam as duas soluções, resulta uma côr idêntica à da solução escura; uma pequena porção de solução de raça escura é suficiente para esconder a côr própria das raças claras. Também é de esperar que nas cromatografias a distinção seja difficil, em virtude de a solução das raças escuras dar zonas que ocupam quási tôda a coluna e que são muito mais intensas e mais escuras que as correspondentes dos pigmentos claros.

A cromatografia foi feita com CaCO_3 da maneira habitual. Já antes da revelação se notava, mas com certa difficuldade, a existência, na parte superior da coluna, de duas zonas levemente distintas. Destas duas zonas, a inferior (zona 2) era mais clara e de côr um pouco diferente. A seguir vinha uma zona difusa igual na aparência à correspondente para a melanina escura (zona 3). Depois da revelação acentua-se a separação das duas zonas superiores, que, no entanto, ficam separadas apenas por uma zona levemente mais clara e muito pequena. O aspecto que se observa à luz ultravioleta está representado na figura 15. Quando da revelação, separou-se a zona móvel característica da queratina, representada também na figura (zona 4); parecia que esta zona tinha uma leve côr amarelada que se vai esbatendo com a pro-

gressão da revelação. Esta última particularidade é, porém, incerta.

Na figura estão representadas: uma zona superior mais escura (zona 1); uma zona mais clara a seguir a esta (zona 2), com uma separação; depois um pontuado correspondente à zona difusa (zona 3); e na parte média da zona difusa, a zona móvel queratínica (zona 4), com a possível cor amarelada.

Compreende-se que a 2.^a zona a contar de cima (zona 2), existindo num fundo relativamente escuro como é a zona difusa da melanina escura, não se veja bem. A observação em luz ultravioleta intensa favorece a distinção. No entanto, necessitam-se mais observações para um completo esclarecimento desta questão.

A verificarem-se em várias misturas e em várias condições as diferenças que assinalai, é possível distinguir-se numa solução a existência da melanina clara, mesmo em presença da escura. Tudo parece passar-se como se a adsorção ao nível da zona difusa não impedisse uma ulterior adsorção da melanina clara.

Uma mistura das soluções de pêlos de coelho castanho e de coelho amarelo (Madagaskarfarbig) cromatografada sobre CaCO_3 , deu resultados semelhantes aos acima descritos. A zona queratínica não apresentava cor visível. Na região superior da coluna notava-se uma diferença entre a parte superior e a inferior, correspondendo a duas zonas, como na mistura de preto e cor do areia. As duas zonas eram contíguas.

Segundo os resultados das cromatografias, conclui-se que nos pêlos do dorso dos coelhos analisados existem duas melaninas, uma melanina clara nas raças claras e uma melanina escura nas

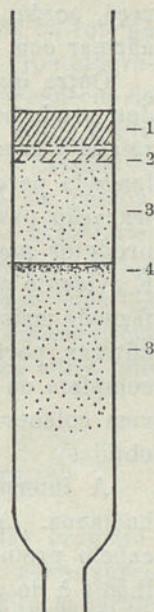


Fig. 15

Cromatograma da mistura das soluções de melanina «escura» e melanina «clara» de coelho: 1-zona superior, castanha escura; 2-zona mais clara e de cor um pouco diferente da zona 1; 3-zona difusa, acastanhada; 4-zona móvel queratínica (com leve tom amarelado?).

raças escuras⁽¹⁾. As observações até agora efectuadas não são a favor da existência de mais de uma espécie de melanina em cada raça, porém, são necessárias mais cromatografias para se poder afirmar com segurança esta proposição.

Outra questão importante é a da separação das melaninas e dos produtos de hidrólise da queratina. Como expuz quando relatei a cromatografia da queratina, depois duma revelação prolongada parece que todos ou quasi todos os produtos de desintegração passaram ao filtrado. De resto, a maior parte desses produtos passam a coluna logo desde o início da cromatografia. É evidente que se pode conseguir uma separação mais completa fazendo mais uma cromatografia das melaninas isoladas. Pode-se afirmar, portanto, que se consegue por este método a separação completa ou quasi, da queratina e melanina. O que digo adiante vem colaborar nesta conclusão (cf. a solubilidade das melaninas obtidas).

A interpretação é muito mais difficil no caso dos cabelos humanos. A julgar pelo seu comportamento na adsorção, o cabelo preto tem uma só espécie de melanina, idéntica ou semelhante à do grupo escuro dos coelhos.

O cabelo loiro analisado parece ter duas melaninas: uma escura, em pequena quantidade e correspondente talvez à melanina do cabelo preto; uma outra, melanina clara correspondente à melanina clara dos coelhos (ou diferente dela?). A melanina do cabelo preto é que mostra mais semelhanças com as do coelho, na verdade com a melanina escura do coelho. São necessárias outras cromatografias de cabelos castanhos com vários tons, para um melhor esclarecimento destas questões. Convém também analisar cabelos loiros com diferentes tons e que permitam a obtenção de soluções mais intensamente coradas.

Finalmente, os cabelos ruivos de homem mostraram um resultado diferente do que se poderia esperar. A cor alaranjada dos cabelos ruivos, (ou melhor, vermelhos ou alaranjados) podia ser causada por uma mistura nas proporções convenientes do pigmento escuro com o pigmento claro. A conclusão que permitem as cromatografias efectuadas é, porém, diferente — deve

(1) Cf. as descrições das cromatografias para o significado de «raças claras» e «raças escuras».

existir nos cabelos ruivos analisados uma melanina «alaranjada», ou «avermelhada».

Verificando-se em ultteriores estudos que cabelos ruivos de vários tons mostram as mesmas características nas cromatografias, concluir-se á que no homem existe mais uma espécie de pigmento que no coelho. Esta conclusão aparece como muito provável a partir das minhas actuais observações e estaria de acôrdo com várias particularidades que mostram os ruivos, como por exemplo a existência de sardas e outras características da pele. É evidente que no homem as análises feitas pelo método usado neste trabalho serão muito mais incertas que nos coelhos, em vista da impossibilidade de se conseguirem raças puras. Muitas mais observações são precisas antes que se esclareçam várias questões.

Algumas características das melaninas puras

1 — A zona superior. — Das fracções separadas cromatograficamente, apenas a zona superior — zona 1 — (ou zonas superiores — caso do cabelo loiro), que começa no limite superior da coluna, deve corresponder às melaninas no estado nativo ou aproximadamente no estado nativo. Pelo contrário, as fracções com menor afinidade para o adsorvente devem ser produtos de desintegração das melaninas, talvez em ligação, de qualquer maneira, com derivados da hidrólise da queratina. O aquecimento das soluções e possivelmente a exposição ao ar (oxidação), devem transformar as melaninas em compostos mais simples e de côr mais clara. Que assim é, de facto, demonstram-no as experiências de oxidação dos pêlos e cabelos, bem como das soluções de melaninas, que dão produtos finais incolores.

Executei algumas cromatografias com o fim de esclarecer este ponto. Assim, depois de ferver por 40 minutos uma solução de pêlos do dorso de coelho selvagem em NaOH n/20 (levada de quando em quando ao volume inicial) procedi a uma *cromatografia em coluna de alumina*. A coluna foi preparada como habitualmente. Deposita-se durante a execução da cromatografia uma zona larga castanha-escura em cima, e em todo o resto da coluna uma zona difusa de côr também levemente acastanhada, que de pressa chega à parte inferior da coluna; então começa a passar um líquido amarelado.

Quando começa a revelação, destaca se próximo da zona superior uma zona móvel (zona 2) castanha clara, e fica na parte superior da coluna uma zona (zona 1) aparentemente como a correspondente para o caso em que a solução não foi fervida, característica da melanina escura. Na figura 16 está representado o aspecto da coluna, com a zona superior castanha-escura, em seguida a zona difusa (zona 3) em tôda a coluna, e a certa altura a zona móvel castanha-clara.

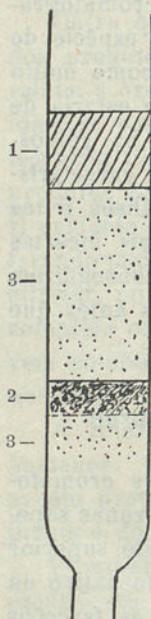


Fig. 16

Cromatograma da solução de cabelos de coelho de raça «escura», depois de fervida: 1-zona superior, castanha escura; 2-zona móvel castanha clara; 3-zona difusa. Zona 1 aparentemente igual à zona 1 da figura 11, zona 3 aparentemente igual à zona 2 da figura 11

A zona móvel (zona 2) vai progredindo até passar ao filtrado. A cor desta zona móvel era diferente da zona móvel que se obtém nas cromatografias das raças claras sobre CaCO_3 .

A mesma solução antes de fervida não mostrou nas cromatografias com alumina a zona móvel castanha, mas apenas a zona superior e a zona difusa própria da melanina escura. É lógico atribuir-se o aparecimento desta zona móvel à decomposição da melanina quando da fervura. Portanto, os produtos da decomposição têm menor afinidade para o adsorvente que a melanina nativa. É natural pensar que a zona superior representa a melanina no estado nativo ou aproximadamente.

Outras cromatografias de soluções mais fortemente decompostas (fervura com NaOH $n/10$ durante duas horas) deram ainda mais fracções em zonas móveis de tons castanhos mais claros e pouco diferentes umas das outras.

Este processo da cromatografia, associado a decomposições apropriadas, pode prestar bons serviços em relação com o esclarecimento de várias questões sobre as melaninas.

Admitindo que a interpretação que acabo de efectuar é correcta, conclui-se que os produtos de decomposição aparecem inevitavelmente, nas condições em que se realizou

a dissolução dos pigmentos. É possível que noutras condições não haja ataque aos pigmentos. O estabelecimento dessas condições e a análise das soluções obtidas, constitui um dos temas de futuras investigações.

Com respeito à zona superior das cromatografias da melanina clara e da melanina escura de coelho, apresentam-se, entre outras, as seguintes possibilidades: 1 — a zona superior compõe-se de melanina pura ou quasi pura; 2 — compõe-se de melanina de composição quasi identica à natural, mas desnaturada; 3 — compõe-se de uma das fracções ou de um conjunto de fracções em que a melanina se cinde, sendo outra ou outras das fracções constituídas pelas zonas inferiores, difusas ou móveis. A 2.^a possibilidade parece pouco provável em virtude da fácil dissolução dos produtos obtidos. A 3.^a possibilidade também não está de acôrdo com as cromatografias antes relatadas (em que se ferveram as soluções) nem com as novas precipitações efectuadas a partir das soluções do produto e as observações que vão seguir-se. Deve, portanto, prevalecer a 1.^a possibilidade.

2 — Côr dos produtos obtidos — No coelho. — Depois das cromatografias fez-se a eluição pelo processo descrito. Emprega-se uma quantidade de HCl que não fique muito em excesso em relação à quantidade de CaCO_3 , sabido como é que o HCl ataca as melaninas.

Da fracção correspondente à *zona superior da melanina escura* obtém-se um preparado insolúvel no HCl diluido e na água destilada. Retoma-se o produto em água, centrifugando. O produto obtido tem a mesma côr para todos os coelhos do grupo escuro, e depois de sêco é intensamente castanho, quasi preto. A côr é mais próxima do castanho-avermelhado que do amarelado. Quando ainda com água, mostra uma côr caracteristicamente castanha avermelhada, escura.

O produto obtido da *zona superior (zona 1) do grupo claro (melanina clara)* é também castanho, mas com côr tendendo para o amarelado e é menos escuro que o correspondente da melanina escura. Mesmo depois de sêcos os dois produtos, ainda se conhece a diferença.

A *zona inferior (zona 2), difusa, da melanina escura*, depois de eluida forneceu um preparado semelhante ao da zona supe-

rior, mas muito mais claro, embora fundamentalmente da mesma côr; aconteceu o mesmo com a *zona inferior (zona 2) da melanina clara*, em relação à respectiva zona superior (zona 1).

No homem. — Da elução da *zona superior do cabelo vermelho* obtém-se um produto de côr castanha-avermelhada bastante escura. A *zona móvel* da mesma cromatografia deu uma pequena quantidade de um produto avermelhado-alaranjado claro. Certamente esta substância estava junta a derivados queratínicos, o que lhe podia alterar a côr. Da *zona difusa* resultou um produto em pequena quantidade, semelhante ao da zona superior, mas mais claro.

As colunas de adsorção do *cabelo loiro* tinham zonas pouco extensas e pouco intensas na coloração, de forma que da elução delas provieram pequenas quantidades de substâncias em que mal se podia apreciar a côr. A *zona do limite superior* deu um produto castanho-escuro, emquanto que a *zona imediatamente a seguir* forneceu uma substância amarelada-acastanhada pouco intensamente côrada. Outras cromatografias poderão esclarecer melhor a côr dos eluatos.

Do *cabelo preto* vieram fracções semelhantes às das correspondentes zonas do cabelo ruivo, apenas, segundo parece, de côr mais intensa emquanto húmidas; depois de sêcas diferenciavam-se um pouco mais e aproximam-se das correspondentes do grupo escuro dos coelhos.

Em suma, quanto ao homem pode dizer-se que para tirar conclusões definitivas são necessárias, como já tinha exposto atrás, mais observações. Como para os coelhos, os dados da elução tornam muito provável a hipótese de se tratar para a zona superior de produtos idênticos, ou próximos, das melaninas naturais.

3 — Solubilidade e reacções. — Foram apenas investigadas a êste respeito as melaninas nos coelhos.

As melaninas puras (preparado da fracção superior das cromatografias) têm uma solubilidade diferente dos precipitados obtidos simplesmente por precipitação pelo HCl a partir das soluções totais dos pêlos. Já relatei a observação de que os pigmentos são mais solúveis que a queratina; no entanto, as melaninas obtidas por precipitação pelo HCl das soluções totais, são difficilmente solúveis, quási tão difficilmente como os pêlos.

Como se sabe, estas melaninas têm adsorvidos, ou de outra forma ligados, produtos da decomposição da queratina, ou mesmo queratina íntegra. As melaninas obtidas cromatograficamente mostram, contrariamente às impuras de precipitação, uma notável solubilidade nos alcalis. Dissolvem-se prontamente nos alcalis diluídos: desde que se juntem umas gotas de NaOH n/20 a uma pequena porção de água destilada, dissolvem-se imediatamente: Isto é válido tanto para a melanina escura como para a melanina clara, e significa que não deve ter havido desnaturação (que em regra torna as proteínas menos solúveis) além de que representa uma prova em favor da hipótese de se tratar de melaninas puras. Outra conclusão a tirar diz respeito ao efeito inibitório que parece ter a queratina, ou seus produtos de decomposição, sobre as melaninas, quando adsorvida nos grânulos destas últimas. A acção da queratina tem um significado biológico interessante e merece ser mais convenientemente esclarecida.

A forte luz de Tyndall das soluções de queratina em NaOH n/20 leva a crer que devem ainda existir na solução cadeias longas intactas ou quasi, (v. PAULI e WALKÓ 1933 — *Optische Eigenschaften der Eiweisslösungen*). Quando se evapora um pouco desta solução no vazio e depois se retoma com água destilada, obtêm-se pequenos flocos de uma substância branca, ao microscópio com um tom amarelado, e que ainda parece ter estrutura fibrosa. Ter-se-ia talvez tornado a formar uma estrutura semelhante à da queratina (para se estudar melhor esta questão são necessárias outras experiências) o que significa que nem toda a queratina ainda estava decomposta em aminoácidos. Na solução, com um forte efeito Tyndall, devem, portanto, existir pedaços da fibra queratínica capazes de evitar ou retardar a dissolução das melaninas, acção que deve ser importante para estas últimas⁽¹⁾. Compreende-se também, que é possível que a quantidade de queratina e derivados queratínicos, que estão adsorvidos ou combinados com as melaninas, pode ter uma grande influência sobre a cor dos pêlos e dos precipitados em que existem conjuntamente.

(1) Além de outras acções protectoras contra oxidações, etc.

*

* *

As melaninas puras obtidas cromatograficamente têm a reacção das proteínas descrita em FEIGL 1937. A reacção consiste no seguinte: A uma gota de solução, de preferência hidrolisada, junta-se uma gota de solução alcoólica a 0.2% de α -nitroso- β -naphthol e aquece-se num microcadinho. Enquanto quente, junta-se uma gota de HNO_3 ($D=1.4$). Havendo tirosina aparece uma cor púrpura. Como quasi tôdas as proteínas têm tirosina, a reacção pode servir para caracterizar as proteínas. A reacção tem ainda a vantagem de ser muito sensível (v. FEIGL 1937).

Tanto a queratina como as melaninas puras davam reacção positiva (sempre comparadas com um ensaio em branco).

Um outro processo de demonstrar a existencia de proteínas ou seus derivados consiste em neutralizar a solução alcalina com HCl diluído até ficar um excesso de ácido. Depois evapora-se à secura a quente num microcadinho. Havendo matéria orgânica ficam depósitos carbonáceos quando se termina o aquecimento a tempo. As soluções de queratina mostram uma propriedade interessante quando assim tratadas: se o aquecimento é conveniente, formam-se, desde que se junte uma nova pequena porção de HCl diluído, pequenos filamentos com a aparência de cabelos ou pêlos, por vezes de 0.5 cm. de comprimento, e com várias tonalidades do amarelo e castanho até ao preto, conforme a carbonisação, isto é, conforme o aquecimento.

As habituais reacções das proteínas não são em regra exequíveis, sem mais modificações, nas soluções em NaOH.

As soluções de melaninas puras obtidas nas cromatografias, precipitam de novo quando se neutraliza a solução com um excesso de HCl 2n. O precipitado é em tudo semelhante, aparentemente, à melanina pura da cromatografia. O líquido que fica não apresenta qualquer coloração ou turvação aparente. Estes factos constituem mais uma prova da pureza das melaninas obtidas na zona superior das cromatografias.

4 — Propriedades ópticas. — As melaninas iluminavam o campo quando observadas em luz polarizada ao microscópio, entre nicóis cruzados. Um pouco do preparado obtido da eluição da zona superior, tanto da cromatografia da melanina escura como da clara, quando colocado sobre uma lâmina e observado entre nicóis cruzados ainda na água com que foi retomado, à primeira vista parece amorfo. Substituindo a fonte luminosa vulgar por um arco voltaico, o campo ilumina-se em raros pontos dos grumos de cor castanha que constituem o preparado da melanina pura. A intensa coloração (absorção da luz) das melaninas torna necessário o emprêgo do arco.

Se se deixar o preparado sobre a lâmina, em câmara húmida, até ao dia seguinte, os grumos aderem mais ou menos à lâmina e na nova observação aparecem iluminados quasi todos os pontos dos grumos da melanina. Quando se deixa secar a melanina sobre a lâmina, a iluminação é então muito manifesta. É natural pensar-se que a adesão das partículas à lâmina causou uma orientação destas, donde resultou um aumento da dupla refração. Tanto a melanina clara como a escura apresentam o mesmo aspecto.

Como é sabido (v. por exemplo AMBRONN e FREY 1926) há uma «dupla refração de forma» e «uma dupla refração própria das partículas». Um dos processos para a distinção das duas propriedades é o «método da embebição», que consiste essencialmente em introduzir o corpo que se quer comprovar numa série de líquidos com índice de refração apropriado, por tempo suficiente, de forma a que os espaços interparticulares fiquem preenchidos pelo líquido.

Embebendo as melaninas sobre lâmina na série dos líquidos água-anilina descrita a pág. 154 de AMBRONN e FREY 1926 (1), a dupla refração continua a notar-se. Trata-se, portanto, de dupla refração própria; há corpúsculos alongados, provavelmente de natureza fibrosa.

Estas observações estão de acôrdo com o que se sabe da estrutura das proteínas. Pela sua solubilidade e lugar de formação no organismo, as melaninas devem ser próximamente como a queratina. Distinguem-se desta, além da cor, pela mais

(1) Não foi usado o álcool benzílico, o que não deve introduzir grande diferença.

fácil dissolução em meio alcalino e possibilidade de precipitação sem aparentemente ter havido alterações profundas na sua constituição.

As soluções de queratina, ou de queratina e melaninas conjuntamente, ou de melaninas puras — não mostram dupla refração de corrente quando observadas no aparelho de Zocher (v. ZOCHER 1921). Empregando vários dispositivos, não consegui o aparecimento da cruz de dupla refração que se observa tão facilmente, por exemplo nos soles de pentóxido de vanádio. BOEHM e SIEGNER (cit. HAUROWITZ 1936) observaram dupla refração de corrente em proteínas fibrosas tais como gelatina e fibrinogéneo, o que significaria que mesmo em solução continuavam a ter estrutura fibrosa. KUHN 1934 estuda o assunto teòricamente e conclui que, quando moléculas longas se encontram em solução, há probabilidade de estarem enoveladas irregularmente sob a forma exterior de um elipsoide. Em certos casos, os altos-polímeros teriam tais moléculas em solução. Segundo os dados de SVEDBERG existem autênticas moléculas esféricas nas soluções das proteínas. No caso das melaninas é muito provável que se trate de moléculas alongadas mesmo em solução, dado o que se sabe sobre a dupla refração dos precipitados e o parentesco com a queratina. O resultado negativo das minhas observações sobre a dupla refração de corrente, pode apenas significar que o aparelho de Zocher não é suficientemente sensível e talvez seja possível observar dupla refração com outro dispositivo.

Também é possível e talvez provável que os pedaços das partículas fibrosas alongadas, quando estão em solução, formem novamente a primitiva estrutura em contacto com o adsorvente nas colunas, dando a fracção superior, que representará, então, a melanina pura e no estado nativo.

Discussão — Conclusões

O que está exposto anteriormente é um estudo sobre a pigmentação melânica no homem e no coelho e pode considerar-se dividido em três partes.

Na primeira parte foram discutidos os processos usados para a determinação da pigmentação em casos em que a cor forma uma série, aparentemente contínua, desde os tons mais claros aos mais escuros. Tem que se recorrer a tais processos quando se estudam populações de Mamíferos, principalmente quando o objecto de estudo é o homem.

O processo dos tinto-fotómetros pode ser empregado com vantagem a todos os outros, para determinações com uma precisão suficiente para estes estudos. Os aparelhos (pelo menos o que foi detalhadamente verificado) ainda não correspondem aos requisitos impostos quando se desejam determinações seguras e em que o critério pessoal entre no menor grau possível. Algumas modificações dos filtros e dos padrões «brancos» fariam aumentar muito a precisão do aparelho. Além disso, é necessário que se possa com facilidade exprimir a cor observada, segundo as regras internacionais; a construção dos aparelhos deve também ter em vista facilitar uma uniformização da nomenclatura.

Conclui-se da análise efectuada espectrofotometricamente, que os filtros do pigmentómetro são relativamente pouco selectivos, isto é, que absorvem incompletamente durante uma gama de comprimentos de onda relativamente grande; tais filtros têm, ainda, a desvantagem de não serem equivalentes quanto às características de cor calculadas segundo um dos métodos colorimétricos internacionais.

Expuz detalhadamente a maneira como as constantes colorimétricas foram determinadas. O processo usado é susceptível de introduzir erros, que em regra são da ordem de 2-3% na marcação das chapas (além dos erros propriamente instrumentais), e, nos piores casos, pode dar um erro de 5% ou um pouco mais. Examinando as curvas obtidas para as três espécies de filtros, verifica-se que realmente o erro envolvido em toda a determinação não é de molde a alterar sensivelmente os

resultados. Pode acontecer que, em parte, os erros se possam também atribuir a leves diferenças na gradação das escalas. Mas, duma maneira geral, pode-se dizer que as escalas estão bem graduadas e que os desvios encontrados entre as curvas por unidade de filtro, para cada côr, estão perfeitamente contidos no que se supõe ser o limite do êrro envolvido.

As determinações efectuadas com aparelhos semelhantes ao que usei são, em rigor, apenas válidas para um mesmo observador. A pequena selectividade dos filtros induz a julgamentos um tanto diferentes dos que seriam obtidos pelo «observador-padrão» e a erros sistemáticos que serão diferentes para cada pessoa. Com um observador treinado segundo os princípios da nomenclatura internacional, talvez se pudesse evitar a maior parte dêstes erros.

Para a determinação da côr dos olhos tive que usar um processo indirecto, comparando a pigmentação com os termos da escala de SALLER e medindo depois as côres da escala com o pigmentómetro. É evidente que as causas de êrro foram, assim, aumentadas e que se obterá, em média, uma menor precisão. Os números obtidos devem vir apenas com uma aproximação de 0.5 da escala, enquanto que o processo directo permitia 0.1 — 0.3. Seria interessante verificar experimental e estatisticamente qual o êrro envolvido conforme as diferentes condições em que se efectua a determinação, mas apenas com outras escalas, mais selectivas quanto à sua absorção, se conseguiriam resultados geralmente applicáveis para a maior parte dos observadores.

Em conclusão, o pigmentómetro (ou os aparelhos semelhantes) deve sofrer transformações que o tornem mais eficaz e permitam que as determinações sejam directamente comparáveis de uns para outros observadores, embora trabalhem independentemente.

Para tornar as determinações mais rigorosas era conveniente usar o iluminante C recomendado pela Comissão Internacional de Iluminação (C. I. E.) pelo menos nas determinações efectuadas no Laboratório; as condições de iluminação influem bastante nos resultados e uma luz incerta faz perder muito tempo ao observador, pois é preciso escolher as horas do dia e os dias em que a luz é aproximadamente de côr «média diária» diante da janela que fornece a luz.

Conclui-se também da análise que efectuei, que não é pos-

sível exprimir a cor a partir das medições com o pigmentómetro como indicam os fabricantes do aparelho.

*

* *

Com o pigmentómetro, efectuei determinações em rapazes e raparigas de várias escolas, desde os 7 aos 22 anos. O número de observações para cada idade (as observações foram agrupadas por anos) é relativamente pequeno nalguns casos, mas, duma maneira geral, os estatísticos calculados são representativos.

Estas determinações tiveram por fim a obtenção de curvas de *escurecimento com a idade* que permitam corrigir os dados das genealogias quando se estuda a hereditariedade da pigmentação no homem. O ajustamento das curvas foi efectuado por processos semelhantes aos da análise da variância de FISHER.

Como são as primeiras determinações de ordem quantitativa sobre este assunto, procurei sempre extrair dos dados certas informações que eles podiam conter. Assim, verifiquei se era possível supor um escurecimento com a idade para cada sexo e para a cor da pele, cabelo e olhos. No caso da pigmentação da pele e da zona interna da iris, as análises da variância demonstraram que as variações entre as médias das várias idades estão dentro do limite dos erros. Entre os 8 e os 22 anos para os ♂, e entre os 7 e os 19 para as ♀, não se pode verificar qualquer escurecimento médio por meio do pigmentómetro.

É muito provável que nas primeiras idades após o nascimento a pele escureça e se torne menos rosada, mas depois dos 7 anos não se demonstram alterações que se tornem sensíveis pela análise de populações.

O escurecimento da cor dos olhos foi analisado apenas a partir das determinações respeitantes à zona interna da iris. Foi necessário escolher esta região em virtude da grande heterogeneidade da cor da maioria das iris. A zona interna tem, quasi constantemente, uma cor uniforme, e é sempre tanto ou mais escura que o resto da iris (excluindo as pequenas manchas existentes em certos indivíduos, comparáveis aos «nevos» do resto do corpo). Certamente, há alterações na coloração da

iris, umas leves, outras mais ou menos profundas, dependentes de causas várias. Pode acontecer que a côr, já existente na zona interna nas primeiras idades, se estenda a uma maior porção da iris, mas depois dos 7 anos a zona interna parece não sofrer alterações de côr que se possam revelar com o pigmentómetro estudando populações. É provável, também aqui, que a côr da zona interna logo nos primeiros tempos de vida extra-uterina seja diferente da que resulta aos 7 anos, ou mesmo antes desta idade. O que se pode afirmar com os métodos usados é que depois dos 7 anos não se demonstra, com as únicas determinações quantitativas levadas a efeito, um escurecimento médio evidente.

Depois dos 7 anos parece que não é preciso, portanto, introduzir correcções nas genealogias para evitar o efeito do escurecimento com a idade, no que respeita à pigmentação da pele e da zona interna da côr dos olhos.

A côr da pele pode sofrer alterações profundas, sobretudo na sua componente vermelha-alaranjada, causada pela hemoglobina do sangue. Estas alterações não foram consideradas no presente trabalho e devem, por outro lado, ter pequena acção sobre o «preto» da pele, desde que as determinações se efectuem em indivíduos «normais» e da maneira indicada.

Outras alterações da côr da pele, mais ou menos profundas, podem provir de uma maior ou menor exposição aos agentes externos, principalmente ao calor e à luz solar. Por isso, as determinações têm que se efectuar naquela parte do ano em que é licito supor que os efeitos do verão anterior já desapareceram, isto é, depois de Fevereiro e antes do fim da primavera. O calor e a luz fazem aumentar muito a componente amarela da côr da pele e, duma maneira geral, toda a pigmentação incluindo o respectivo «preto». O efeito dos agentes externos merece, só por si, ser objecto de estudos demorados, em que se relacione o efeito com a constituição dos pigmentos, etc.

É possível, e mesmo provável, que o resultado da acção dos agentes externos sobre a pele do ante-braço esquerdo seja um pouco diferente nos conjuntos dos dois sexos que constituem as amostras analisadas, o que explicaria a diferença sexual encontrada para o caso da côr média da pele (para as gradações dos três filtros). A diferença entre as médias respeitantes ao «preto» é da ordem de 1 décima da escala do pigmentómetro, diferença

na realidade pequena, mas estatisticamente assegurada. A grandeza da diferença não justifica que se procurem explicações quanto a uma diferente distribuição de genes para a pigmentação nos dois sexos.

O «preto» da zona interna da íris apresenta também uma diferença da ordem de 1 décima da escala do pigmentómetro, mas que não é estatisticamente assegurada. Não se podem, portanto, fazer quaisquer conjecturas a seu respeito.

O escurecimento com a idade da cor do cabelo forneceu resultados mais interessantes para uma ulterior análise. Em ambos os sexos se revelou heterogeneidade entre as médias das várias idades. Procurei, depois, ajustar uma recta de regressão. Procedendo pela análise da variância, verifiquei que havia evidência de não linearidade: uma equação diferente da recta de regressão devia ajustar-se melhor aos dados. Por semelhança com outros fenómenos de crescimento, calculei uma equação logarítmica simples. A atestação da significância desta equação provou que ela era significativa. Para o caso dos ♂ parece que houve uma evidente melhoria no ajustamento da curva logarítmica quando comparado com o da recta; no caso das ♀ a melhoria foi pequena.

Os resultados demonstram que há um escurecimento médio da cor do cabelo, que se torna evidente pelas análises a que procedi; demonstram, mais, que as curvas de escurecimento médio são semelhantes às do crescimento em geral.

Seria interessante procurar ajustar curvas como a logística, ou outras usadas para o crescimento de populações e de indivíduos, porém, a falta de dados na parte inicial e média da curva, faz com que tal problema seja reservado, possivelmente, para futuros trabalhos.

É evidente que pelos processos usados apenas se obteve a «curva do escurecimento médio», ou seja, a que diz respeito ao escurecimento de populações e não ao de indivíduos. Poder-se-ia obter uma curva semelhante desde que o escurecimento da maioria dos indivíduos fôsse rápido e se desse com muito mais frequência nas primeiras idades, até aos 5 ou 6 anos. Neste caso, a curva média não teria a mesma forma das curvas individuais. Porém, observa-se directamente que o escurecimento da cor do cabelo é gradual e deve seguir aproximadamente uma curva como a que foi achada, de forma que a

«curva de escurecimento médio» pode ser usada para se calcularem correcções às genealogias.

Na resenha da literatura referi-me a um processo de correcção de dados para as genealogias, usado por RUTIL. Tal método exagera muito as diferenças individuais, pois supõe um crescimento «em linha recta» que pode não existir de facto, e que em regra não existe. O processo de substituição da curva de escurecimento individual pela de escurecimento médio parece-me o mais correcto (exceptuando o método directo, das curvas individuais, quasi impraticável para o caso do homem, pelo menos para aplicação imediata).

Os dados obtidos para o «preto» da côr da pele, cabelo e zona interna dos olhos, serviram para calcular coeficientes de correlação para cada idade. Procurei, depois, calcular para cada combinação um único coeficiente que abrangesse todo o colectivo. Para se proceder legitimamente ao cálculo de um coeficiente geral é preciso demonstrar que não há heterogeneidade na covariância. Procedi, pois, a análises da covariância.

Há heterogeneidade em todos os casos estudados, excepto na covariância entre a pele e o cabelo para o caso dos ♂, de forma que só neste último caso é que se pode calcular um coeficiente geral. Por outro lado, como o número de indivíduos observados em cada idade é relativamente pequeno, estes resultados não se podem tomar como definitivos. Em todo o caso, verifica-se que nas amostras estudadas há pequena pureza na compleição, tal como é apreciada pelo método usado. Pode supor-se, ainda, que a compleição sofre alterações com a idade, visto que se revelou heterogeneidade em quasi todas as análises.

Nas duas análises da covariância em que entra a côr da pele nota-se um comportamento particular: num caso (pele e cabelo) resultou heterogeneidade, enquanto que na mesma covariância do outro sexo a conclusão foi a oposta; no outro caso (pele e olhos) a heterogeneidade resulta, não da soma de produtos «entre os grupos», mas sim da proveniente de «dentro dos grupos» — esta última tomada como erro. Também se demonstrou uma maior pigmentação média na pele dos ♂, comparada com a das ♀: a diferença é da ordem de 0,1 da escala, para o «preto», mas é significativa. Quando da discussão das possíveis causas desta diferença, notei que ela poderia provir da maior expo-

sição dos braços (onde se faz a determinação da coloração) aos agentes externos, no sexo masculino. É provável que a mesma causa possa ser responsável pelos resultados, diferentes conforme o sexo, para as covariâncias em que entra a cor da pele.

*

* *

Muitas das questões respeitantes à pigmentação só poderão ser satisfatoriamente resolvidas quando se conhecerem os factos basilares sobre a composição das melaninas.

Passando em revista a literatura, reconhece-se que se dispõe quasi só de conjecturas do que poderá ser a composição química das melaninas, tanto no homem como em outros Mamíferos. Havia algumas investigações sobre os pigmentos da pele do homem, feitas principalmente por médicos; destaca-se entre os resultados a «reacção da dopa», de BLOCH.

Possuem-se, também, alguns dados sobre a fisiologia da chamada «pigmentação pelo frio» nos coelhos russos, e algumas vagas conjecturas sobre as espécies de melaninas nos pêlos dos coelhos.

No presente trabalho, o problema da composição e variedades das melaninas nos pêlos de coelhos e nos cabelos da cabeça de homens foi abordado com novos métodos e sob diferentes pontos de vista.

O conhecimento do estado actual das investigações sobre as proteínas é dum grande interesse para o estudo das melaninas. Com efeito, as melaninas são pigmentos em relação com as proteínas do organismo, isto é, são elas próprias corpos albuminóides. Devem, por outro lado, ter um certo parentesco com a queratina, dadas as suas relações na mesma célula e no mesmo pêlo ou cabelo. Atendendo a estas razões, procurei passar uma revista à literatura mais recente sobre proteínas.

O processo que serviu para o estudo das melaninas consiste essencialmente na dissolução de pêlos ou cabelos em soda cáustica de determinada concentração e na cromatografia das soluções, em colunas de alumina e de carbonato de cálcio. A técnica cromatográfica foi utilizada para a separação e caracterização das variedades de melaninas. Em certos casos foram ainda

empregados outros processos de obtenção das melaninas, como por exemplo por precipitação.

É sabido que a separação em coluna pode ser duma grande eficiência: por vezes separam-se estereoisómeros. Mas nada se pode dizer «a priori» sobre o comportamento de um grupo de compostos ainda por estudar.

Verifiquei que nas raças de coelho estudadas havia dois aspectos diferentes de cromatografias — as raças repartiam-se em dois grupos: um o grupo «escuro», outro o «claro». Haverá, portanto, *uma melanina escura* e *uma melanina clara*. A melanina clara encontra-se nas raças em que existe o factor *bb* (no estado recessivo — notação de NACHTSHEIM), a melanina escura encontra-se nas restantes raças (com *BB* ou *Bb*, isto é, *B* no estado dominante).

Entre as duas cromatografias há distinções suficientemente nítidas para que realmente se possa afirmar que existe mais de uma espécie de melaninas nos pêlos dos coelhos.

Nos estudos de proteínas é necessário ter sempre em vista o usual fenómeno da «desnaturação», que pode depender de causas aparentemente insignificantes. Possivelmente dá-se uma desnaturação, mais ou menos intensa e extensa, nas melaninas dissolvidas, devido ao ataque da soda cáustica. Até que ponto e de que natureza são os efeitos da soda cáustica — não se sabe bem. No entanto, verifiquei a este respeito que a fervura e acção do ar (oxidações) faz aumentar uma das fracções das cromatografias, de forma que é natural supôr-se que esta fracção representa melanina pelo menos desnaturada, e muito provavelmente alterada profundamente (produtos de decomposição).

Outro resultado interessante é o da separação das melaninas e queratina pelo método cromatográfico. Tudo leva a concluir que a separação é completa.

As cromatografias efectuadas até ao presente não permitem supor que em cada raça de coelhos haja mais de uma melanina diferente (nos pêlos do dorso, pelo menos). As colunas em que foram cromatografadas misturas de duas raças com melaninas diferentes são a favor desta conclusão. No entanto, reconhece-se que são precisas mais análises para uma completa resposta a esta questão.

Para o homem, as cromatografias são mais difíceis de interpretar: enquanto que para os cabelos pretos o aspecto é apa-

rentemente o mesmo que o da melanina escura dos coelhos, para o cabelo alaranjado (também chamado vermelho e ruivo) e para o cabelo loiro, a coluna fica diferente. O cabelo alaranjado parece que tem uma melanina própria, pois o aspecto é diferente de qualquer das outras cromatografias. O cabelo loiro parece, na realidade, ter uma melanina clara e uma porção menor de melanina escura.

Para o esclarecimento destas questões, no caso do homem, são precisas muitas mais observações em diferentes colorações de cabelos de várias populações. Pelas análises cromatográficas, parece que existem três melaninas diferentes: escura, ruiva e clara; mas é evidente que estes resultados são preliminares, ainda.

O *escurecimento com a idade* da cor do cabelo no homem pode ser interpretado com base nestes resultados. O escurecimento deve provir do aumento da quantidade de pigmento ou de pigmentos existentes. Em casos em que há mais do que um dos pigmentos (parece que no homem podem coexistir dois pigmentos diferentes) a princípio poderá dominar um, depois o outro. A diferente afinidade para a oxidase poderia explicar a mudança de cor. Esta hipótese explica os factos, mas reconhece-se facilmente que os seus fundamentos não estão ainda solidamente estabelecidos.

Nas melaninas de coelho obtidas cromatograficamente efectuei algumas observações respeitantes à solubilidade e propriedades ópticas. O produto obtido é muito mais facilmente solúvel que os cabelos ou as melaninas de precipitação. É provável que a queratina exerça influência sobre a solubilidade das melaninas.

Verifiquei que os preparados obtidos, e que devem representar as melaninas puras, apresentavam dupla refração «própria», o que é bastante interessante para o estudo da estrutura.

Muitas questões ficam em aberto, outras foram apenas levemente enunciadas.

A técnica que usei parece-me susceptível de, combinada com outras, levar a bom termo algumas investigações sobre a composição das melaninas. Em futuros trabalhos serão abordados vários dos problemas que estão para resolver.

Uma das conseqüências que podem ter estes estudos é a de aclararem a hereditariedade e fenogénese da pigmentação. Para

a hereditariedade da pigmentação no homem utilizam-se quasi só as analogias com outros Mamíferos, principalmente com o coelho (E. FISCHER); é muito provável que por largo tempo se continue ainda a tratar da hereditariedade da maioria dos caracteres «normais» no homem por analogia e por outros processos indirectos. Um esclarecimento da composição das melaninas seria do máximo interesse. As cromatografias demonstram que não há paralelismo completo entre as variedades de melaninas no coelho e no homem: neste último há outras melaninas. É conveniente, portanto, não querer forçar analogias que são, segundo parece, muito vagas.

Compreende-se também, que o esclarecimento da composição das melaninas ou, pelo menos, de alguns dos factores basilares que lhes dizem respeito, tem muita importância para a explicação da fenogénese da pigmentação.

É necessário que se realizem muitos mais estudos sobre estas questões. Particularmente, convém alargar tais estudos com novos métodos, de forma a englobarem também a pigmentação da pele e dos olhos, no caso do homem, além de tantos outros problemas sobre a pigmentação melânica noutros Mamíferos.

BIBLIOGRAFIA

Da 1.^a e 2.^a partes

- BAUR, E., FISCHER, E. e LENZ, F. — 1936 — *Menscheliche Erblehre*. — München.
- BELLAMY, R. — 1930 — Measuring hair color. — *Amer. J. Phys. Anthropol.* **14**, 75.
- BLUNN, C. T. e GREGORY, P. W. — 1937 — Linkage studies with Curly₂ in the rat. — *J. Hered.* **28**, 43.
- BOAS, F. e MICHELSON, N. — 1933 — The graying of hair. — *Amer. J. Phys. Anthropol.* **17**, 213.
- BOWMANN, H. A. — 1930 — The color-top method of estimating skin pigmentation. — *Amer. J. Phys. Anthropol.* **14**, 59.
- BUNAK, V. V. — Opit' videleniia fenotipov okrasski voloss po dannim spektro-fotometritcheskogo issledovaniia. — Moskva.
- CASTLE, W. C. — 1930. — *The genetics of rabbits* — Cambridge, Mass.
- CLEMENTS, F. — 1931 — Relation between skin colour and degree of tanning. — *Amer. J. Phys. Anthropol.* **15**, 493.
- CONITZER, H. — 1931 — Die Rothaarigkeit. — *Zeitsch. Morph. Anthropol.* **29**, 85.
- CREW, F. A. E. e SMITH, A. D. B. — 1930 — The genetics of the horse. — *Bibliogr. Genet.* **6**, 123.
- CUÉNOT, L. — 1928 — *Généétique des souris*. — *Bibliogr. Genet.* **4**, 179.
- DANEEL, R. — 1934 — Physiologie der Kälteschwärzung beim Russenkaninchen. — *Biol. Zentralbl.* **54**, 287.
- — 1936 — Physiologie der Kälteschwärzung beim Russenkaninchen. — *Biol. Zentralbl.* **56**, 572.
- DAVENPORT, C. — 1925 — Notes on physical anthropology of Australian aboriginals and black-white crosses. — *Amer. J. Phys. Anthropol.* **8**, 73.
- ENGELSMAYER, W. — 1934 — Nachweis der alternativen Modificabilität der Haarfärbung beim Russenkaninchen. — *Zeitsch. Ind. Abst. Vererb. Lehre.* **48**, 361.
- FISHER, R. A. — 1932 — *Statistical methods for research workers*. — London.
- — 1935 — *The design of experiment*. — London.
- GARDNER, B. B. e MAC ADAM, D. L. — 1934 — Colorimetric analysis of hair colour. — *Amer. J. Phys. Anthropol.* **19**, 187.
- GODIN, P. — 1935 — *Récherches anthropométriques sur la croissance des diverses parties du corps*. — Paris.
- GOULDEN, C. H. — 1937 — *Methods of statistical analysis*. — Mineapolis.
- GOUVELA, A. J. A. de — 1935 — Contributions to the study of the rôle of the double bond on the absorption spectra of organic compounds. — *Rev. Fac. Ciênc. Univ. Coimbra.* **5**, 309.

- GRAY, J. — 1908 — A new instrument for determining the colour of the hair, eyes and skin. — *Man*, **8**, 27.
- HARDY, A. C. — 1935 — A new recording spectrophotometer. — *J. Opt. Soc. Amer.* **25**, 305.
- HARRIS, R. G. — 1926 — The San-Blas Indians. — *Amer. J. Phys. Anthropol.* **9**, 17.
- HERSKOVITS, M. J. — 1926 — Age changes of pigmentation of American Negroes. — *Amer. J. Phys. Anthropol.* **9**, 321.
- Hesch, M. — 1931 — Über Pigmentierungsverhältnisse der menschlichen Iris, nach Alter und Geschlecht... — *Verh. deut. Gesellsch. Phys. Anthropol.* **5**, 9.
- JUDD, D. B. — 1933 — The 1931 I. C. I. standard observer and coordinate system for colorimetry. — *J. Opt. Soc. Amer.* **23**, 359.
- KARVÉ, I. — 1931 — Beobachtungen über die Augenfarbe an Chitpavan-Brahmanen. — *Zeitsch. Morph. Anthropol.* **29**, 498.
- LENZ, F. — 1925 — Muss das Nachdunkeln der Haare als Dominanzwechsel aufgefasst werden? — *Arch. Rassen Gesellsch. Biol.* **16**.
- LOTKA, A. J. — 1932 — The structure of a growing population. — *Problems of Population* — *Proc. Int. U. Sc. Inv. Pop. Probl.* — London, 1932.
- NACHTSHEIM, H. — 1929 — Die Entstehung der Kaninchenrassen im Lichte ihrer Genetik. — *Zeitsch. Tierzücht.* **14**.
- — 1933 — Die genetischen Beziehungen zwischen Körperfarbe und Augenfarbe beim Kaninchen. — *Biol. Zentralbl.* **53**, 99.
- NEDRIGAJILOVA, O. V. — 1926 — Fizicheskie priznaki rabotnists g. Xarkova. — *Materiali po Antropologii Ukraini*.
- NEUMANN, P. — 1937 — Haarpigmentuntersuchungen an verschiedenen Farbrassen des Kaninchens — *Biol. Zentralbl.* **57**, 522.
- PEARL, R. — 1924 — *Studies in human biology.* — Baltimore.
- — 1931 — *The biology of population growth.* — New York.
- PEARSON, K. — 1904 — On the correlation between hair colour and eye colour in *Man*. — *Biometr.* **3**, 459.
- PETERS, H. B. — 1936 — Über Augenfarbentafeln und ihre diagnostischen Wert. — *Zeitsch. Rassenk.* **3**, 87.
- ROBERTS, E. — 1937 — Color inheritance in short-horn cattle. — *J Hered.* **28**, 167.
- SCHIEBE, G. — 1933 — Spektroskopische und radiometrische Analyse. — *Physikalische Methoden der analytischen Chemie.* — Leipzig.
- SCHULTZ, W. — 1932 — Haarmelaninerzeugung bei Albinos... — *Arch. Dermat.*, **165**.
- SCHMIDTMANN, M. — 1928 — Mikroskopische Nachweis der Zellpigmente und Lipoiden in tierischen und menschlichen Geweben. — *PETERFI Methodik der Wiss. Biol.*
- SNEDECOR, G. W. — 1934 — Calculation and interpretation of analysis of variance and covariance. — Ames, Iowa.
- STANUS, H. S. — 1913 — Anomalies of pigmentation among natives of Nyasaland. — *Biometr.* **9**, 333.
- SUMNER, F. B. — 1932 — Genetic, distributional and evolutionary studies of the subspecies of deer mice *Peromyscus*. — *Bibliogr. Genet.* **9**, 1.
- TAMAGNINI, E. — 1938 a) — A heterogeneidade da variação — Análise da variância. — *Rev. Fac. Ciên. Univ. Coimbra*, **6**.

- TAMAGNINI, E. — 1938 *b*) A pigmentação dos Portugueses — *Contr. Antrop. Port.* — *Rev. Fac. Ciên. Univ. Coimbra*, **6**.
- TIPETT, L. H. C. — 1931 — *The Methods of statistics.* — London.
- TOCHER, J. F. — 1908 — Pigmentation survey of school children in Scotland. — *Biometr.* **6**, 129.
- TODD, T. W., BLACKWOOD, B. e BEECHER, H. — 1928 — Skin pigmentation. The color top method of recording. — *Amer. J. Phys. Anthropol.* **11**, 127.
- TODD, T. W. e GORDER, L. v. — 1921 — The quantitative determination of the skin colour of the American Negro. — *Amer. J. Phys. Anthropol.* **4**, 239.
- UCHIDA, G. — 1904 — On the correlation between age and colour of hair and eyes in man. — *Biometr.* **3**, 462.
- VIRCHOW, R. — 1886 — Gesamtbericht über die von der deutschen Anthropologisch Gesellschaft... über die Farbe der Haut, Haare und Augen... in Schulkindern... — *Arch. Anthropol.* **16**, 1275.
- WEISSENBERG, S. — 1911 — *Das Wachstum des Menschen.* — Stuttgart.
- WENINGER, J. — 1934 — Irisstruktur und Vererbung. — *Zeitsch. Morph. Anthropol.* **34**, 469.
- YULE, G. U. e KENDALL, M. G. — 1937 — *An introduction to the theory of statistics.* — London.

Da 3.^a parte

- AMBRONN, H. e FREY, A. — 1926 — *Das Polarisationsmikroskop* — Leipzig.
- ASTBURY, W. T. — 1934 — Roentgenoskopie von Proteinfasern. — *Koll. Zeitsch.* **69**, 340.
- ASTBURY, W. T. — 1936 — X-ray studies of protein structure. — *Nature*. **137**, 803.
- — 1937 — Relation between « fibrous » and « globular » proteins. — *Nature*. **140**, 968.
- — 1938 — Röntgenstrahlen Abenteuer unter den Eiweisskörpern. — *Koll. Zeitsch.* **83**, 130.
- ASTBURY, W. T. e DICKINSON, S. — 1935 — α - β intramolecular transformation of myosin. — *Nature*. **135**, 95.
- — — 1936 — X-rays study of myosin. — *Nature*. **137**, 909.
- ASTBURY, W. T. e LOMAX, R. — 1934 — X-ray photographs of crystalline pepsin. — *Nature*. **133**, 795.
- BLOCH, B. — 1927 — *Das Pigment. Handbuch der Haut- und Geschlechtskrankheiten.*
- COUCEIRO DA COSTA, R. G. — 1936 — Noções gerais sobre colóides-Tyxotropia do pentóxido de vanádio. — *Rev. Fac. Ciên. Univ. Coimbra*, **5**, 1.
- DANEEL, R. e SCHAUMANN, K. — 1938 — Zur Physiologie der Kälteschwärzung beim Russenkaninchen III. — *Biol. Zentralbl.* **58**, 242.
- DANIEL, J. — 1938 — Studies of multiple allelomorphous series in the house-mouse III-A spektrophotometric study of house-mouse melanin. — *J. Genet.* **36**, 139.

- DRY, F. W. — 1936 — The genetics of the Wensbydale breed of sheep. II—Colour, fertility and intensity of selection. — *J. Genet.* **33**, 123.
- DUNN, L. C. — 1936 — Studies of allelomorphous series in the house-mouse. II—Description of agouti and albino series.—*J. Genet.* **36**, 443.
- DUNN, L. C. e EINSELE, W. — 1938 — Studies of multiple allelomorphous series in the house-mouse. IV—Quantitative comparison of melanin from members of the albino series. — *J. Genet.* **36**.
- EINSELE, W. — 1937 — Studies of multiple allelomorphous series in the house-mouse. II—Method for the quantitative estimation of melanin. — *J. Genet.* **34**, 1.
- ENGELSMAYER, W. — 1934 — Nachweis der alternativen Modificabilität der Haar-färbung beim Russenkaninchen. — *Zeitsch. Ind. Abst. Vererb.* **48**, 361.
- FEIGL, F. — 1937 — Qualitative analysis by spot tests. — New York.
- FLORENCE, G., ENSELME, J. e POZZI, M. — 1935 — Spektrographische Untersuchungen über die Reaktion der Tyrosinase und Tyrosin und verschieden verwandten biologische Verbindungen. — *Bull. Soc. Chim. Biol. Florence-de-Chem. Zentralbl.* 1935.
- GARDNER, B. B. e MAC ADAM, D. L. — 1934 — Colorimetric analysis of hair colour. — *Amer. J. Phys. Anthropol.* **19**, 187.
- GIROUD, A. e CHAMPETIER, C. — 1936 — Recherches sur le roentgenogramme de la kératine. *Bull. Soc. Chim. Biol.* **18**, 656.
- HADJIDIMITROFF, P. — 1933 — Die Pigmentverteilung im Kaninchenhaar. — *Zeitsch. Zücht.* **27**, 243.
- HALLE, F. — 1937 — Über den Aufbau der Eiweissmoleküle. — *Koll. Zeitsch.* **81**, 334.
- HAUROWITZ, F. — 1936 — Ionenstruktur, Löslichkeit und Flockung der Proteine—Ein Beitrag zur Systematik der Proteine.—*Koll. Zeitsch.* **74**, 208.
- JANKOVSKY, W. — 1932 a) — Zur Frage der Haarpigmente. — *Zeitsch. Rassenphys.* **5**, 1.
- — 1932 b) — Beitrag zur Frage der Haarpigmente. — *Zeitsch. Rassenphys.* **5**, 111.
- — 1935 — Zusammenhänge zwischen Farbe und Pigmente des Haares. — *Verh. deuts. Gesellsch. Phys. Anthropol.* **7**, 2.
- KATZ, J. R. e ROOY, A. DE — 1933 — Über des Röntgenspektrum des Fibrins. — *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas.* **52**, 742.
- KLÖTZER, F. e SUAPE, E. — 1935 — Röntgendiagramme von menschlichen Haut. — *Fortsch. Geb. Roentgen.* **52**, 576.
- KUHN, W. — 1934 — Über die Gestalt fadenförmiger Moleküle in Lösungen. — *Koll. Zeitsch.* **68**, 12.
- LEDERER, E. — 1935 — L'adsorption chromatographique et ses applications. — *Chim. Industrie.* **33**, 1072.
- LINELL, L. e RAPER, H. S. — 1935 — The chromogen of melanurie. — *Bioch. J.* **29**, 76.
- LOTTERMOSER, A. e EDELMANN, K. — 1938 — Über die Adsorption von aliphatischen Aminen und von Eiweisspaltprodukten an Aluminiumoxyd aus wässriger Lösung. — *Koll. Zeitsch.* **83**, 262.
- PAULI, W. o. e VALKÓ, E. — 1933 — Kolloidchemie der Eiweisskörper. — Dresden.

- PRZILECKY, ST. J. VON — 1937 — Versuch einer Klassifikation der biologischen Kolloide, I — Koll. Zeitsch. **79**, 129.
- — 1938 — Versuch einer Klassifikation der biologischen Kolloide. II — Koll. Zeitsch. **83**, 51.
- SALLER, K. — 1930 — Leitfaden der Anthropologie. — Berlin.
- SALLER, K. e MAROSKE, F. — 1933 — Chemische und genetische Untersuchungen am menschlichen Pigmente, speziell demjenigen des Haares. — Zeitsch. Konst.-Lehr. **17**, 279.
- SCHMIDTMANN, M. — 1933 — Mikroskopischer Nachweis der Zellpigmente und Lipide in tierischen und menschlichen Geweben. — PÉTERFI Methodik der wissenschaftlichen Biologie.
- SCHULTZ, W. — 1932 — Haarmelaninerzeugung bei Albinos innerhalb 5 Minuten ... — Arch. Dermat. **165**.
- SPEAKMAN, J. B. — 1933 — Reactivity of the sulphur linkage in wool. — Nature. **132**, 930.
- SVEDBERG, T. — 1931 — The determination of the molecular weight of insulin. — Nature. **77**, 438.
- — 1934 — Die Molekulargewichtsanalyse im Zentrifugalfeld. — Kol. Zeitsch.. **67**, 2.
- — 1937 — The ultracentrifuge and the study of high-molecular compounds. — Nature. **139**, 1051.
- VOGE, C. B. — 1935 — Pigmentation and the «Dopareaction». — Manuf. Chemist. Pharm. Cosmet. Trade J.-1935.
- WILKERSON, V. A. — 1934 — The chemistry of the human epidermis. — J. Biol. Chem. **107**, 377.
- WHRINCH, D. — 1936 — a) The pattern of proteins. — Nature. **137**, 411.
- — 1936 — b) Structure of proteins and physiological active compounds. — Nature. **138**, 651.
- — 1937 — The cyclol theory and the globular proteins. — Nature. **139**, 972.
- WRINCH, D. e LEGYD, D. J. — 1936 — The hydrogen bond and the structure of proteins. — Nature. **138**, 758.
- ZECHMEISTER, L. e CHOLNOKY, L. v. — 1937 — Die Chromatographische Adsorptionsmethode. — Wien.
- ZOCHER, H. — 1921 — Über Sole mit nichtkugeligen Teilchen. — Zeitsch. phys. Chem. **98**, 293.



CORRECÇÕES

Entre outras correcções, que qualquer leitor fãcilmente efectuará, notem-se as seguintes:

pág.	linha	onde se lê	deve se ler
3	5	e Prof. sr.	e sr. Prof.
21	última	a que é maior)	a que é menor)
22	»	023	0.23
32	22	gradauação e que dá	gradauação é que dá
»	35	020	0.20
38	38	iridiana	das íris
39	28 e 29	disigual distribuição do pigmento ou pigmentos em classes, distintas	desigual distribuição do pigmento (ou pigmentos) em classes distintas,
43	12 e 13	STANUS 1313	STANUS 1913
45	última	a que (1);	a que (1)
49	3	grupos à igual	grupos é igual
51	21	$\bar{x} = 2.58$	$\bar{x} = 2.581$
54	27	$\bar{x} = 3.06$	$\bar{x} = 3.063$
»	28	Desvio-padrão	Desvio-padrão
55	9	T_i^2/n_i'	T_i^2/n_i'
»	28	—	$\sum_1^{n_i'} x^2$
»	cimo da 5. ^a coluna da Tab. XIII	—	—
59	30	<i>pigmentados do</i>	<i>pigmentados na pele do</i>
63	1	$\bar{x} = 18.81$	$\bar{x} = 18.811$
»	»	$\bar{x} = 16.92$	$\bar{x} = 16.923$
69	25	F 0/0 F 0/0	F 5 0/0 F 1 0/0
76	7	$= \sum n'_p (y_p - \bar{y})^2$	$= \sum n'_p (\bar{y}_p - \bar{y})^2$
77	22	= 39.387	= 39.397
82	na fig. 7	10 (em ordenadas)	12
84	20	que êste último é	que aquele é
87	penúltima	= 429.92 —	= 429.98 —
88	25	$\Sigma (x^2)$	$\Sigma (x_1)^2$

pág.	linha	onde se lê	deve-se ler
98	37	somas de quadrados de produtos	somas de produtos
102	23	$r = 02044$	$r = 0.2044$
»	28	$(1 - 2044)^2$	$(1 - 0.2044)^2$
129	33	HIEMANN	NIEMANN
138	11	a determinação no	a determinação da sua absorção no
140	36 e 38	seja no menor número possível	seja o menor possível
146	18	parte na supe-	na parte supe-
162	16	zona interna da côr dos olhos	zona interna das íris



RÓ
MU
LO



CENTRO CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE COIMBRA

1329682495

