



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Lara Maria Herrera

Antropologia Forense e estimativa da origem geográfica: composição isotópica do esmalte dentário de indivíduos modernos residentes no estado de São Paulo

Araraquara

2020



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Lara Maria Herrera

Antropologia Forense e estimativa da origem geográfica: composição isotópica do esmalte dentário de indivíduos modernos residentes no estado de São Paulo

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia de Araraquara, para obtenção do título de Doutor em Odontologia, na Área de Ciências Forenses

Orientadora: Profa. Dra. Mônica da Costa Serra
Coorientador: Prof. Dr. Clemente Maia S. Fernandes

Araraquara

2020

Herrera, Lara Maria

Antropologia Forense e estimativa da origem geográfica:
composição isotópica do esmalte dentário de indivíduos
modernos residentes no estado de São Paulo / Lara Maria
Herrera.-- Araraquara: [s.n.], 2020
83 f.; 30 cm.

Tese (Doutorado em Odontologia) – Universidade
Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia
Orientador: Prof. Dr. Mônica da Costa Serra
Coorientador: Prof. Dr. Clemente M. S. Fernandes

1. Odontologia legal 2. Isótopos 3. Localizações
geográficas I. Título

Lara Maria Herrera

Antropologia Forense e estimativa da origem geográfica: composição isotópica do esmalte dentário de indivíduos modernos residentes no estado de São Paulo

Comissão julgadora

Tese para obtenção do grau de Doutor em Odontologia

Presidente e orientadora: Profa. Dra. Mônica da Costa Serra

2º examinador:

3º examinador:

4º examinador:

5º examinador:

Araraquara, 19 de março de 2020.

DADOS CURRICULARES

Lara Maria Herrera

NASCIMENTO: 17 de março de 1987 – Sertãozinho – SP

FILIAÇÃO: Luciana Rosa Aparecida Catanante e Paulo Sérgio Herrera

2007 – 2011 Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr) – UNESP

2012 – 2013 Especialização em Odontologia Legal pela Faculdade de Odontologia de São Paulo (FO) – USP

2014 – 2016 Mestrado em Ciências Odontológicas, Área de Concentração em Odontologia Forense, pela Faculdade de Odontologia de São Paulo (FO) – USP

Dedico este trabalho à minha mãe, ao meu
irmão e ao meu marido,
a todas as pessoas que, fora do ambiente
acadêmico, financiam a Ciência,
e a todas as vítimas que necessitam de
identificação e às suas famílias.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Mônica da Costa Serra e ao Prof. Dr. Clemente M. S. Fernandes pela oportunidade e confiança depositada para a realização deste trabalho,

Ao Prof. Dr. Gareth R. Davies e à Dra. Lisette M. Kootker pelas oportunidades, contribuições e zelo com a qualidade do trabalho,

Ao grupo de Geologia e Geoquímica da Faculdade de Ciências da Vrije Universiteit Amsterdam pela receptividade e ajuda na execução desta pesquisa,

À Profa. Dra. Livia Nordi Dovigo pelos ensinamentos em Estatística, discussões sobre Integridade e todo suporte, inclusive extramuros,

Ao Prof. Dr. Didier Gastmans pela ajuda em questões de Geologia,

Ao Centro de Especialidades Odontológicas de Araraquara (CEO), à Associação Brasileira de Odontologia de Araraquara (ABO), à Clínica Odontológica do Sindicato dos Empregados no Comércio Hoteleiro de Campinas e Região, ao Hospital do Servidor Público Municipal de São Paulo, à Faculdade Facoph de Itapetininga, à Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas – Regional de Presidente Prudente (APCD) e ao Centro de Especialidades Odontológicas de Piracicaba (CEO), pela autorização concedida para acesso aos pacientes, tornando possível a coleta de amostras,

Às cirurgiãs-dentistas Aline Cristina Senna Barbosa e Gabriela Eleutério Pulitano pela ajuda com a coleta de dados,

Aos participantes da pesquisa pelo fornecimento de suas informações e amostras,

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram de alguma forma para a realização deste trabalho.

À CAPES - O presente trabalho foi parcialmente realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001. Edital Ciências Forenses 25/2014 “Pró-Forenses”. Processo: PE 88881.311546/2018-01.

“Inteiramente errônea é a concepção popular de que a ciência engloba corpos de fatos estabelecidos. Nada na ciência está permanente estabelecido, coisa alguma, nela, é inalterável. Em verdade, a ciência está claramente em constante modificação – e esta modificação não se processa por simples acréscimo de novas certezas. Se agimos racionalmente, baseamos nossas decisões e expectativas no “que de melhor sabemos” ...”
Karl Popper *

* Magee EB. As idéias de Popper; tradução de Leônidas Hegenberg e Octanny Silveira da Mota. São Paulo: Editora Cultrix, Ed da Universidade de São Paulo, 1974.

Herrera LM. Antropologia Forense e estimativa da origem geográfica: composição isotópica do esmalte dentário de indivíduos modernos residentes no estado de São Paulo. [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

RESUMO

Em casos de necessidade do estabelecimento da identidade de uma pessoa, quando não há suspeição de quem possa ser o indivíduo, e não há registros ante-mortem para comparação, necessários para aplicação de método de identificação, pode ser realizada a estimativa do perfil biológico (sexo, idade à morte, estatura e ancestralidade). A estimativa da origem geográfica pode auxiliar, reduzindo as possibilidades da origem mais provável do indivíduo, e facilitando nas buscas por identidades. Essa estimativa pode ser feita por meio de análises isotópicas de tecidos biológicos. O esmalte dentário é o tecido mais rígido do corpo humano, e praticamente não sofre alterações quanto às razões isotópicas. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a assinatura isotópica de esmalte dentário de indivíduos residentes no estado de São Paulo. Também foi objetivo fazê-lo por regiões ao longo do mencionado estado e por níveis socioeconômicos. Cento e quarenta e dois terceiros molares foram utilizados para extração de esmalte dentário. As amostras foram preparadas e analisadas para carbono e oxigênio em um espectrômetro de massas de razão isotópica (IRMS) acoplado a um analisador do tipo Gas Bench II; para estrôncio, em um espectrômetro de massas de ionização térmica Triton-plus Thermo Finnigan (TIMS). Os valores encontrados de $\delta^{18}\text{O}$, $\delta^{13}\text{C}$ e $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ estimados para a população do estado de São Paulo foram respectivamente: $-5,82\text{‰} \pm 0,09$, $-9,04\text{‰} \pm 0,16$ e $0,712067 \pm 0,000162$. Diferenças foram observadas nos valores isotópicos entre as regiões g1 e g5. Diferenças nos valores isotópicos foram observadas entre indivíduos das classes socioeconômicas mais extremas para $\delta^{13}\text{C}$ e $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$. Esses achados reforçam a possibilidade de se estimar a origem geográfica. O presente estudo poderá servir de base de dados para auxiliar no processo da estimativa da origem geográfica em casos forenses futuros.

Palavras – chave: Odontologia Legal. Isótopos. Localizações Geográficas.

Herrera LM. Forensic Anthropology and the estimation of geographic origin: isotopic composition of enamel teeth from modern subjects living in São Paulo state. [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

ABSTRACT

In cases of need to establish the identity of a person, when there is no suspicion of who the individual may be, and there are no ante-mortem records for comparison, necessary to apply the identification method, the biological profile can be estimated (sex, age at death, stature and ancestry). The estimate of the geographical origin can help by reducing the possibilities of the most likely origin of the individual and facilitating the search for identities. This estimative can be conducted through isotopic analysis of biological tissues. Dental enamel is the hardest tissue of the human body and does not undergo isotopic changes. The aim of the study was to characterize to characterize the dental enamel isotopic signature of subjects living in the state of São Paulo. It was also an aim to do it by regions along the aforementioned state and by socioeconomic status. One hundred and forty-two third molars were used for tooth enamel extraction. The samples were prepared and analyzed for carbon and oxygen on Isotopic Ratio Mass Spectrometer (IRMS) coupled with Gas Bench II analyzer and for strontium, on a Thermal Ionization Mass Spectrometer Triton-plus Thermo Finnigan (TIMS). The obtained values of $\delta^{18}\text{O}$, $\delta^{13}\text{C}$ and $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ estimated for the population of the state of São Paulo were, respectively: $-5.82\text{‰} \pm 0.09$, $-9.04\text{‰} \pm 0.16$ and 0.712067 ± 0.000162 . Differences regarding isotope values were observed mainly between the g1 and g5. Differences were also observed between individuals from the most extreme socioeconomic status ($\delta^{13}\text{C}$ and $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$). These findings corroborate to the possibility of estimating geographic origin. The present study can serve as a database to assist in the process of estimating geographic origin in future forensic cases.

Keywords: Forensic Dentistry. Isotopes. Geographic Locations.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 PROPOSIÇÃO	16
2.1 Objetivo Geral	16
2.2 Objetivos Específicos	16
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	17
3.1 Definições e Símbolos	17
3.1.1 Isótopos	17
3.1.2 Abundância isotópica	18
3.1.3 Razão isotópica	18
3.1.4 Fator de fracionamento	18
3.1.5 Enriquecimento isotópico	19
3.2 Aplicações	20
3.3 Isótopos de Maior Interesse na Esfera Forense.....	22
3.3.1 Carbono	22
3.3.2 Oxigênio	24
3.3.3 Nitrogênio	28
3.3.4 Estrôncio	28
3.3.5 Chumbo	29
3.3.6 Análise combinada	30
3.4 Tecidos Humanos Mais Utilizados na Análise Isotópica.....	32
3.4.1 Ossos	32
3.4.2 Dentes	34
3.4.3 Cabelos	39
3.4.4 Unhas	40
3.4.5 Pele	40
3.5 Problemas com Amostras e Análises	40
3.6 Pré-tratamentos	42
3.7 Isoscapes	46

SUMÁRIO

4 MATERIAL E MÉTODO	48
4.1 Material	49
4.2 Método	52
4.3 Análise Estatística	54
 5 RESULTADO	 55
 6 DISCUSSÃO	 62
 7 CONCLUSÃO	 70
 REFERÊNCIAS	 71
 APÊNDICE A	 81
 ANEXO A.....	 83

1 INTRODUÇÃO

O número de ocorrências de desaparecimentos de pessoas no Brasil é estimado em cerca de 80 mil por ano¹. São cerca de 175 mortes violentas intencionais por dia no país e uma taxa de 30,8 mortes por 100 mil habitantes. Somente no estado de São Paulo, em 2018 este número foi estimado como 20 mil². Tal número expressivo representa um problema social, por estar relacionado, direta ou indiretamente, à violência doméstica e homicídios entre outros.

Muitas pessoas desaparecidas são encontradas mortas, e são enterradas sem identidade. Em situações em que somente remanescentes humanos são encontrados, é possível estimar o perfil biológico da vítima por meio de técnicas da Antropologia Física, como o sexo, a idade, estatura e a ancestralidade. A partir do perfil biológico, busca-se por suspeitos que possuam as características estimadas e, por comparação das informações médicas e odontológicas dos remanescentes humanos com as dos suspeitos elencados, um método de identificação humana é realizado e pode ter sucesso.

Porém, informações como sexo, idade, estatura e ancestralidade podem não ser suficientes para compor o perfil de um indivíduo. Nesse sentido, conhecer a origem geográfica – a qual não está, necessariamente, relacionada ao local onde o esqueleto foi encontrado – pode possibilitar o refinamento das buscas pela identidade.

Uma ferramenta com grande potencial para a estimativa da origem geográfica de indivíduos não identificados é a análise de isótopos encontrados em tecidos biológicos³⁻⁸. Os isótopos são elementos químicos que estão presentes na natureza e são incorporados ao corpo humano principalmente por meio da alimentação⁹ e da água ingerida^{10,11}. Dessa forma, se os padrões isotópicos do ambiente e dos alimentos forem conhecidos, considerando que estes alimentos sejam cultivados e consumidos localmente, por comparação aos tecidos humanos é possível estimar se um indivíduo está, de alguma forma, relacionado àquele ambiente, uma vez que o homem sofre influência dos padrões isotópicos do meio em que vive^{12,13}.

Para que tal comparação seja possível, os valores isotópicos dos tecidos humanos podem ser convertidos considerando a questão do ambiente. Para tanto, é necessário conhecer todos os recursos de água do local e considerar os períodos de chuva, estações do ano e temperatura do ambiente, de épocas específicas, além dos

erros associados às conversões de dados isotópicos dos tecidos para comparação com os dados do ambiente^{14,15}. Além disso, não são conhecidos todos os fatores que podem influenciar a composição isotópica dos tecidos humanos. Hábitos como o fumo^{9,16}, metabolismo e doenças^{17,18}, práticas de preparo dos alimentos¹⁹, globalização – e o consumo de alimentos industrializados e ultra processados – fertilizantes nas plantações podem ser responsáveis pela composição isotópica do organismo.

O nível socioeconômico²⁰ parece ser importante, uma vez que o padrão alimentar, hábitos e até mesmo as condições do ambiente podem estar relacionados à economia do local e aos seus aspectos culturais. A própria dieta do supermercado exige um nível socioeconômico mínimo. Dependendo do local, as condições socioeconômicas podem moldar os hábitos alimentares. Restrições de oferta de produtos em uma região podem ser reflexo da falta de influência política ou mobilidade geográfica das pessoas. Pessoas de classes sociais mais altas podem buscar melhores condições em outras regiões/áreas e, como consequência, podem levar a uma concentração de pessoas de menor nível socioeconômico em áreas mais remotas²¹.

A composição isotópica encontra-se preservada para diferentes épocas da vida do indivíduo, e depende do tecido observado. Assim, o tipo de tecido pode ser considerado um outro fator, pois pode registrar diferentes assinaturas isotópicas para um mesmo indivíduo. Os dentes, mais particularmente o esmalte dentário, são as estruturas mais resistentes do corpo humano. Os minerais, na forma de cristalitos de hidroxiapatita – $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ – são responsáveis pela sua alta dureza²². O esmalte dentário apresenta cronologia de mineralização bem específica e quando formado, dificilmente sofre alterações isotópicas^{23,24}. Por conta da sua dureza, os dentes são bem resistentes frente a diferentes condições, como altas temperaturas (em casos de mortes provocadas por incêndios), umidade (afogamentos), entre outras situações, e por isso são considerados bons materiais para análise no contexto forense.

Alguns autores^{6,25} vêm sugerindo que a comparação isotópica seja feita com dados de tecidos humanos de origem conhecida para estimar a origem geográfica, ou ainda por meio da comparação com mapas construídos a partir de dados de amostras biológicas (e não dados provenientes diretamente do ambiente). Devido a processos migratórios, variações geográficas, culturais, clima e forma como as pessoas

interagem com o meio em que se encontram, as características das populações se manifestam de formas distintas, e por isso a importância do presente estudo. Alguns trabalhos^{4,6,25-27} documentaram a variabilidade de isótopos em dentes de indivíduos modernos de diferentes regiões do mundo. Até o presente, não foi localizada nenhuma informação sobre a aplicação da análise isotópica em dentes de brasileiros modernos visando auxiliar peritos e outros profissionais em questões médico e odontológicas. Este fato motivou a busca de tais parâmetros para a nossa população.

Neste trabalho, incluímos em nossa amostra dentes terceiros molares de indivíduos vivos de origem conhecida, e construímos estimativas de valores isotópicos para diferentes regiões do estado de São Paulo. Aspectos geológicos, nutricionais e socioeconômicos são analisados neste estudo isotópico. Tal abordagem mais integrada é importante, considerando a complexidade dos isótopos em indivíduos modernos.

O conceito de “indivíduo moderno” não é completamente esclarecido na literatura, uma vez que indivíduos de um mesmo tempo podem ser mais modernos do que outros, considerando a herança genética que carregam²⁸. No entanto, para a área Forense, indivíduos modernos podem ser todos os seres humanos do presente (vivos ou mortos), sendo o contexto recente das evidências e o ambiente muito importantes e decisivos para indicação de equipes forenses.

Em situações em que é necessária a determinação da identificação humana, destaca-se a importância do odontologista, inserido em uma equipe multidisciplinar. Além da responsabilidade que o cirurgião-dentista possui no que se refere ao exame odontológico e armazenamento de informações, o mesmo é o profissional que conhece melhor do que qualquer outro os aspectos morfológicos, estruturais e funcionais dos elementos dentários. A participação da Odontologia em análises antropológicas forenses em prol do auxílio à justiça é consagrada internacionalmente. No Brasil, a lei 12.030/2009 estabelece que são peritos de natureza criminal os peritos criminais, peritos médico-legistas e peritos odontologistas²⁹.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar a assinatura isotópica de esmalte dentário de indivíduos residentes no estado de São Paulo.

2.2 Objetivos Específicos

Visando a auxiliar na estimativa da origem geográfica de indivíduos de diferentes regiões de um mesmo estado, foi objetivo desta pesquisa caracterizar a assinatura isotópica de diferentes regiões do estado de São Paulo e verificar se os valores isotópicos são iguais entre regiões;

Também foi objetivo caracterizar a assinatura isotópica considerando classes socioeconômicas distintas e verificar se os valores isotópicos são iguais entre classes.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Definições e Símbolos

3.1.1 Isótopos

Isótopos são átomos do mesmo elemento químico, com mesmo número de prótons e elétrons, porém com número de neutros distintos. Portanto, apresentam as mesmas propriedades químicas, mas propriedades físicas diferentes, em razão das diferentes massas²⁴. Os isótopos podem ser classificados em: radioativos, radiogênicos e estáveis.

Isótopos radioativos (instáveis) são elementos que se transformam em outros elementos químicos ou em outros isótopos do mesmo elemento^{24,30,31}. Esses isótopos estão sempre buscando estabilidade, e por isso sofrem decaimento, ou seja, emitem partículas ou ondas eletromagnéticas. Esta emissão é denominada de radioatividade, a qual pode ser natural ou artificial (induzida por processo tecnológico). O número de decaimentos por minuto caracteriza a atividade de um isótopo. Já a meia-vida de um isótopo corresponde ao tempo decorrido para que sua atividade diminua pela metade.

A meia-vida dos isótopos pode variar de microssegundos até milhares de anos³¹. No contexto Forense, é interessante que um radioisótopo apresente meia-vida curta, correspondente ao intervalo post-mortem de interesse, e que seja encontrado nos tecidos humanos em quantidades suficientes para que possa ser detectado. Com a morte do indivíduo, o consumo do isótopo pelo organismo termina e tem início o decaimento do radioisótopo. Se esse decaimento é conhecido, é possível estimar o tempo da morte³¹.

Os isótopos radiogênicos são aqueles derivados de isótopos radioativos de meia-vida longa. Por exemplo, o estrôncio 87 (^{87}Sr) forma-se com o decaimento radioativo do rubídio 87 (^{87}Rb)³²; enquanto o chumbo 206 (^{206}Pb) é produto da transformação do urânio 238 (^{238}U)^{24,31}. Os isótopos radiogênicos podem ou não ser estáveis.

Por sua vez, isótopos estáveis são elementos que não se transformam, espontaneamente, em outros elementos químicos ou em outros isótopos do mesmo elemento. Por isso, recebem o nome de “estáveis”.

Os isótopos ocorrem na natureza em várias proporções^{30,33}. Não são encontrados sozinhos; estão arranjados em moléculas, que por sua vez formam estruturas supramoleculares, formadoras das células. Estas se organizam em tecidos, que constituem os órgãos e sistemas dos seres vivos.

3.1.2 Abundância isotópica

A abundância isotópica corresponde à relação entre a abundância da espécie isotópica de interesse e todas as espécies isotópicas presentes³⁰. Por exemplo, a abundância do ¹³C na molécula de CO₂ é dada por:

$$R_{13} = \frac{[^{13}\text{CO}_2]}{[^{13}\text{CO}_2] + [^{12}\text{CO}_2]} \times 100$$

$$R = \text{átomos \% } ^{13}\text{C}$$

3.1.3 Razão isotópica

A razão isotópica é a relação entre a quantidade da espécie isotópica de interesse e a quantidade da espécie isotópica mais abundante³⁰. Por exemplo, a razão isotópica de ¹³C na molécula de CO₂ é dada por:

$$r_{13} = \frac{[^{13}\text{CO}_2]}{[^{12}\text{CO}_2]}$$

$$r = \text{é adimensional}$$

3.1.4 Fator de fracionamento

Fracionamento corresponde à divisão dos isótopos entre duas substâncias ou tecidos (Hoefs 2004 apud Regan²⁴). O fator de fracionamento (α) pode ser interpretado como a variação da concentração do elemento isotópico de interesse entre duas regiões ou fases (ou seja, qualquer sistema físico, químico ou biológico) de um determinado processo³⁰. Sem o fracionamento, todos os processos biológicos seriam homogêneos.

Na natureza (atmosfera), a abundância do ^{12}C é de 98,8890 átomos% e do ^{13}C , 1,1110 átomos%. A razão isotópica entre ^{13}C e ^{12}C é de, aproximadamente, 1/99. As plantas, durante o processo de fotossíntese, incorporam o CO_2 do ar, e com este processo ocorre o fracionamento isotópico do carbono, alterando essa razão. Como existem diferentes tipos de plantas (C3 e C4, por exemplo), o fracionamento isotópico do ^{13}C ocorrerá de formas diferentes, resultando em diferentes razões, que podem ser usadas para distinguir as plantas e a dieta³⁰.

Os consumidores primários (herbívoros) alimentam-se das plantas (produtores). Neste processo também há fracionamento isotópico. Quanto maior o nível trófico, mais ^{13}C ²⁴. Diferentes tecidos de um mesmo organismo também apresentam diferenças isotópicas²⁴.

Também há fracionamento em relação ao oxigênio. Fatores como temperatura e umidade, congelamento, condensação e evaporação da água interferem nos sinais isotópicos, que serão incorporados por plantas e posteriormente pelos consumidores. Os valores isotópicos variam entre os consumidores primários (herbívoros), dependendo se são consumidores de gramas e plantas rasteiras ou consumidores de arbustos e ervas³⁴.

O estrôncio e o chumbo quase não sofrem fracionamento na natureza (é insignificante) e por isso o seu uso é bastante interessante para análise isotópica. Este fato ocorre provavelmente porque ambos possuem massas atômicas maiores²⁴.

3.1.5 Enriquecimento isotópico

O enriquecimento isotópico é a relação entre a abundância isotópica em uma amostra com a abundância isotópica de uma amostra de referência (arbitrária, mas convenientemente escolhida)³⁰. Essa relação é dada por:

$$\delta_{(amostra,padrão)} = \frac{R_{(amostra)} - R_{(padrão)}}{R_{(padrão)}}$$

O enriquecimento é dado em notação delta. Como os valores obtidos geralmente são muito pequenos para interpretação, costuma-se multiplicar a equação por 1000. Assim:

$$\delta_{(amostra,padr\tilde{a}o)} = \frac{R_{(amostra)} - R_{(padr\tilde{a}o)}}{R_{(padr\tilde{a}o)}} \times 1000$$

3.2 Aplicações

O estudo de isótopos é empregado em diversas áreas do conhecimento. É muito frequente nas ciências da terra³⁵⁻³⁶, pela sua importância em relação à nutrição de plantas, ao uso de fertilizantes no solo e aos impactos nas águas. Em Arqueologia, é utilizado como forma de inferir padrões de dieta e mobilidade³⁷, distinguir imigrantes de indivíduos nativos de determinado local (como no cemitério dos Romanos sem cabeça)³⁸, e determinar a história de vida de indivíduos pré-históricos³⁹, entre outros.

Outras aplicações incluem:

- Na área médica, os isótopos podem ser usados como traçadores para auxílio no diagnóstico de doenças⁴⁰, ou ainda para entender como os elementos químicos ocorrem no organismo em condições patológicas¹⁸;
- Estudos em Ecologia e Zoologia^{34,41-42} também se valem da análise isotópica para investigar nichos no ambiente marinho e outras questões envolvendo espécies de animais e plantas;
- Verificação da autenticidade/adulteração e rastreabilidade dos alimentos e bebidas para garantir controle e qualidade no mercado como carnes⁴³, adulteração de vinhos⁴⁴, méis⁴⁵, sucos⁴⁶ entre outros;
- Determinação da origem de narcóticos ilícitos, uma vez que é possível fazer a correspondência entre as amostras de drogas e o seu local de origem - onde foram cultivadas⁴⁷;
- Por meio da análise de isótopos de chumbo por exemplo, é possível distinguir se um projétil compartilhou uma caixa de munição comum ou ainda qual projétil causou determinado ferimento durante um tiroteio com vários tipos de armas⁴⁷;
- Análise discriminatória de isótopos em tintas e possível aplicação forense⁴⁸;
- Identificação de remanescentes humanos de guerra⁷.

No que tange às questões médico-legais envolvendo seres humanos, a aplicação do estudo de isótopos pode ser útil para estimar a origem geográfica de indivíduos modernos, informação que contribui para a construção do perfil biológico do indivíduo, sobretudo em circunstâncias em que só remanescentes humanos são

encontrados. Estas questões vêm sendo enfatizadas principalmente por conta de confrontos em fronteiras decorrentes de imigração ilegal^{26,49}. No entanto, os estudos nesta área ainda são poucos.

Baterlink e autores⁴⁹ apontam que, por conta do aumento de forças armadas nas fronteiras entre Estados Unidos (EUA) e México, houve um aumento de pessoas buscando rotas alternativas (clandestinas e perigosas) para cruzar as fronteiras. Tais tentativas levaram à morte de muitas pessoas. Entre 1998 e 2015, o número de mortes na fronteira entre USA-México variou de 5000 a 7500, e muitos desses corpos permanecem sem identificação. Muitas pessoas tentam chegar aos EUA a pé, pelo sul do estado do Texas, cruzando ranchos e terras privadas, e acabam perdidos, desidratados por causa das altas temperaturas, e doentes. Grande parte dos remanescentes sem identificação está sendo exumada, analisada e identificada, como resultado de um esforço realizado por meio de ações conjuntas entre universidades, agências de cumprimento da lei, organizações não governamentais e outros órgãos, com objetivo de repatriamento. Em alguns casos forenses nos EUA, o emprego da análise isotópica ajudou na estimativa da origem geográfica^{8,49}.

Para as questões forenses, é necessário o conhecimento de dados isotópicos de populações de vários países, levando-se em consideração, inclusive, a comparação entre diferentes regiões de um mesmo território. Fraser et al.⁵⁰ apresentaram uma tentativa de coletar informações isotópicas (C, H, O e N) de cabelos e unhas de 20 indivíduos residentes na Irlanda do Norte e as compararam com amostras de outros países, como EUA (n=13), Austrália (n=9), Síria (n=16), Sudão (n=2), Índia (n=6), Bélgica (n=6), França (n=6), Holanda (n=6) e Noruega (n=6).

Para a população mexicana, isótopos de estrôncio foram analisados a partir de dentes humanos de pessoas de várias regiões (n=19), sendo possível distinguir 3 regiões a partir deste elemento²⁶. Outros trabalhos incluíram análise combinada de isótopos de amostras da Bulgária²⁵, Holanda⁴ e Colômbia²⁷. Para algumas regiões, foi possível identificar diferenças considerando apenas um elemento químico. Porém, com a inclusão de outros elementos na análise, a distinção de locais ficou mais evidente.

3.3 Isótopos de Maior Interesse na Esfera Forense

3.3.1 Carbono

O sinal isotópico do elemento carbono reflete a preferência de alimentos consumidos por determinada população²⁵. A alimentação está relacionada principalmente ao consumo de plantas (e animais que se alimentam dessas plantas), bem como alimentação marinha.

As plantas, durante o processo de fotossíntese, transformam a energia luminosa em energia química (ATP e NADPH₂), a qual é utilizada juntamente com o CO₂, captado da atmosfera pelos estômatos, para a síntese de compostos orgânicos (carboidratos). Se o primeiro composto orgânico sintetizado contiver três átomos de carbono, estamos diante de uma planta do ciclo fotossintético C3. Por outro lado, se o primeiro composto orgânico sintetizado apresentar quatro átomos de carbono, é uma planta do ciclo fotossintético C4³⁰.

As plantas C3 possuem apenas um tipo de cloroplasto (mesofilo). O CO₂ chega até aos mesofilos por difusão. As plantas C4, por sua vez, apresentam dois tipos de cloroplastos (mesofilos e cloroplastos da bainha), e a chegada do CO₂ até essas estruturas ocorre de forma direta, não apenas por difusão³⁰.

Nas plantas, o ¹²C difunde-se mais facilmente do que o ¹³C, pois tem menor massa atômica. Ao longo dos ciclos, ocorre o fracionamento do carbono, e como existem diferenças entre os ciclos fotossintéticos dessas plantas, a concentração de ¹³C decai de forma diferente. As plantas C3 tendem a apresentar em seus compostos orgânicos sintetizados menos ¹³C que as plantas C4. Plantas C3 apresentam valores de ¹³C que variam de -20‰ a -35‰, enquanto as plantas C4, de -9‰ a -16‰^{24,30}. Estes valores não se sobrepõem, o que torna a sua utilização tão importante.

Valores intermediários a estes são relativos às plantas CAM (*crassulacean acid metabolism*), conhecidas como “plantas suculentas”. Elas fecham os estômatos durante o dia e abrem durante a noite, para fixar o CO₂ e, portanto, perdem pouca água. Algumas plantas CAM apresentam ciclos parecidos aos das plantas C4, e outras, aos das C3³⁰. No entanto, os valores isotópicos destas plantas não influenciam na dieta humana de forma significativa²⁴.

Alguns fatores podem influenciar os valores de ¹³C nas plantas. São eles: fatores ambientais (radiação solar, déficit de água, umidade do ar, salinidade,

fertilidade do solo, poluição do ar, altitude e concentração do CO₂ atmosférico) e fatores biológicos (capacidade fotossintética, variação genética, competição, forma de crescimento e ciclo de vida)^{30,51}.

As plantas C3 compreendem mais de 95% da vegetação da terra, enquanto as plantas C4 compreendem menos de 5%⁴⁹.

O quadro 1 apresenta alguns exemplos dos três tipos de plantas acima citados.

Quadro 1– Plantas segundo tipo de ciclo fotossintético

Tipos de plantas	Exemplos
Plantas C3 (dicotiledôneas)	Arroz, feijão, ervilha, amendoim, soja, trigo, cevada, frutas, hortaliças, beterraba, mandioca, alfaça, castanhas, e comida processada derivada desses itens mencionados.
Plantas C4 (monocotiledôneas)	Milho, cana-de-açúcar, milheto, sorgo, gramíneas.
Plantas CAM (suculentas)	Cacto, abacaxi, bromélias.

Fonte: Adaptado de Ducatti³⁰.

O fracionamento do carbono dependerá do nível trófico da cadeia alimentar. Dessa forma, consumidores secundários (carnívoros) apresentam razões mais elevadas do que consumidores primários (herbívoros) e produtores⁶. Mas essa diferença não é tão grande se comparada ao nitrogênio. Quanto mais alto na cadeia alimentar, mais isótopo pesado de nitrogênio (¹⁵N) haverá no organismo.

A alimentação marinha também fornece informações isotópicas em relação ao carbono. A grande fonte de carbono desses produtos é proveniente do bicarbonato dissolvido no oceano, resultando em valores de ¹³C mais positivos do que as plantas C4⁴⁹. Alimentação marinha fornece valores de ¹³C mais altos do que alimentação terrestre⁵². Mamíferos marinhos e peixes apresentam valores de ¹³C enriquecidos em 6‰ em relação aos animais que possuem alimentação à base de C3, e valores empobrecidos em 7‰ em relação aos animais que se alimentam de C4. Porém, melhores indicadores de carbono são obtidos quando associados aos valores de nitrogênio²⁴.

O fumo também aumenta os valores de carbono e nitrogênio no organismo. O tabaco é uma planta C3, e indivíduos fumantes apresentam um alto metabolismo (perdem peso corporal) que, associado à baixa ingestão de alimentos (redução de apetite por conta do cigarro), pode afetar a assinatura isotópica⁹.

3.3.2 Oxigênio

Os tecidos humanos refletem os sinais de oxigênio do ar atmosférico, da água e do oxigênio presente nos alimentos. Em razão dos valores do oxigênio do ar atmosférico serem constantes, acredita-se que a principal forma dos tecidos incorporarem este elemento, durante o seu período de formação, seja pela ingestão de água e, em menor proporção, pelos alimentos, bem como pelo oxigênio inalado^{11,24,32,53-54}.

A água ingerida/consumida, por sua vez, reflete a composição isotópica da água meteórica (chuva) e do clima. A água meteórica varia de acordo com a localidade e o tempo. A composição isotópica da água da chuva depende de uma série de fatores ambientais: latitude (conforme a latitude aumenta, as razões de ^{18}O diminuem), altitude (maiores altitudes também estão relacionadas ao empobrecimento de ^{18}O), se é região costeira (quanto mais longe da costa (mais interior), menos enriquecido em ^{18}O), quantidade de precipitação, temperatura do ar (regiões com maiores temperaturas apresentam maior enriquecimento em ^{18}O) e estação^{32,55-56}.

A água do subsolo reflete os componentes isotópicos da água meteórica local, porém, diferenças podem ocorrer por conta de vários fatores: evaporação, misturas com águas do tipo não meteórica (salmouras, água do mar ou “água juvenil” = água magmática), fracionamento durante a movimentação da água no solo/aquífero, trocas durante a formação geológica, reposição/trocas de rios que possuem águas derivadas de precipitação de altas altitudes⁵⁵. A água ingerida/consumida é derivada da água do subsolo. A água bebida e dos alimentos, portanto, reflete o clima local. Desta forma, se a composição isotópica de oxigênio da água meteórica (água da chuva) de uma determinada região for diferente de outras regiões, se a água potável consumida por um grupo/comunidade for local e se a composição isotópica dessa água potável também for conhecida, é possível verificar a mobilidade geográfica (caso existente) de um indivíduo, a partir de seus tecidos, como os dentes³².

Por outro lado, diversos fatores podem interferir nos valores de ^{18}O da água consumida. Comportamentos culturais em relação ao manejo da água ingerida, por exemplo, é um desses fatores. Estes comportamentos compreendem a fervura da água, cozimento, infusão e vinificação, entre outros, bem como hábitos de grelhar e defumar¹⁹. Tais práticas favorecem a evaporação de isótopos mais leves, resultando no enriquecimento de ^{18}O na água. Assim, tais práticas podem resultar em confusão durante a estimativa da origem geográfica de um indivíduo, pois valores mais enriquecidos em ^{18}O podem ser associados a locais que apresentam temperatura ambiente mais elevada (próximos à linha do Equador)¹¹.

Consumo de leite (de origem humana, como leite materno, ou mesmo animal) também parece interferir no valor de ^{18}O dos tecidos, uma vez que os valores de água no leite são mais enriquecidos do que a água ingerida^{19,57}. Além disso, a pasteurização do leite também tende a alterar os valores isotópicos⁵⁷. Outro fator é a alimentação, que pode contribuir com a variabilidade dos valores de ^{18}O entre os indivíduos. Alguns alimentos (vegetais) apresentam mais água em sua composição do que outros (cereais, arroz, lentilha). Plantas e carnes são mais enriquecidas em ^{18}O do que a água da chuva⁵⁸. Alimentos que dependem de cozimento (como arroz, carne vermelha e peixe) apresentam mais ^{18}O por causa do processo de cozimento. Portanto, o consumo destes alimentos resultará no aumento do ^{18}O da água total da pessoa. O sinal isotópico de ^{18}O no corpo humano tende a ser maior que o da água¹¹. Segundo Daux et al.⁵⁸, o enriquecimento máximo em ^{18}O da água total comparada com a água ingerida é 2‰ (cerca de 1,1‰ no esmalte dentário humano).

Os valores de ^{18}O dos tecidos (carbonatos e fosfatos) estão relacionados principalmente com a água consumida. Porém, os valores de ^{18}O podem ser bem variáveis nos indivíduos, pois fatores como atividade física, idade, taxa metabólica e doenças também podem influenciar no fracionamento isotópico do oxigênio em humanos⁵⁹.

A análise de ^{18}O pode ser feita na porção de carbonato ou fosfato das bioapatitas. Estima-se que a porção de carbonato das apatitas seja mais enriquecida em ^{18}O do que a porção de fosfato, e que exista uma forte correlação positiva entre o ^{18}O do fosfato e o ^{18}O do carbonato⁵³. O fosfato existe em maior quantidade que o carbonato (é a principal fonte de ^{18}O) e é menos susceptível às alterações advindas da diagênese (a ligação P-O é muito mais forte do que C-O)⁵⁴. Além disso, a relação – praticamente linear - entre ^{18}O do PO_4 e ^{18}O da água já está mais estabelecida na

maioria dos mamíferos - incluindo os seres humanos^{15,54}. No entanto, a mensuração de ^{18}O no fosfato é bem problemática, pois não há uma gama de materiais certificados de referência, há possibilidade de viés metodológico e as análises são complexas e demoradas⁵⁴. Já os carbonatos apresentam a vantagem de a análise ser simples, mais rápida e mais barata, além de possibilitar a análise de ^{13}C referente à dieta^{53-54,60}. De qualquer forma, é possível converter valores de carbonato em fosfato por meio da equação⁵⁴: $\delta^{18}\text{O}_{\text{PO}_4} = 1,0322 * \delta^{18}\text{O}_{\text{CO}_3} - 9,6849$.

Pelo fato dos valores de ^{18}O da água serem estimados a partir dos valores de ^{18}O dos tecidos, devido à relação linear que as variáveis apresentam, várias equações de conversão (equações de regressão) para esta estimativa foram desenvolvidas. Estimativas de ^{18}O da água a partir de carbonatos podem ser alcançadas por meio da equação: $\delta^{18}\text{O}_W = 1,590 * \delta^{18}\text{O}_{\text{VSMOW C}} - 48,634$, para dados de climas frios, temperados e quentes e úmidos, onde $\delta^{18}\text{O}_W$ equivale a composição isotópica da água ingerida e $\delta^{18}\text{O}_C$ equivale à composição isotópica do carbonato do esmalte⁵⁴. Estimativas de ^{18}O da água a partir de fosfatos de tecidos humanos (ossos e dentes) podem ser obtidas por equações como as mencionadas em Daux et al.⁵⁸: $\delta^{18}\text{O}_W = 1,54 (\pm 0.09) * \delta^{18}\text{O}_{\text{VSMOW P}} - 33,72(\pm 1.51)$ ou em Pollard et al.¹⁵.

Entretanto, alguns autores^{15; 38; 60} não recomendam esta transformação, devido a eventuais erros de propagação associados à conversão, culminando em intervalos de confiança muito amplos. Erros de estimativa muito superiores ao esperado foram obtidos para todas as equações testadas por Pollard et al.¹⁵, levando a estimativas de origem geográfica imprecisas. Os autores mencionam que para utilizar tais conversões é preciso que várias mensurações sejam feitas para uma mesma observação, para se trabalhar com valores médios, os quais ajudam a reduzir o valor do erro associado à conversão. Uma sugestão dos autores, em alternativa ao uso de tais conversões, é o uso dos próprios valores de $\delta^{18}\text{O}_{\text{PO}_4}$ para a estimativa do local de origem. Apesar de também haver um erro associado, este é tipicamente menor. No entanto, para tal abordagem, é preciso uma amostragem bem planejada, a qual inclui grandes quantidades de amostras de $\delta^{18}\text{O}_{\text{PO}_4}$. Assim, a variação da magnitude de valores $\delta^{18}\text{O}_{\text{PO}_4}$ pode ser obtida, a qual é necessária principalmente para populações “estacionárias”, para servirem de referência. Estes valores de intervalos, porém, são ainda escassos³⁸.

Geralmente tais equações são criadas para determinadas amostras (de um dado local), e os pesquisadores acabam criando uma série de equações para a região

de interesse no estudo. Isso porque são esperadas variações para populações modernas, decorrentes do consumo de alimentos mais globalizados ou vindos de outros lugares; além disso, depende também da disponibilidade de água e amostras, e até mesmo do tipo de tecido utilizado¹¹.

É recomendado que a análise isotópica de oxigênio seja feita em associação a outro elemento químico porque algumas práticas, como amamentação ou até mesmo o processo de fabricação de bebidas e alimentos, como já citado anteriormente, podem alterar a proporção isotópica original da água ingerida³². Além disso, existe muita variação nos valores isotópicos de ^{18}O , o que acarreta *overlaps* entre regiões⁶⁰.

Segundo Coplen⁶¹, a reunião do Grupo sobre Amostras de Referência de Isótopos Estáveis para Investigações Geoquímicas e Hidrológicas, patrocinado pela Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA) recomendou, em 1983, que os valores de ^{18}O fossem normalizados, pois os valores “permil” entre duas amostras podem ser diferentes quando determinados em equipamentos diferentes, ou ainda no mesmo equipamento, porém com configurações diferentes. O ^{18}O deve ser expresso com base no padrão Vienna standard mean ocean water (VSMOW) ou Pee Dee Belemnite (VPDB), em escalas normalizadas.

Pela análise do fosfato de esmalte de indivíduos modernos, verificou-se que a maioria dos indivíduos na Europa apresenta amplitudes de valores isotópicos de ^{18}O bem variadas, e um indivíduo com valores entre 16-17‰, poderia, teoricamente, ter nascido em qualquer região da Europa (existe um *overlap* de valores). Isto pode acontecer porque as pessoas podem ter acesso a uma mesma fonte de água. Porém, fatores de comportamento e fisiologia interferem para maiores variações (amplitude). Ainda, as áreas da Europa estudadas apresentam valores de oxigênio de precipitação bem semelhantes. Até mesmo olhando para dentro de uma determinada região, com valores de amplitude menores, erros podem ocorrer se não houver a caracterização total da variabilidade em extensão. Em amostras maiores, diferenças pequenas, mas significantes, foram encontradas entre grupos de indivíduos de leste a oeste do Reino Unido, sugerindo que diferenças existem entre regiões territoriais pequenas. A técnica isotópica funciona melhor para áreas com precipitação diferente e com amostras de tamanho suficiente⁶⁰.

3.3.3 Nitrogênio

O ^{15}N fornece informações sobre o nível trófico na cadeia alimentar. Conforme o nível trófico vai subindo, há um aumento de cerca de 3‰ nos valores de ^{15}N . O efeito do nível trófico é resultado da perda de ^{14}N durante a quebra de proteínas e excreção de nitrogênio, provocando essa compensação entre nitrogênio da dieta e nitrogênio do colágeno⁵². Logo, animais carnívoros apresentarão maiores valores de ^{15}N do que herbívoros/vegetarianos/veganos.

A análise do ^{15}N associada à do ^{13}C é útil para identificar indivíduos que apresentam uma dieta muito diferenciada dentro de uma população⁴⁹. A ingestão de muita carne e alimentos do mar indicará valores mais altos para ^{15}N ⁹. No entanto, os valores de ^{15}N também podem sofrer interferências dependendo da saúde do indivíduo. Pessoas desnutridas (inanição) ou que sofrem de anorexia ou alguma outra forma de privação alimentar tendem a apresentar valores muito altos de ^{15}N , indicando o consumo cada vez maior de proteínas do próprio corpo⁸, além de baixos valores de ^{13}C ⁶².

3.3.4 Estrôncio

O estrôncio é um elemento bastante usado em Arqueologia para verificar a mobilidade de indivíduos pré-históricos^{24,32}. É um elemento diretamente associado à distinção geográfica²⁶. Existem quatro isótopos de estrôncio: ^{88}Sr , ^{87}Sr , ^{86}Sr e ^{84}Sr ; no entanto, apenas ^{87}Sr é resultante de decaimento radioativo do elemento ^{87}Rb (rubídio), sendo, portanto, um elemento radiogênico. Na área Forense, é mais comum o estudo da razão $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ ⁸.

A abundância do Sr depende do tipo de rocha, da idade da rocha, da quantidade de Sr original e da quantidade de Rb. Formações geológicas mais antigas são mais enriquecidas em Sr do que solos recentes. Solos ricos em cálcio também são mais enriquecidos em Sr do que os solos pobres em cálcio. Fatores antropogênicos, como poluição e contaminação do ambiente por combustíveis fósseis, também influenciam os sinais de Sr ^{24,63}.

O Sr é incorporado no organismo principalmente pela cadeia alimentar (alimentação sólida ou líquida), e percorre o mesmo caminho do Ca. O Sr da água usada para cozimento também é incorporado nos alimentos durante o preparo⁶⁴. A

absorção do Sr ocorre pela via gastrointestinal, e sua eliminação pelo organismo se dá principalmente pela urina⁶⁵. Uma vez absorvido pelo organismo, o estrôncio do plasma sanguíneo é incorporado aos tecidos ósseos por substituição iônica (do cálcio) ou por trocas de superfície, mas somente uma porção muito pequena de cálcio (na apatita) é substituída por estrôncio⁶⁵. A concentração (absorção) de estrôncio será maior nos ossos onde existir um maior fluxo sanguíneo (e, portanto, onde o *turnover* ósseo é maior), como é o caso do osso esponjoso em relação ao cortical⁶⁵. A taxa de remodelação (*turnover*) do osso cortical de um humano adulto dura entre 10 e 30 anos (dependendo do osso). Logo, um determinado osso apresenta valores de Sr equivalentes a 20 ou 30 anos de incorporação desse elemento. Já o esmalte dentário incorpora Sr somente durante o período de sua formação e, diferentemente dos ossos, não sofre remodelações ou grandes influências diagênicas²⁶.

Por meio do Sr é possível diferenciar elementos de dieta vegetal e carnívora²⁴. Conforme aumenta o nível trófico na cadeia alimentar, a incorporação de Sr do solo nos tecidos vai diminuindo. Isto ocorre porque existe uma diferença metabólica no epitélio de mamíferos para o Sr²⁴. Teoricamente, então, seria possível distinguir uma pessoa vegana de outra que se alimenta de proteínas e gorduras. No entanto, é preciso ter cautela, e levar vários fatores em consideração, tais como a variação da química do solo que influencia a absorção de Sr pela planta, a diferenciação fisiológica dos indivíduos, bem como mudanças comportamentais nas estratégias de alimentação e práticas culturais²⁴.

Apesar do estrôncio ser um isótopo de referência para fauna e ambiente em estudos Antropológicos, para indivíduos modernos o fator dieta moderna e alimentos embalados pode confundir os valores isotópicos de um determinado grupo local²⁶, fazendo com que a razão $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ varie bem menos nas populações modernas^{6,25}. Estima-se que a relação de Sr entre o organismo e o ambiente seja 1:1, ou seja, os valores podem ser comparados diretamente. O grande problema é que não há muita referência sobre a variação do Sr no ambiente, e menos ainda em organismos humanos⁸.

3.3.5 Chumbo

O chumbo possui quatro isótopos que ocorrem naturalmente: ^{204}Pb , ^{206}Pb , ^{207}Pb e ^{208}Pb . Os três últimos são radiogênicos, formados pelo decaimento radioativo

do urânio (^{238}U , ^{235}U) e tório (^{233}Th), respectivamente. O ^{204}Pb não é radiogênico e, portanto, serve como isótopo estável de referência^{6,24}. Assim como o Sr, o Pb não sofre fracionamento significativo na natureza.

O chumbo é assimilado de forma semelhante ao Sr, na medida em que se acumula do sangue através de caminhos de cálcio e pode ser substituto de cálcio na fração de hidroxiapatita de carbonato de tecidos duros. Os indivíduos jovens apresentam uma maior propensão para absorver o chumbo do que os adultos provavelmente devido à modelagem rápida do osso que ocorre durante a fase de crescimento e porque as crianças pequenas tendem a colocar objetos na boca frequentemente. Considera-se que as partículas de chumbo entram no corpo através da ingestão, seja através de alimentos e fluidos ou objetos de chumbo, ou inalação. A contaminação ambiental por chumbo é encontrada através de operações de mineração, lixões, emissões de fundição de chumbo, combustão de carvão e gasolina com chumbo. Além disso, a chuva ácida pode transmitir contaminação de emissões / combustão em grandes distâncias²⁴.

O Pb está associado à distinção geográfica, e qualquer mudança no ambiente pode ser detectada por meio de seus valores, dependendo do tecido biológico avaliado. Os padrões de Pb no sangue de pessoas, por exemplo, que imigraram para a Austrália, mudaram para as concentrações de Pb do local muito rapidamente (nos primeiros 3 – 6 meses residindo no local) segundo estudo de Gulson e Gillings⁶⁶.

3.3.6 Análise combinada

Kamenov et al.²⁵ sugerem que dificilmente a localidade de um indivíduo será distinguida com base apenas nos valores de ^{13}C e consequentemente com base nas preferências alimentares das pessoas. Isso porque vários países apresentam valores de ^{13}C semelhantes - dados estes obtidos principalmente por meio de estudos com cabelo. Portanto, com valores de ^{13}C , é possível distinguir grandes geo-referências: uma primeira grande região englobaria dados de ^{13}C de indivíduos da Europa, Ásia, Austrália e norte e oeste da África, o quais apresentam geralmente valores baixos de ^{13}C ; a segunda grande região envolveria indivíduos principalmente dos EUA, com valores de ^{13}C moderados; e, por fim, a terceira região incluiria México, América Central, América do Sul e sul e leste da África, apresentando valores mais altos de ^{13}C .

Quando se considera o ^{18}O , as possibilidades de estimar o local de origem ficam mais fortes. Kamenov et al.²⁵ afirmam que, apesar de haver alguns *overlaps*

entre países, é provável que indivíduos da Austrália, África e Oriente Médio apresentem valores de ^{18}O mais altos, comparados à Bulgária, por exemplo, e que o Canadá apresente valores mais baixos. Adicionando ainda análises de $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$, outros países podem ser excluídos das análises (para uma possível vítima da Bulgária, o México foi excluído, mas países da Europa não foram). A adição do Pb à análise de C-O-Sr também é fundamental, pois o Pb parece ser um importante elemento na distinção de regiões.

O uso de isótopos estáveis para mapeamento geográfico em Ciências Forenses pode ser conduzido de duas maneiras²⁵. A primeira é criando banco de dados de vários isótopos (como C, O, Sr e Pb) de tecidos de indivíduos modernos de diferentes localidades do mundo. A segunda forma é pela criação de mapas isotópicos a partir de rochas, solos e águas também de diferentes locais do mundo.

No que se refere ao Sr, a criação de mapas isotópicos a partir de rochas, solos e águas, para diversos territórios, pode ser muito útil para estudos de Arqueologia e estudos ecológicos modernos. Porém, para estudos forenses de geo-referenciamento humano, esses mapas parecem não ser muito práticos, pois os valores de Sr nos tecidos humanos não são influenciados apenas pelo Sr da água, do solo e das rochas, mas também por outras fontes como a alimentação importada de outras regiões. Este fato foi detectado no estudo de Kamenov et al.²⁵, em que os sinais isotópicos de Sr das amostras de água coletadas na Bulgária corresponderam aos sinais já esperados para a região. Porém, os sinais isotópicos de Sr do esmalte de indivíduos que nasceram e cresceram na região não foram correspondentes. O mesmo aconteceu no estudo de Keller et al.⁶ para indivíduos americanos: os EUA possuem um mapeamento de Sr para todo território a partir de solos, rochas e água, porém, os sinais isotópicos de americanos modernos também não correspondem aos sinais esperados. Além disso, a variação de Sr entre regiões foi menor do que dentro de uma mesma região (local), fazendo do Sr um elemento não tão útil. Assim, a melhor forma de caracterizar sinais isotópicos de Sr de indivíduos modernos para fins forenses é por meio da criação de bancos de dados a partir de amostras teciduais desses indivíduos modernos, ou seja, de origem conhecida.

Por outro lado, o mapeamento do isótopo ^{18}O da água ingerida pode ser bem útil para estudos forenses, uma vez que Kamenov et al.²⁵ apresentaram evidências de que os sinais de ^{18}O do esmalte corresponderam ao esperado para o ^{18}O da água, assim como no estudo de Keller et al.⁶ para os americanos, em que compararam

isoscapas de ^{18}O da água com *isoscapas* de ^{18}O de origem humana. Porém, os autores frisaram que os sinais isotópicos da água não são únicos para um determinado local, podendo existir diferentes regiões com os mesmos sinais de ^{18}O na água.

Em relação ao Pb, poucos são os estudos com tecidos de indivíduos modernos e, portanto, é difícil dizer se determinado sinal de alguma população é realmente único. O que se tem mostrado na literatura é que os valores de Pb estão associados ao solo, porém os valores de Pb no solo se modificam por conta dos fatores antropogênicos. Kamenov et al.²⁵ colocam um exemplo: na década de 1970, o uso de gasolina com chumbo estava no auge, porém, hoje em dia, o nível de poluição por Pb diminuiu, e isso refletiu na composição do solo. Portanto, a coleta de solo da atualidade pode não refletir os sinais de tecidos humanos (indivíduos vivos na atualidade com cerca de 40 anos ou mais, por exemplo). Da mesma forma, dados arqueológicos de indivíduos antigos não correspondem aos sinais isotópicos de indivíduos atuais. Assim, é importante a criação de dados a partir de tecidos de indivíduos modernos.

3.4 Tecidos Humanos Mais Utilizados na Análise Isotópica

As concentrações isotópicas nos tecidos podem variar segundo o tipo de tecido e as fases da vida^{33,67}. Os tecidos mais comuns disponíveis para análise isotópica em Antropologia Forense incluem ossos, dentes, cabelo, pele e unhas. Cada um apresenta pontos positivos e negativos, registrando dieta e origem de diferentes fases da vida do indivíduo.

3.4.1 Ossos

Os ossos são as estruturas mais utilizadas na análise isotópica forense²⁴. São estruturas de origem conjuntiva - compostas por uma porção inorgânica (apatitas), uma matriz orgânica rica em colágeno, e água⁶⁸.

Possuem uma taxa de remodelação entre 10 e 30 anos. Alguns ossos remodelam-se mais rapidamente que outros, no mesmo organismo. O osso trabecular, por exemplo, remodela-se mais rapidamente do que o cortical. Portanto, à medida em que o indivíduo incorpora isótopos por meio da alimentação, ao longo da

vida, os valores isotópicos nos tecidos ossos vão sofrendo mudanças²⁴. Essas mudanças ocorrem lentamente ao longo da vida.

Na análise isotópica dos ossos, geralmente se utilizam as apatitas e o colágeno. As apatitas são os minerais dos tecidos esqueléticos. São um hexágono, geralmente de fosfato de cálcio, o qual é formado por 4 elementos essenciais: cálcio, fósforo, oxigênio e íons que podem variar (grupo hidroxila, fluoretos, cloretos etc).

A hidroxiapatita é um tipo de apatita que forma cristais. É composta por íons cálcio, fosfato e hidroxila: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Para formar a hidroxiapatita é preciso íons cálcio e fosfato no sangue. A mineralização dos tecidos ósseos ocorre com células formadoras de matriz orgânica (osteoblastos, condroblastos, odontoblastos) e matriz colágena⁶⁸. Estas células secretoras de matriz orgânica desenvolvem em suas membranas uma espécie de “bulbo” que vai se destacando em direção à matriz. Estas estruturas são chamadas de vesículas da matriz. As vesículas contêm enzimas que liberam fosfato, e suas membranas possuem macromoléculas que se ligam aos íons cálcio. Íons cálcio e fosfato vão então se acumulando nas vesículas da matriz e se precipitam na forma de fosfato de cálcio (cristais). A mineralização ocorre com a deposição de cristais de fosfato de cálcio (cristais em formato de agulha) dentro dessas vesículas. Esta fase é chamada de fase vesicular da mineralização. Os cristais de dentro das vesículas vão crescendo em número e tamanho para fora das mesmas, adentrando a matriz orgânica. Os cristais se ligam às fibras/fibrilas colágenas da matriz, e a mineralização segue de forma independente. Os cristais impregnam as fibras e fibrilas e as regiões interfibrilares e esta fase recebe o nome de fase fibrilar da mineralização. Essas duas fases ocorrem para ossos e dentina, inclusive quando há formação nova de osso e dentina reparadora⁶⁸.

Além da hidroxiapatita, outros arranjos (outras apatitas) existem. Um exemplo é a substituição dos íons fosfatos por carbonatos. A partir desses carbonatos de apatita nos ossos é possível verificar a assinatura isotópica para o ^{13}C . O osso é mais enriquecido em ^{13}C do que o plasma²⁴.

Já o colágeno é a proteína mais abundante na matriz orgânica do osso. É importante, pois também reflete a dieta do indivíduo, por meio de isótopos de ^{15}N presentes em seus componentes. O grande problema do uso do colágeno é que ele se degrada com o tempo, o que não acontece com as apatitas²⁴.

3.4.2 Dentes

Os dentes são as estruturas mais rígidas do corpo, sendo capazes de resistir a diversas condições, inclusive a altas temperaturas. O esmalte dentário tem origem epitelial (ectoderma). É acelular, altamente friável e com alta dureza (devido à sua composição – aproximadamente 97% mineral, 1% material orgânico e 2% de água), bastante cristalino (translúcido) e pouco poroso⁶⁸. Já a dentina tem origem conjuntiva (células mesenquimais). A dentina é composta por mais matéria orgânica e água do que o esmalte (aproximadamente 70% mineral, 18% material orgânico e 12% de água). A função da dentina é sustentar o esmalte, servindo de amortecedor, diminuindo assim o risco de fraturas⁶⁸.

Assim como nos ossos, a estrutura inorgânica dos dentes é composta por apatitas, que formam cristais. Na dentina, os cristais são menores – assim como nos ossos - e, portanto, há maior reação e solubilidade, comparadas ao esmalte. Assim, os ossos e a dentina são mais susceptíveis a alterações post-mortem (diagênese). Já o esmalte tem cristais maiores e, portanto, é mais estável a alterações post-mortem e com isso tem maior capacidade de preservação^{69,70}.

Os constituintes da bioapatita do esmalte e da dentina variam em relação a concentração e estrutura, e podem ser vistos na tabela 1.

Tabela 1 – Constituintes da bioapatita do esmalte e da dentina

Constituintes	Esmalte	Dentina	Cemento	Polpa	Osso
Água	1,5-3,5%	10,6-13,5%	20%	90%	8,7%
Sólidos					
Minerais	96-97%	65-70%	45%	1%	65%
Orgânicos	0,5-1%	18-20%	35%	9%	25%
Minerais					
Cálcio, Ca^{2+}	36%	26-27%	16%	*	24,5%
Fosfato, PO_4^{3-}	17,7-18%	13%	8%	*	10,5%
Carbonato, CO_3^{2-}	2,3-3%	3-4,5%	6%	*	5,8%
Magnésio, Mg^{2+}	0,44-0,5%	0,8-1,1%	0,5%	*	0,55%
Sódio, Na^+	0,4-0,5%	0,3-0,4%	0,4%	*	0,7%
Potássio, K^+	0,08-0,2%	0,05-0,2%	0,1%	*	0,03%
Flúor, F^-	0,01%	0,02-0,05%	0,05%	*	0,02%
Cloro, Cl	0,3	0,01	0,0	*	0,1%
Outros elementos (Pb, Fe, Zn, Cu, Sr etc...) apresentam taxas muito reduzidas					
Índice de cristalinidade	70-75	33-37	...	...	33-37
Tamanho dos cristais	1300x300A	200x40A	...	-	...
Orgânicos					
Proteínas	0,3%	20%	32%	**	...
Citrato	0,1%	1%	1,5%	**	...
Triglicerídeos	0,05%	0,4%	0,8%	**	...
Colesterol	0,01%	0,01%	0,6%	**	...
Fosfolipídeos	0,01%	0,01%	0,01%	**	...
Glicose	0,001%	0,001%	0,001%	**	...

*Soma total dos minerais da polpa é de 1%.

**Soma total dos componentes orgânicos é 9%.

Fonte: Adaptado de LeGeros⁷¹ e de Aranha²².

Além disso, também há uma variação desses constituintes da bioapatita dentro de um mesmo tecido. Por exemplo: a concentração dos elementos na superfície do esmalte difere da existente na junção amelodentinária⁷¹⁻⁷² e na junção cimento-esmalte⁷².

O esmalte dentário é composto principalmente por cristais de hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, porém outros arranjos também existem. Ânions como F^- e Cl^- são conhecidos por substituírem o OH^- , ânions como CO_3^{2-} , HPO_4^{2-} substituem o PO_4^{3-} , e cátions como Sr^{2+} , Pb^{2+} , Ba^{2+} substituem o Ca^{2+} .

A substituição do OH pelo F culmina na estrutura chamada de fluorapatita: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{F})_2$. Esta substituição promove uma contração dos eixos da estrutura da bioapatita de forma que a mesma se torne mais estável. Promove ainda um aumento da cristalinidade da bioapatita, sugerindo um crescimento dos cristais. Esta estabilidade é manifestada pela resistência à solubilidade e à decomposição térmica. A incorporação de F na bioapatita de ossos e dentes está relacionada à ingestão de água fluoretada e alimentos durante a formação desses tecidos⁷¹.

A cloroapatita é a apatita formada pela substituição do OH pelo Cl: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{Cl})_2$. A concentração do Cl nos tecidos dentários é bem pequena, e aparentemente há uma discriminação da apatita na incorporação deste íon⁷¹.

O carbonato CO_3^{2-} é outro íon presente nos tecidos mineralizados. O CO_2 , por exemplo, dissolvido no plasma sanguíneo, reage com a água formando o ácido carbônico, que logo se dissocia, transformando-se em íons bicarbonato e H^+ . O bicarbonato, em condições mais alcalinas ($>\text{pH}$) forma o carbonato⁷².

Nos tecidos duros, o carbonato pode estar presente em forma de calcita ou aragonita (CaCO_3), dolomita ($(\text{Ca,Mg})\text{CO}_3$) ou magnesita (MgCO_3). O íon carbonato também pode ser substituinte na estrutura da apatita (carbonatoapatita). Os carbonatos que substituem os grupos hidroxila são chamados de carbonatos do tipo A, e os que substituem os íons fosfato, tipo B⁷¹. Estas substituições levam a alterações na estrutura hexagonal da apatita (contração ou expansão dos eixos) e, conseqüentemente, a diferenças nas propriedades físico-químicas. As carbonatoapatitas do tipo A são mais resistentes à decomposição por temperatura do que as do tipo B⁷¹. Os carbonatos não somente substituem os grupos fosfatos e hidroxila, mas também são incorporados à superfície dos cristais⁷¹.

A partir dos carbonatos de apatita é possível verificar a assinatura isotópica para o ^{13}C . Há uma maior concentração de carbonato na dentina e nos ossos em relação ao esmalte⁷¹.

Ainda em relação aos substituintes iônicos da estrutura da apatita nos tecidos, cátions monovalentes como sódio (Na^+), potássio (K^+), lítio (Li^+) e bivalentes como estrôncio (Sr^{2+}), bário (Ba^{2+}), chumbo (Pb^{2+}), magnésio (Mg^{2+}) podem ser substituintes do cálcio (Ca^{2+}), além de outros íons tri ou multivalentes. As substituições geralmente são dependentes das variações de pH e temperatura, e algumas acontecem em maior extensão do que outras⁷¹.

O componente fosfato PO_4^{3-} é bem estável, pois suas ligações iônicas são mais fortes, o que implica em uma resistência maior aos efeitos da diagênese e alterações isotópicas frente às diferenças de temperatura.

No que se refere à formação do esmalte dentário, existem diferentes métodos para estudá-la. Grande parte dos estudos envolve o registro por meio da análise visual de erupção dos dentes na cavidade oral e pelo estudo dos estágios de mineralização por meio de radiografias. Estas duas formas podem produzir uma alta variabilidade nos dados de cronologia de desenvolvimento: para o primeiro método, por exemplo, as diferentes formas de observação e registro podem ser os motivos do relato de alta variabilidade e em relação às radiografias, a ausência de definição clara dos estágios/setores de mineralização bem como a qualidade de resolução da imagem.

A análise histológica é uma outra forma de análise do desenvolvimento do esmalte e, diferente das demais formas, permite um registro mais acurado⁶⁹. Suas desvantagens são: grande tempo despendido para as análises, é um método que causa a destruição das amostras e ainda o número amostral, que por ser baixo, acaba sendo uma limitação. O estudo de Reid e Dean⁶⁹ utilizou análise histológica para o estudo da formação cronológica do esmalte dentário de 326 molares e 352 dentes anteriores (todos permanentes) referentes a diferentes populações (europeus modernos, africanos do sul modernos, norte americanos modernos e uma população medieval). Os autores verificaram que a variabilidade foi bem menor do que aquelas reportadas por estudos conduzidos com radiografias.

A cronologia de formação e erupção do esmalte é bem específica⁷³. Devido à sua estrutura, o esmalte representa grande interesse para análise isotópica, pois resiste bem aos efeitos da diagênese. Ele é capaz de reter a informação isotópica da época de sua formação (amelogênese), e não sofre remodelação ao longo do tempo³².

A composição isotópica do esmalte, então, reflete a dieta do indivíduo ou os sinais biogeoquímicos do local onde foi formado (durante a amelogenese). Portanto, cada dente/grupo de dentes representa o conteúdo isotópico de um período/fase da vida do indivíduo. O esmalte do primeiro molar permanente, por exemplo, registrará informações do nascimento do indivíduo até quando estiver na fase de começar a andar; os incisivos e caninos registrarão informações da infância; já os terceiros molares guardarão informações do final da infância e início da adolescência.

A dentina, por outro lado, apresenta maior conteúdo orgânico. Está estruturada em dentina primária (dentina do manto e dentina circumpulpar), a qual é formada até o fechamento do ápice; dentina secundária, com início de formação após a formação do ápice e depositada durante toda a vida do indivíduo (em um período mais lento); e a dentina terciária (dentina reparativa e dentina reacional)⁶⁸, formada mais recentemente por odontoblastos e células indiferenciadas da polpa. Por apresentar mais conteúdo orgânico, a dentina está relacionada ao conteúdo isotópico da dieta proteica. Sendo assim, não é possível analisar nitrogênio a partir do esmalte, mas sim a partir da dentina²⁴.

A formação e mineralização do esmalte ocorre no sentido de dentro para fora. A mineralização do esmalte ocorre com a deposição de uma matriz rica em proteína (fase secretora), e gradualmente vai mineralizando (fase de maturação). Já a formação da dentina ocorre de fora para dentro, concomitantemente ao esmalte. Para a análise isotópica destes tecidos, é possível utilizar várias camadas do esmalte ou da dentina (compondo um valor médio), ou estratos específicos de cada estrutura - cada estrato representando um período muito bem definido de formação, o que exige habilidade de remoção/isolamento da amostra⁷². Essas duas formas de extração de material foram testadas em dentes de animais para análise isotópica⁷². Os autores encontraram diferenças entre as duas formas de amostragem. Concluíram que o método de amostragem global não corresponde aos valores médios do método seriado, pois representa apenas a superfície do esmalte; já o método seriado não consegue envolver todo intervalo referente a variação isotópica que o dente fornece. A causa para explicar a diferença encontrada entre as duas técnicas permanece desconhecida. Os autores recomendam que, para tentar representar todo o esmalte, é necessário coletar esmalte em toda profundidade do mesmo e em toda extensão do dente. Porém, tal estratégia representa um problema para materiais arqueológicos, em que apenas partes de dentes são encontradas ou, devido à necessidade de

preservação de coleções, são autorizadas coletas de parte do esmalte. Sugerem cautela na comparação de dados com a literatura, uma vez que a forma de amostragem pode diferir.

Conforme já mencionado, o ^{18}O pode ser analisado a partir de íons fosfato ou carbonato dos tecidos mineralizados. A ligação entre íons fosfato é mais forte e, portanto, são menos suscetíveis à diagênese em relação aos carbonatos. Dessa forma, a extração do ^{18}O é um pouco mais difícil a partir de íons fosfato, se comparada à extração a partir de carbonatos. Estes últimos, por outro lado, são facilmente obtidos do CO_2 emitido a partir da queima do material, em um equipamento de IRMS. O esmalte consegue preservar mais carbonato e fosfato do que a dentina e os ossos²⁴. Além da facilidade de extração do ^{18}O a partir de carbonatos, existem melhores padrões (standards de medidas) para carbonato de esmalte do que para fosfato de esmalte, e o ^{13}C também pode ser obtido a partir da mesma amostra⁶.

3.4.3 Cabelos

Os cabelos são ótimas fontes isotópicas, pois são altamente resistentes a diversos fluidos (químicos e biológicos), devido a uma película protetora que os envolve – a cutícula. No contexto Forense, os cabelos podem ser encontrados junto a estruturas ósseas do crânio. Em indivíduos vivos, pelo fato do ser humano perder fios de cabelos ao longo dos dias (estima-se de 50 a 100 fios por dia) e por serem estruturas renováveis, a coleta é fácil e não invasiva²⁴.

Geralmente, coleta-se para análise o fio em seu longo eixo, e não o bulbo (raiz), pois esta porção não representa o cabelo em si. Como o cabelo se renova rapidamente, caso o indivíduo mude seu padrão de dieta ou fonte de água (por exemplo, se viajar para uma região distinta), haverá mudanças dos padrões isotópicos. Essa mudança isotópica é acompanhada de um atraso, do momento da exposição (troca do padrão de dieta) até a exposição no folículo. Assim, quanto mais próxima a porção do fio de cabelo estiver da raiz, mais recente serão as informações isotópicas. Desta forma, o fio de cabelo pode armazenar informações de diferentes períodos, dependendo de seu comprimento²⁴. No entanto, Vautour et al.⁷⁴ contradizem essa análise, pois detectaram que a variação de elementos (por exemplo Sr e Pb) ao longo dos fios de cabelo não se deve à mobilidade, mas sim ao acúmulo

de Sr com o tempo na estrutura dos cabelos, vindo de fontes externas, como partículas de poeira (aerossol).

Os cabelos são constituídos em sua maior parte por queratina (proteína) e, portanto, não exigem extenso tratamento químico previamente à análise. Assim, comparadas aos ossos e dentes, quantidades menores de cabelo são suficientes. Os valores de ^{13}C da queratina estão relacionados à dieta proteica²⁴.

3.4.4 Unhas

As unhas, assim como os cabelos, também são estruturas resistentes, úteis para análise isotópica não só de indivíduos mortos, mas também de indivíduos vivos. São compostas por queratina e estão em constante processo de renovação. Portanto, as unhas fornecem informações isotópicas atuais da dieta e local de origem do indivíduo^{9,24}.

As unhas de bebês são mais enriquecidas em ^{15}N do que as unhas das respectivas mães em cerca de +3‰. Isso indica que os bebês se alimentam num nível trófico acima do nível trófico das mães²⁴.

Unhas e cabelos são preferíveis para a análise, pois são mais fáceis de serem obtidas uma vez que não necessitam de nenhum método mais invasivo para sua obtenção^{9,50}.

3.4.5 Pele

A pele também pode ser utilizada para análise isotópica forense, uma vez que é encontrada aderente aos tecidos ósseos. A pele possui um *turnover* de ^{13}C estimado em 15 dias. Porém, há controvérsias em relação ao uso da pele para análise isotópica, principalmente porque sofre contaminação com o processo de decomposição²⁴.

3.5 Problemas com Amostras e Análises

Para amostras arqueológicas, a diagênese talvez seja o principal causador de interferências na assinatura isotópica de tecidos biológicos. A diagênese refere-se às transformações que ocorrem nos tecidos após a morte (processos tafonômicos), induzidas principalmente pelas características do solo onde os tecidos estão

depositados por um longo tempo. Desta forma, o pH do solo, a temperatura, a atividade microbiana, a presença de água, etc... podem favorecer a degradação do colágeno, a perda de minerais para o solo e a incorporação de carbonatos e outros minerais para as amostras. Standford (1992 apud Regan²⁴) afirma que não há tecidos biológicos humanos incapazes de sofrer alterações. Porém, o esmalte dentário, por sua natureza mineral mais densa, é o material com melhor capacidade de resistir bem aos efeitos tafonômicos e da diagênese. São bastante diferentes dos ossos e da dentina, que são tecidos mais porosos e com maior conteúdo orgânico, e assim, mais susceptíveis à influência do meio, degradando-se rapidamente.

Fatores antropogênicos também representam um problema para análise isotópica. A poluição, por exemplo, é um fator antropogênico que pode interferir nos valores isotópicos de um determinado ambiente e, conseqüentemente, do material biológico analisado. Inclusive, isótopos como estrôncio e chumbo são usados para monitoramento dos níveis de poluição urbana por metais pesados decorrentes de partículas de fuligem de motores de combustão, siderúrgicas, pó de cimento, lixos domésticos e de indústrias^{63,75}, que podem ser transportados pelo ar por longas distâncias.

Um outro fator seria a importação de alimentos, que pode mascarar os valores isotópicos e não refletindo, portanto, o local de origem do indivíduo. Para as pesquisas arqueológicas, esse não é um grande problema pois, por povos passados, os alimentos eram geralmente cultivados e consumidos no local. Na modernidade, raramente os alimentos são cultivados e consumidos pelos habitantes locais (alimentos de supermercado) afetando os valores de carbono, nitrogênio e estrôncio, e a água geralmente é engarrafada e de diferentes origens, afetando também os valores de estrôncio, oxigênio e hidrogênio. Um outro fator agravante é o uso de fertilizantes no solo para a prática da agricultura, muitas vezes produzidos e importados de outras regiões. Essas substâncias aditivas podem alterar os valores isotópicos do solo, por exemplo os de estrôncio⁷⁶, e conseqüentemente os valores isotópicos das plantas e da água subterrânea no local.

Em relação ao rigor na análise isotópica, a amostragem é importante para qualquer generalização em uma determinada população. Nesse sentido, estudos com poucas amostras e sem representatividade não garantem evidências confiáveis. Além disso, os métodos estatísticos, para determinar se algum indivíduo pertence ou não a determinada área, são dependentes da amostragem e da distribuição dos dados (em

amostras pequenas, o número de valores discrepantes é sempre alto, o que pode ser um resultado falso). Após a verificação de alguns métodos de identificação de valores discrepantes no contexto arqueológico, autores concluíram que, pelo fato dos valores isotópicos de seres humanos serem considerados como dados biológicos (e que, portanto, seguem distribuição normal assim como a maioria das variáveis) o “método 3 x desvio mediano absoluto da mediana considerando normalidade dos dados” é bem apropriado para tal⁶⁰.

Um outro cuidado em relação às análises é em relação à comparação da assinatura isotópica do indivíduo com informações do ambiente. No caso do oxigênio, por exemplo, para que essa comparação seja possível, os pesquisadores precisam considerar todas as fontes de água disponíveis no local, mudanças climáticas ao longo do ano, inclusive as práticas de fervura e água para bebidas alcoólicas. Também é preciso conhecimento sobre as relações entre valores isotópicos da água ingerida e os tecidos do corpo. Para tal comparação, várias equações já foram propostas no intuito de transformar os valores isotópicos de oxigênio dos tecidos em valores isotópicos referentes à água consumida. Essas equações, no entanto, levam a diferentes resultados, inclusive a erros de conversão^{14,60}. Sendo assim, valores isotópicos de outros indivíduos que cresceram no local, para criar um intervalo de valores, sendo possível então comparar o indivíduo de interesse (alvo) com tal intervalo, parece ser a abordagem mais adequada. Para esta abordagem, no entanto, é preciso um número considerável de trabalhos para determinada região, especialmente se ela for muito extensa, o que volta no problema da amostragem.

Lightfoot e O’Connell⁶⁰ colocam também a questão do fracionamento, pois a água que bebemos, por exemplo, que vem geralmente do subsolo, apresenta algum grau de alteração isotópica (ou seja, os valores de oxigênio e hidrogênio não são exatamente iguais aos valores de precipitação). Dependendo da estação do ano, também há alterações nos valores isotópicos de oxigênio. Outros fatores incluem: variações fisiológicas, variabilidade intra-indivíduo (entre diferentes tecidos do mesmo indivíduo) e pré-tratamentos das amostras.

3.6 Pré-tratamentos

Para que a análise isotópica de estruturas minerais de ossos e dentes (apatitas) possa ser realizada com precisão, é necessário que não só a matéria orgânica seja

removida, mas também as estruturas derivadas da contaminação por carbonatos secundários, bem como as apatitas diagenéticas. Apatitas diagenéticas são aquelas incorporadas após a morte, por causa da ação microbiológica, exposição prolongada à água, incineração, processos físico-químicos do solo etc. Isto é importante porque os isótopos podem sofrer fracionamento de forma diferente, dependendo do tipo de tecido (orgânico ou inorgânico)⁷⁰.

Existem vários protocolos de tratamento de amostras de ossos e dentes (esmalte e dentina) na literatura, alguns até mesmo contraditórios em relação ao emprego de substâncias. As substâncias mais frequentemente usadas para remoção de matéria orgânica são o hipoclorito de sódio (NaClO) e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), empregados em diferentes concentrações, diferentes temperaturas e por períodos de exposição diferentes^{70,77-78}. Também existem vários produtos para remoção de carbonato exógeno (carbonato secundário, produtos da diagênese) – o qual é considerado mais solúvel do que a apatita biológica. No entanto, esses pré-tratamentos, e mesmo a temperatura, podem interferir na mensuração de isótopos da bioapatita, principalmente em amostras arqueológicas. Até mesmo em amostras modernas foi detectada a incorporação de bruxita na dentina após tratamento⁷⁸. A bruxita é a recristalização da hidroxiapatita biológica causada por exposição ao ácido acético, por exemplo. Como não possui carbono em sua composição, não altera a composição isotópica do carbono, mas sim do oxigênio⁷⁸. Por conta disso tudo, existem autores sugerindo que não se faça nenhum tipo de pré-tratamento, mesmo em trabalhos mostrando nenhuma ou pouca diferença entre amostras tratadas e não tratadas⁷⁹⁻⁸⁰.

Nesse sentido, Chenery et al.⁵⁴, durante um estudo isotópico com amostras arqueológicas de esmalte, decidiram verificar se havia diferença nos valores isotópicos de ¹³C e ¹⁸O (ambos extraídos da porção de carbonato do esmalte) entre materiais tratados e não tratados com 0,1M de CH₃COOH (ácido acético) por 2 horas para remoção do carbonato secundário (n=10). Os autores verificaram pequenas diferenças nos valores, e decidiram continuar a pesquisa com as amostras não tratadas.

Em relação ao fosfato, Grimes et al.⁷⁷ compararam uma série de pré-tratamentos (NaOCl, NaOCl + NaOH, H₂O₂ e aquecimento a 400°C) para diferentes amostras, incluindo também ossos e dentes de animais, utilizando variadas técnicas de análise, para verificar a capacidade de remoção de matéria orgânica e também a

influência desses pré-tratamentos nos valores de ^{18}O do fosfato, quando comparado com amostras não-tratadas. Verificaram efeitos bem variáveis na remoção de material orgânico, restando material orgânico em praticamente todas as amostras; o NaOCl foi o melhor deles. Amostras tratadas com H_2O_2 tiveram valores isotópicos de ^{18}O do fosfato elevados, principalmente em ossos (em menor grau para o esmalte), e os pesquisadores também observaram alterações para o carbonato (apesar de não ter sido o objetivo principal do estudo). Observaram ainda alterações frente ao aquecimento das amostras, pois este processo, principalmente nos ossos, faz com que o componente fosfato fique exposto e realize trocas com a mistura, até mesmo considerando o esfriamento da amostra a temperatura ambiente. Isto ocasiona um empobrecimento nos valores de ^{18}O . Os autores verificaram que as amostras não tratadas corresponderam aos valores esperados para o ^{18}O da água (do ambiente) e concluíram que pré-tratamentos podem ser desnecessários, uma vez que alteram a composição isotópica original.

Snoeck e Pellegrini⁷⁰ testaram várias substâncias em diferentes concentrações para verificar se realmente removem a matéria orgânica de forma eficiente e se os tratamentos com ácido acético removem apenas o carbonato secundário ou se há alteração na estrutura. Para tanto, os autores utilizaram amostras de ossos, esmalte dentário e dentina de indivíduos modernos e arqueológicos. Os efeitos desses pré-tratamentos na estrutura e composição química das bioapatitas foram avaliados por análises infravermelha e elemental. Os autores observaram que o H_2O_2 foi o menos eficiente para remover matéria orgânica, independentemente da concentração ou temperatura, pois devido às suas propriedades ácidas, (i) não remove a matéria orgânica de forma eficiente; (ii) ataca demasiadamente o carbonato endógeno de ossos e dentes (dentina, principalmente) de indivíduos modernos, uma vez que estas estruturas apresentam cristalitos menores e mais reativos do que as amostras arqueológicas e o esmalte dentário; (iii) modifica a estrutura da bioapatita. O NaClO_2 também não removeu a matéria orgânica das amostras.

O NaClO e o $\text{N}_2\text{H}_4\text{H}_2\text{O}$ apresentaram resultados interessantes, segundo os autores. Ambos são bases e, portanto, nenhum efeito químico foi observado na porção de carbonato da bioapatita. Ambos removeram a matéria orgânica, porém o NaClO induziu o aumento de absorção de carbonato secundário (exógeno). Por fim, o $\text{N}_2\text{H}_4\text{H}_2\text{O}$ foi o que apresentou menores efeitos químicos na bioapatita. Ele foi capaz

de remover grande parte da matéria orgânica de ossos e dentina, e removeu completamente a matéria orgânica de esmalte dentário, sem impactar no carbonato.

Já em relação ao tratamento com ácido acético para remoção de carbonato secundário, os autores recomendam o uso do CH_3COOH 1M tampão após um pré-tratamento, pois sozinho, tem efeito no conteúdo de carbonato e afeta a estrutura cristalina da bioapatita. O CH_3COOH 0,1M também foi ruim, pois reduziu muito a massa do material analisado, principalmente quando aplicado de forma isolada como um pré-tratamento. Caso este último seja a opção do pesquisador, é recomendado que seja usado por um período reduzido.

Os mesmos autores⁸¹ decidiram, então, avaliar o impacto desses pré-tratamentos na mensuração da razão isotópica de ^{13}C e ^{18}O de amostras de bioapatitas de ossos e dentes (porção carbonato) de indivíduos modernos e arqueológicos. Os protocolos testados estão na tabela 2.

Tabela 2 – Protocolos para pré-tratamentos de amostras biológicas

Pré-tratamento	Concentração	Tempo	Temperatura
Nenhum tratamento			
H_2O_2 (peróxido de hidrogênio)	30%	72h	80°C
	10%		
$\text{N}_2\text{H}_4\text{H}_2\text{O}$ (hidrato de hidrazina)	95%	48h	60°C
NaClO (hipoclorito de sódio)	1%	72h	Temperatura ambiente
	2,5%		
	5%		
CH_3COOH (ácido acético) - remoção de carbonato 2ario	0,1M	30min	Temperatura ambiente
	1M tampão		

Fonte: Adaptado de Pellegrini e Snoeck⁸¹.

O H_2O_2 a temperatura ambiente foi excluído, pois não foi eficiente em remover a matéria orgânica, independentemente da concentração, como visto no estudo anterior. Todas as amostras foram lavadas em água deionizada (3x) e congeladas para secagem (durante a noite toda, previamente às análises), exceto para o $\text{N}_2\text{H}_4\text{H}_2\text{O}$. As amostras foram pesadas antes e depois de cada pré-tratamento. Os efeitos foram observados em um momento para amostras com somente pré-tratamento para remoção de matéria orgânica endógena; em um segundo momento,

com pré-tratamento para remoção de apenas matéria orgânica secundária; e em um terceiro momento, amostras utilizando a combinação de dois pré-tratamentos, para remoção de matéria orgânica endógena e exógena.

Os autores observaram que, além de remover matéria orgânica, todos os pré-tratamentos interferiram na composição isotópica de ^{13}C e ^{18}O das amostras. Essa interferência também dependeu do tipo de material (osso, dente (dentina/esmalte), do conteúdo orgânico, da idade (amostras modernas ou arqueológicas), estado de conservação e a composição isotópica inicial.

Com esses achados, os autores sugeriram o $\text{N}_2\text{H}_4\text{H}_2\text{O}$ como o melhor pré-tratamento para remoção de material orgânico de tecidos ósseos e dentários, seguido de tratamento com solução de CH_3COOH -1M tampão para amostras arqueológicas (remoção de material secundário). Questionaram ainda se realmente há necessidade de pré-tratamentos para análises isotópicas e se a presença de matéria orgânica impactaria muito nesses estudos, sobretudo para amostras de esmalte, onde a quantidade de material orgânico é mínima.

3.7 Isoscapes

Isoscapes são mapas topográficos/espaciais que mostram a variação esperada de um determinado isótopo em uma determinada região, a partir de um modelo^{6,11}. Portanto, os isoscapes não são os dados em si⁸². O seu foco é nas probabilidades sobre a coordenada geográfica, dado um valor isotópico de um indivíduo.

A construção de isoscapes tem sido feita a partir de uma série de modelos obtidos de água precipitada, solo, água do corpo, penas de aves e tecidos humanos. A premissa é a de que se pode usar os isoscapes para estimar a origem geográfica onde o tecido biológico foi sintetizado.

Segundo Wunder⁸², para que um mapa com dados do ambiente possa ser usado para estimar a origem geográfica, é preciso levar em consideração uma série de outras premissas, comprovadas diretamente ou a partir da literatura. Algumas são: correspondência entre os valores de isótopos do ambiente e os valores encontrados na base da cadeia alimentar; valores de precipitação da água conhecidos; possibilidade de estimar os valores de isótopos da água na cadeia alimentar transferidos para os tecidos (podendo ser feito por meio de funções específicas para regiões e amostras¹¹); valores isotópicos dos tecidos não se alteram com o tempo;

calibração confiável de medidas isotópicas no laboratório considerando as referências internacionais.

Para casos arqueológicos e pré-históricos, é mais comum o uso de isoscapes baseados em dados do ambiente, pois os dados biológicos dessas populações são mais restritos. Para amostras modernas, no entanto, para modelar os isoscapes é recomendável a utilização de amostras biológicas de origem conhecida. No caso do elemento carbono, apesar de valores de ^{13}C de tecidos humanos fornecerem alguns *insights* sobre possíveis regiões geográficas, é difícil montar um isoscape para este elemento, pois variáveis como comportamento alimentar das pessoas e práticas culturais interferem⁵⁶.

4 MATERIAL E MÉTODO

Essa pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP (CAAE: 90922418.7.0000.5416).

O estado de São Paulo, que é a região foco do estudo, está localizado na região sudeste do Brasil. Possui uma área de aproximadamente 250.000 km² e população de cerca de 46 milhões de habitantes⁸³. É o estado mais populoso do Brasil.

No que se refere à Geologia, o estado de São Paulo é dividido em dois grandes compartimentos principais: a porção mais a leste é dominada pelo Embasamento Cristalino datado da Era Neoproterozóica ou mais antiga, composto principalmente por rochas magmáticas e metamórficas, representando cerca de 30% do estado, ao passo que a porção mais a oeste do estado é dominada por sedimentos e basaltos que englobam a bacia sedimentar do Paraná, que compreende uma sequência vulcânica-sedimentar do período Neo-Ordovicianos (Era Paleozóica) a Neo-Cretáceo (Era Mesozóica), ocupando cerca de 70% do estado⁸⁴. Complementando esse quadro geológico, existem duas pequenas bacias intracontinentais com idade do Terciário (Era Cenozóica), no meio do território ocupado pelo Embasamento Cristalino, bem como sedimentos costeiros e fluviais cenozóicos. As duas principais estruturas geológicas definem os principais compartimentos hidrogeológicos do estado. O Embasamento Cristalino é representado por aquíferos fraturados, nos quais o fluxo e o armazenamento da água estão associados a fraturas e discontinuidades de rochas e, devido à baixa capacidade dos poços, as águas subterrâneas são usadas apenas como fonte complementar para o fornecimento de água para a população. Os aquíferos sedimentares localizados na porção oeste do estado representam a principal fonte de água para a população, principalmente os aquíferos Guarani e Bauru, devido à sua distribuição extensiva, alta capacidade de armazenamento e qualidade da água⁸⁵⁻⁸⁶.

O estado de São Paulo é caracterizado por um intenso desenvolvimento urbano. Entre 1997 e 2000, mais de 50% dos habitantes do estado de São Paulo se encontravam concentrados em áreas de bons níveis de riqueza e indicadores sociais intermediários, segundo Índice Paulista de Responsabilidade Social (IPRS) de 2000⁸⁷. Este padrão foi mantido entre 2006 e 2008⁸⁸. Quanto ao perfil nutricional, entre 2002-2009, as famílias brasileiras apresentaram um quadro de despesas cada vez maiores

com alimentação preparada fora de casa, em todos os setores (rural e urbano), principalmente na região sudeste, se comparada à região norte do país⁸⁹. Não há informações anteriores sobre este quesito. Entre 2002-2003⁹⁰ foi observada uma disparidade entre famílias de diferentes rendas em relação às quantidades adquiridas de alimentos: as famílias com maiores rendas adquiriam mais leite pasteurizado e pão francês em relação às de menores rendas, e houve um declínio no consumo de arroz com feijão nas famílias de maiores rendas. No período entre 2008-2009 também foi observado que, à medida em que a renda familiar aumenta, as pessoas consomem uma fonte mais diversificada de alimentos, como pizza, frituras, doces e similares e refrigerantes⁹¹. Também foi verificado na mesma pesquisa que o consumo de frutas, legumes e laticínios aumenta nas famílias de maior renda.

4.1 Material

A amostra foi formada por terceiros molares doados por 163 indivíduos residentes no estado de São Paulo desde a formação do esmalte dentário desses dentes, ou seja, quando os participantes tinham entre 8 e 14 anos de idade aproximadamente⁹²⁻⁹³. A extração dos terceiros molares ocorreu por motivos externos a esta pesquisa, e cada participante forneceu o consentimento para participação na pesquisa, por escrito, por meio do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Os participantes foram questionados sobre a cidade onde passaram a infância e adolescência, bem como sobre os seus principais hábitos alimentares da época, tipo de água que consumiam (água de torneira ou garrafa), doenças e sobre a condição econômica na época de formação do esmalte. Indivíduos fumantes, ou que disseram ter apresentado alguma doença na infância ou adolescência, participantes que bebiam água de garrafa/galão, que habitaram diferentes cidades durante a infância e adolescência foram excluídos. O número final de participantes foi 142 (103 do sexo feminino e 39 do sexo masculino). A mediana da idade dos participantes é de 26 anos (nascimento em 1994).

Para a classificação da condição socioeconômica, foi utilizado o Critério Brasileiro de Classificação Econômica de 2015, da Associação Brasileira de Empresas de Pesquisa (ABEP)⁹⁴. Essa classificação considera itens de conforto que a família possui em casa (computadores, videogames, lavadoras, micro-ondas, etc;

quantidade de veículos automobilísticos; empregadas domésticas; quantidade de banheiros na casa), nível educacional do chefe da família e acesso aos serviços públicos (rua pavimentada ou não, fonte de água). Para cada variável é atribuída uma pontuação. O nível socioeconômico é calculado pela soma dos pontos. Quanto maior a pontuação, maior é o nível socioeconômico. Esse critério estabelece 6 categorias, sendo “A” o nível socioeconômico mais alto e “D-E” o mais baixo. Cada indivíduo foi classificado em uma das 6 categorias: A (n=6); B1 (n=8), B2 (n=35); C1 (n=33), C2 (n=21); e D-E (n=39). Em relação à dieta durante a infância e adolescência, os participantes consumiam principalmente arroz (n=142), feijão (n=136), frango ou carne vermelha (n=135), trigo (n=125), leite (n=124) e açúcar e semelhantes (n=123).

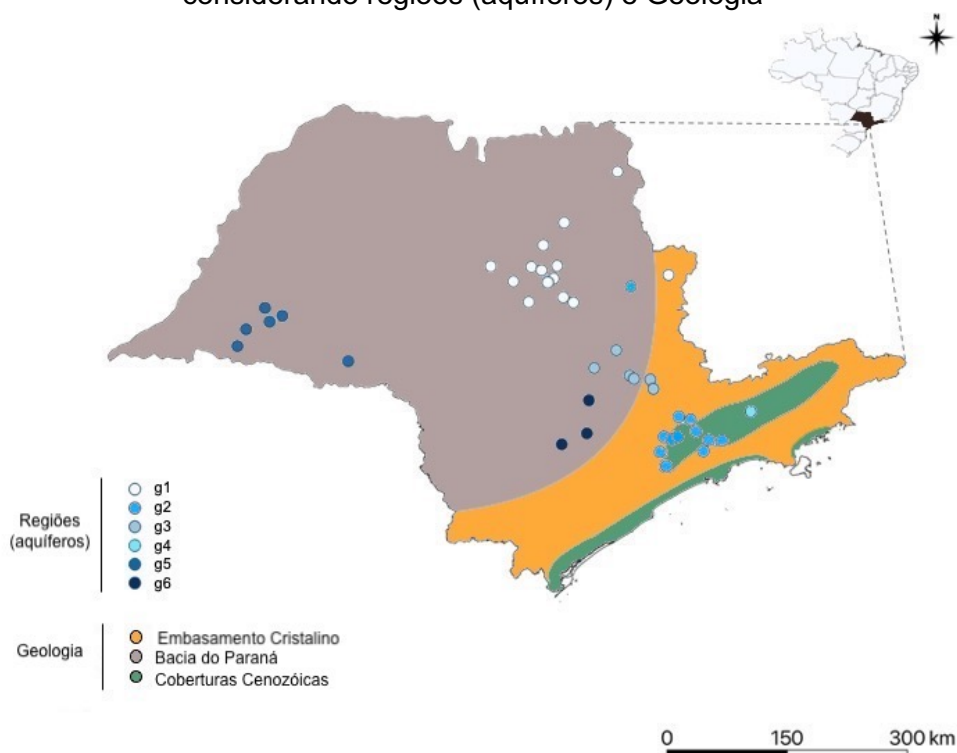
As amostras foram classificadas considerando a fonte predominante de abastecimento de água (aquíferos) dos locais onde os dentes foram formados e a geologia dessas áreas (Figura 1). A classificação em grupos, de acordo com o tipo de aquífero predominante foi a seguinte:

- Grupo 1 (g1): composto por participantes de origens de cidades localizadas mais ao nordeste do estado, abastecidas principalmente pelo sistema Aquífero Guarani (n=38);
- Grupo 2 (g2): composto por participantes de origens de cidades localizadas mais ao sudeste do estado, abastecidas principalmente com águas superficiais do sistema Cantareira (n=70);
- Grupo 3 (g3): composto por participantes de origens de cidades localizadas mais ao centro do estado, abastecidas principalmente com águas superficiais da porção central do sistema Aquífero Tubarão (n=10);
- Grupo 4 (g4): composto por participantes de cidades abastecidas com águas superficiais e subterrâneas (mista) do sistema Aquífero Taubaté (n=1);
- Grupo 5 (g5): composto por participantes de cidades localizadas ao noroeste do estado, abastecidas principalmente com águas do sistema Aquífero Bauru (n=12);
- Grupo 6 (g6): composto por participantes de cidades localizadas mais ao centro-sul do estado, porém abastecidas com águas superficiais da porção sul do sistema Aquífero Tubarão (n=11).

Quanto à geologia, as amostras foram classificadas em 3 grupos⁹⁵: Embasamento Cristalino (n=11), Bacia do Paraná (n=67) e Coberturas Cenozóicas (n=64).

Regiões como g1, g2, g3 e g4 foram classificadas, entre 2006-2012, como regiões de concentrações de cidades com elevados índices de riqueza e variados índices de longevidade e escolaridade (bons-intermediários), localizadas ao longo das principais rodovias do estado. Essas rodovias partem da grande São Paulo (região do grupo g2) em sentido ao interior para conectarem-se com outras regiões. Essas áreas são bastante urbanizadas e responsáveis por uma diversidade de setores como indústrias automobilísticas, aeronáutica, refinarias, indústrias farmacêuticas e químicas, eletrônicos e telecomunicações. Esses segmentos são importantes para o desenvolvimento das regiões, com altos níveis de investimentos. Por outro lado, regiões como g5 e g6 foram classificadas como regiões de concentrações de cidades de baixa riqueza, com índices de longevidade e escolaridade no geral intermediários-insatisfatórios^{88,96}.

Figura 1 – Mapa do estado de São Paulo com a distribuição da amostra, espacialmente, considerando regiões (aquíferos) e Geologia



Fonte: Elaboração própria.

4.2 Método

Para análise de isótopos do esmalte dentário, foi preciso obter pó de esmalte. As amostras, em sua maioria, eram dentes impactados e, portanto, livres de cárie. No entanto, alguns terceiros molares coletados eram dentes erupcionados e apresentaram cavitações e materiais restauradores. Para estes casos, selecionamos as superfícies de esmalte das coroas livres de lesões ou manchas, para evitar quaisquer possíveis interferências nas análises.

Os dentes foram limpos por imersão em solução de clorofórmio e metanol (2:1), deixados em um *rocker* por 30 minutos para remover as impurezas e desengordurar o material. As amostras foram enxaguadas 3 vezes com água Milli Q e deixadas em uma mesa quente para secagem à 75°C. A superfície de esmalte contaminada (camadas mais externas) foi descartada, e o pó de esmalte foi obtido mecanicamente das superfícies linguais/palatinas ou vestibulares com uma broca esférica diamantada e um instrumento de baixa rotação (Conjunto Proxxon LU-6868 Wecker, GG 12).

Pelo fato do esmalte dentário apresentar uma sequência temporal de formação em suas camadas, para a coleta do pó de esmalte foram consideradas profundidade e extensão da face do dente, conforme cada caso⁷². O pó de esmalte obtido foi mantido em frascos do tipo eppendorf e as brocas foram limpas com ácido clorídrico, água Milli Q e etanol para serem reutilizadas.

Os procedimentos químicos e analíticos utilizados foram baseados na literatura^{4,37,97}. Para a análise de ^{18}O e ^{13}C , cerca de 0,30 mg de pó de esmalte foi obtido e armazenado em frascos de vidro selados com um septo de borracha. As análises foram realizadas na porção de carbonato do esmalte em um espectrômetro de massas de razão isotópica (IRMS) Delta plus com um analisador GasBench II acoplado. As amostras foram colocadas em um bloco quente a 45 °C e deixadas por 24h após adição de 100% de ácido fosfórico. Os valores foram reportados em delta (δ) em unidades por mil (‰), como nas equações abaixo, e normalizados em relação à escala PDB (Pee Dee Belemnite) com um material de referência para carbonato desenvolvido pela Vrije Universiteit Amsterdam (padrão VICS) com valores conhecidos de 1,45 ‰ para $\delta^{13}\text{C}$ e -5,44 ‰ para $\delta^{18}\text{O}$.

$$\delta_{(18O [‰])} = \frac{18O/16O_{(amostra)} - 18O/16O_{(padrão)}}{18O/16O_{(padrão)}} \times 1000$$

$$\delta_{(13C [‰])} = \frac{13C/12C_{(amostra)} - 13C/12C_{(padrão)}}{13C/12C_{(padrão)}} \times 1000$$

O padrão internacional IAEA-603, com valores oficiais conhecidos de 2,46‰ para $\delta^{13}C$ e -2,37‰ para $\delta^{18}O$, também foi utilizado como controle, para verificar a performance do instrumento. Dez medidas foram realizadas para cada padrão. A reprodutibilidade da IAEA-603 foi de $\pm 0,12\%$ (1 desvio-padrão) para $\delta^{13}C$ e de $\pm 0,21\%$ (1 desvio-padrão) para $\delta^{18}O$.

Para análise de $^{87}Sr/^{86}Sr$, cerca de 1-3 mg de pó de esmalte foram dissolvidos em 0,5 ml de ácido nítrico 3 mols para separar o Sr dos outros elementos presentes no esmalte, por procedimentos químicos de coluna de cromatografia de troca iônica, com uma resina de especificação para Sr. Um padrão para dente (controle positivo) e um controle negativo foram preparados para lotes de 18 amostras, para verificar a qualidade do trabalho. O padrão dentário (0,05 ml) foi dissolvido em 0,45 ml de ácido nítrico 3 mols, e possui um valor conhecido de 0,7078567. Os controles negativos (0,5 ml de ácido nítrico 3mols) receberam 3 gotas de ^{84}Sr . O Sr das amostras e dos controles foi coletado em provetas de teflon, de formato cônico internamente e ultra limpas, usando 0,8 ml de água Milli-Q. As amostras foram tratadas com ácido nítrico destilado concentrado, pelo menos duas vezes, por um período mínimo de 2h. Em seguida, foram deixadas secando em uma mesa quente a 120°C. As amostras secas foram diluídas em ácido nítrico 10% e carregadas em filamentos individuais de rênio (Re) (cerca de 100 ng), usando TaCl5 como ativador.

As razões $^{87}Sr/^{86}Sr$ foram medidas no espectrômetro de massa de ionização térmica Triton-plus Thermo Finnigan (TIMS). As análises consistiram em cerca de 12 blocos de 20 ciclos. Juntamente com as amostras e controles, foi mensurado 100 ng do padrão internacional NBS987. As razões de Sr foram corrigidas para $^{86}Sr/^{88}Sr = 0.1194$ usando a lei de fracionamento de massa exponencial. As medidas do padrão internacional NBS987 e do padrão dentário (controle positivo) foram respectivamente $0,710249 \pm 0,000007$ (2 erros-padrões; n = 12) e $0,707857 \pm 0,000008$ (2 erros-padrões; n = 9). Cada amostra teve seu valor normalizado para o valor aceitável de

0,71024 para o NBS987 e para a média dos padrões internacionais NBS987. Os controles negativos apresentaram quantidade mínima de Sr.

Todos os procedimentos de extração, químicos e analíticos acima mencionados foram realizadas na Faculdade de Ciências da Vrije Universiteit Amsterdam, Holanda.

4.3 Análise Estatística

O programa R (versão 3.6.2 para Mac OS X) e Microsoft Excel (versão 16.35) foram usados para as análises. Inicialmente, foi realizada a estatística descritiva dos dados. A distribuição normal foi checada para os dados de ^{13}C , ^{18}O e $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ isoladamente e considerando cada região (grupo), condição socioeconômica e sexo. A normalidade também foi verificada para ^{13}C e $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ considerando o tipo geológico. Para isso, foram utilizados valores de assimetria e curtose ou o teste de Shapiro-Wilk, quando apropriado. Os dados foram transformados em z-scores para avaliar a existência de valores discrepantes que, quando presentes, foram removidos do conjunto de dados (para análise). Os intervalos de confiança (IC) 95% foram construídos para estimar valores para a população e para os grupos, com base na distribuição z ou na distribuição t quando os dados não apresentaram distribuição normal, devido ao pequeno número amostral do grupo. Os intervalos de confiança foram construídos da seguinte forma⁹⁸:

$$IC_{95\%}(\mu) \rightarrow \bar{\chi} \pm z_{\alpha} * \frac{E}{\sqrt{2}}$$

onde:

$\bar{\chi}$ = média

α = valor de significância de 5%

z = valor de z para grau de confiança de 95%

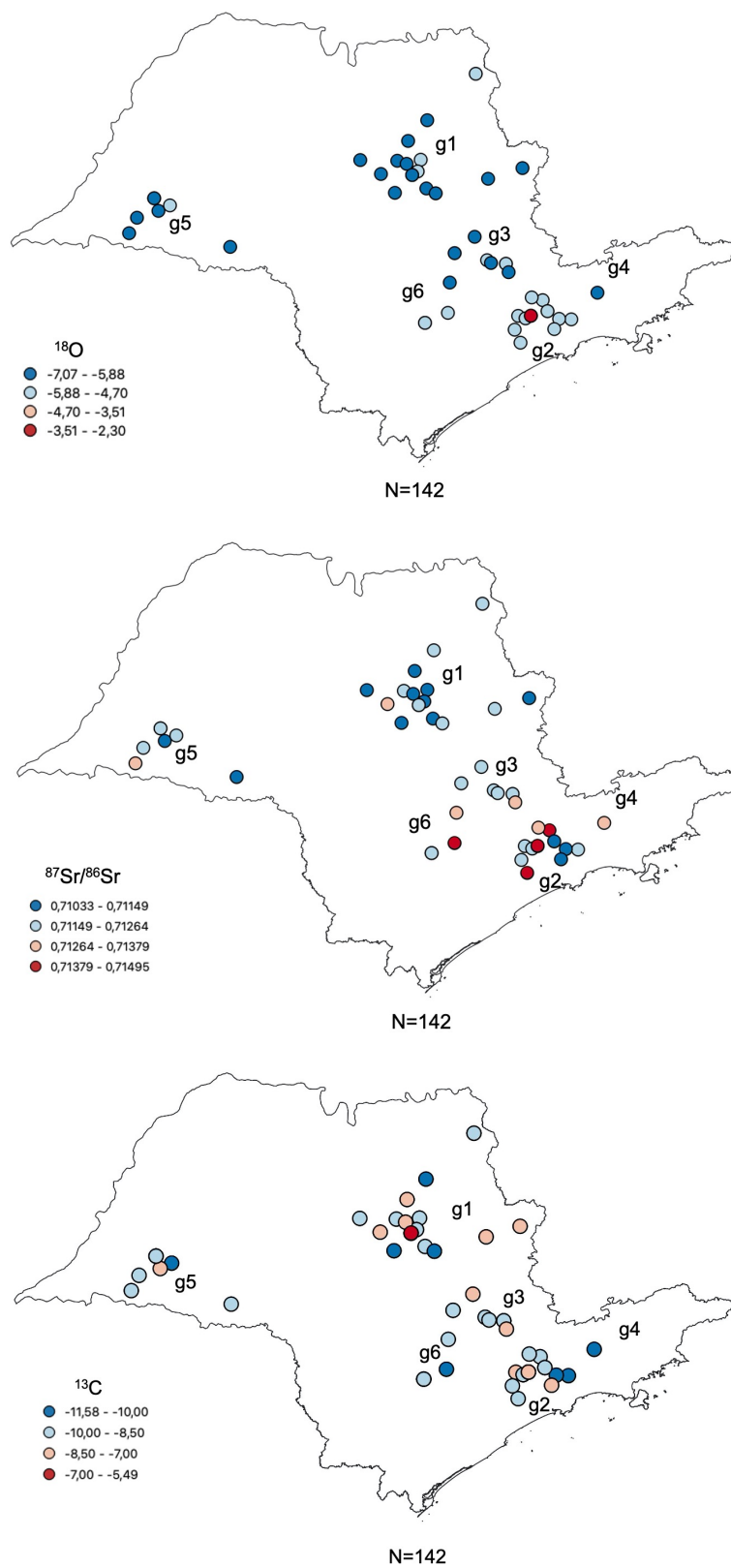
E = erro padrão

5 RESULTADO

A figura 2 mostra a dispersão dos dados espacialmente. Os dados de ^{13}C , ^{18}O , e $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ apresentaram distribuição normal. Apenas 1 valor discrepante foi identificado para os dados de ^{18}O , de valor igual a -2.30‰, o qual foi excluído das análises. A tabela 3 apresenta os valores máximos e mínimos e as estimativas dos valores isotópicos para a população do estado de São Paulo.

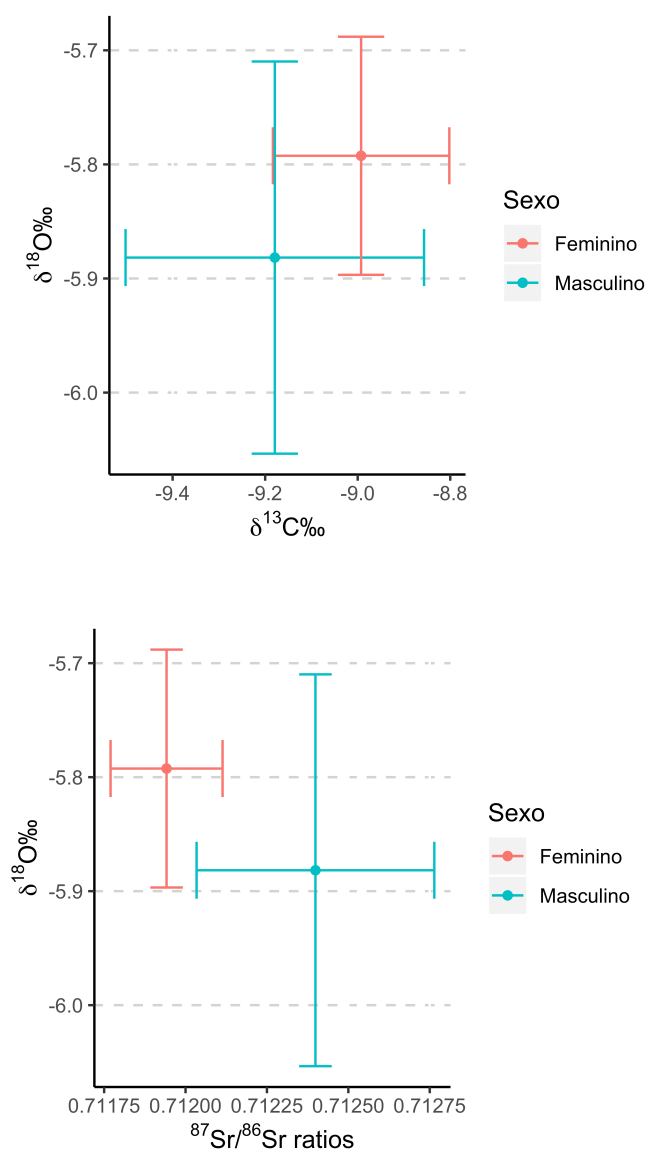
Considerando o sexo dos participantes, os dados apresentaram distribuição normal em cada categoria. A figura 3 exhibe a alta probabilidade dos homens e mulheres apresentarem valores semelhantes para ^{13}C , ^{18}O e $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$.

Figura 2 – Mapa com a dispersão espacial das amostras e valores isotópicos



As classes foram escolhidas de forma arbitrária.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 3 – Estimativas de razões isotópicas segundo sexo

As barras de erros ao redor da média representam os ICs de 95% baseados na distribuição Z.

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 3 – Estimativa de razões isotópicas para indivíduos residentes no estado de São Paulo, Brasil

Isótopo	Máximo	Mínimo	Média	IC (95%)
$\delta^{13}\text{C}$	-5,48‰	-11,58‰	-9,04‰	0,1641962
$\delta^{18}\text{O}$	-4,40‰	-7,07‰	-5,82‰	0,08912835
$^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$	0,7149452	0,7103317	0,7120673	0,0001628688

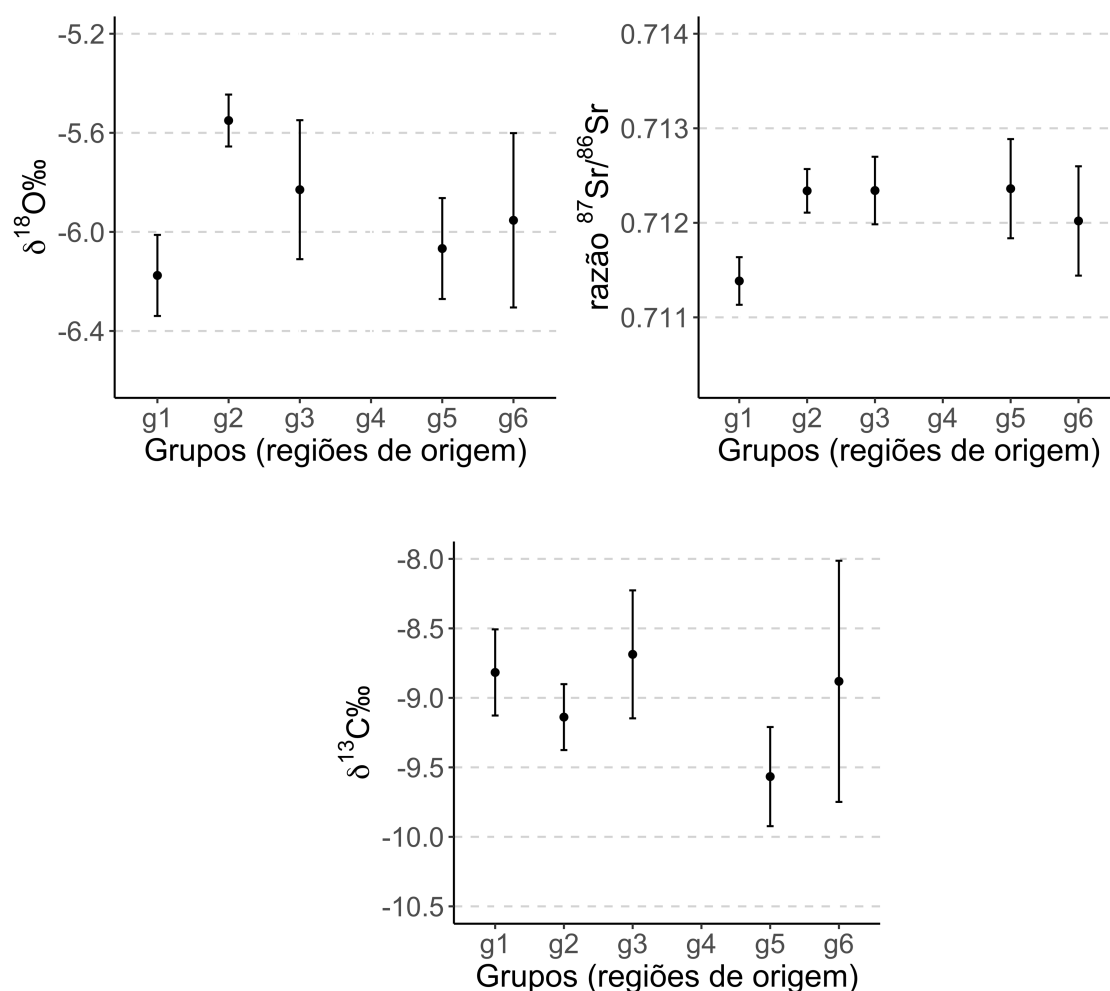
Fonte: Elaboração própria.

Considerando os grupos (regiões geográficas), geologia e condição socioeconômica, os dados apresentaram distribuição normal, com exceção do $\delta^{13}\text{C}$ em g6 (Shapiro-Wilk - $W = 0,80977$, valor de $p = 0,01265$) e $\delta^{13}\text{C}$ na categoria socioeconômica C2 (Shapiro-Wilk - $W = 0,90017$, valor de $p = 0,03526$). O teste de normalidade não foi checado para g4, pois $n=1$.

Pelos gráficos de valores isotópicos estimados (figura 4), é possível observar que os valores isotópicos diferem entre algumas regiões do estado. Para os valores de $\delta^{18}\text{O}$, as estimativas de g2 não incluem os valores de estimativas de g1 e g5, então, com uma probabilidade de erro (α) de 5%, podemos rejeitar a possibilidade de g2 ser igual a g1 e g2 ser igual a g5. Para os dados de $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ e ^{13}C , o que chama a atenção é o comportamento inverso de g1 em relação a g5: g1 apresenta razões de $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ mais baixas e valores mais enriquecidos em ^{13}C se comparados a g5. Para as duas variáveis isotópicas e considerando a probabilidade de erro (α) de 5%, rejeitamos a possibilidade de g1 ser igual a g5.

Considerando a classificação geológica, as razões de $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ foram diferentes entre indivíduos que moraram sobre áreas de Coberturas Cenozóicas e indivíduos que moraram sobre área correspondente à Bacia do Paraná (Figura 5). Por outro lado, para os dados de ^{13}C , não podemos rejeitar a possibilidade de os grupos serem iguais. As estimativas para a região de Embasamentos Cristalinos estão imprecisas.

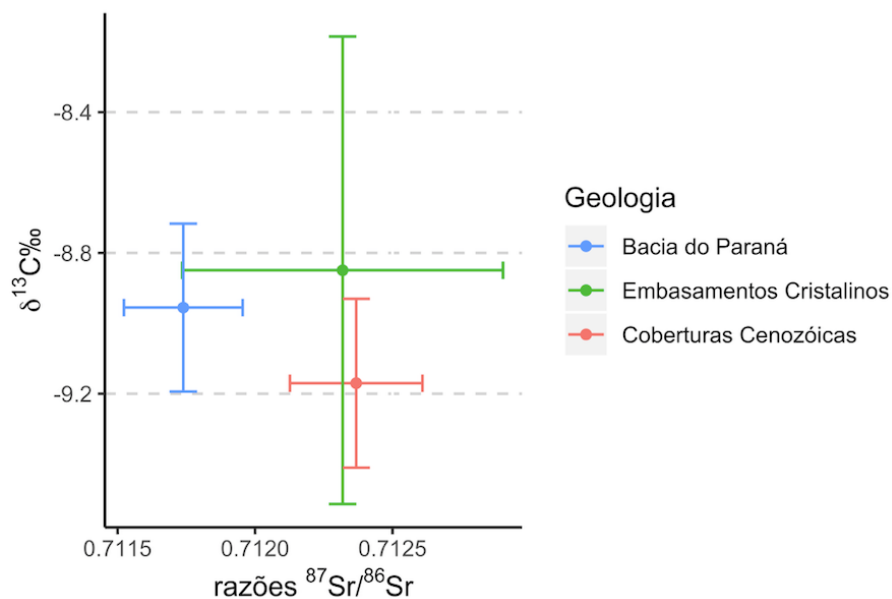
Figura 4 - Valores isotópicos estimados para população moderna do estado de São Paulo segundo regiões geográficas



As barras de erros ao redor da média representam os ICs de 95% baseados na distribuição z, exceto para g6 para o elemento $\delta^{13}\text{C}$ (distribuição t). Um valor discrepante removido ($\delta^{18}\text{O} = -2,30\text{‰}$ em g2). G4 (n=1) não foi incluído e apresenta valores de $\delta^{18}\text{O} = -5,98\text{‰}$, $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr} = 0,713287$ e $\delta^{13}\text{C} = -10,13\text{‰}$.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 5 - Valores isotópicos estimados para esmalte dentário considerando tipo geológico

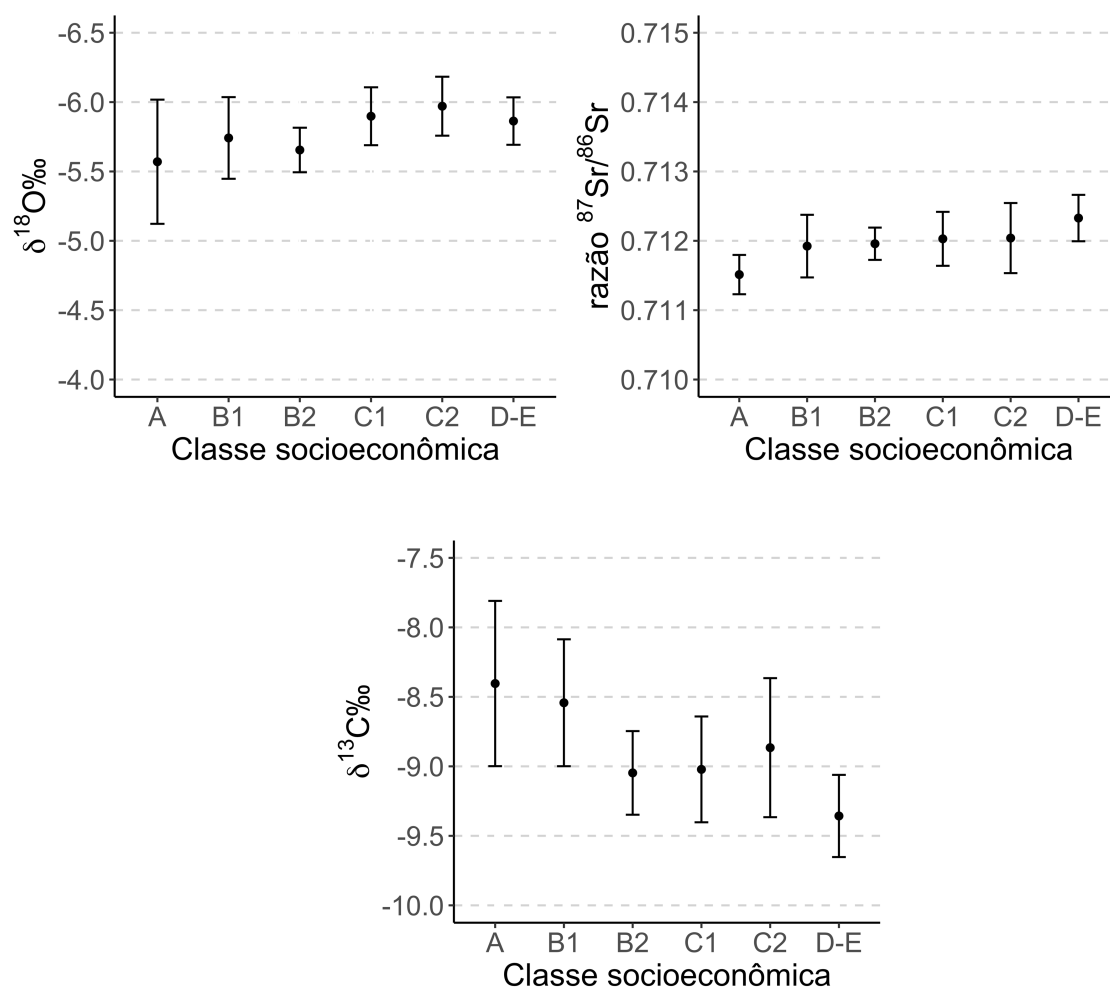


As barras de erros ao redor da média representam os ICs de 95% baseados na distribuição z.

Fonte: Elaboração própria.

Quanto ao nível socioeconômico, as pessoas da categoria D-E apresentaram menores valores de $\delta^{13}\text{C}$ e maiores razões de $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ quando comparadas às da categoria A. Pela figura 6, observa-se que a probabilidade dessas duas classes terem valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ semelhantes é pequena (considerando erro (α) de 5%). Já em relação ao $\delta^{18}\text{O}$, não se pode concluir por diferenças entre as classes. Assim, os valores de $\delta^{18}\text{O}$ isolados não são muito interessantes para diferenciar classes socioeconômicas.

Figure 6 - Valores isotópicos estimados segundo a condição socioeconômica



As barras de erros em torno das médias representam os ICs de 95% baseados na distribuição z, exceto para dados de $\delta^{13}\text{C}$ em C2, que foi baseado na distribuição t. Um valor discrepante removido ($\delta^{18}\text{O} = -2,30\text{‰}$ em B1).

Fonte: Elaboração própria.

6 DISCUSSÃO

Neste estudo, além de diferenças entre algumas regiões do estado de São Paulo para os elementos $\delta^{18}\text{O}$, $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ e $\delta^{13}\text{C}$ no esmalte dentário - especialmente entre Araraquara (g1) e Presidente Prudente (g5) - também foi possível identificar diferenças para $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ entre os níveis socioeconômicos mais extremos (classes A e D-E), considerando dados de $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ e $\delta^{13}\text{C}$. Visto que o estado de São Paulo é o mais populoso do Brasil, com habitantes vindos de diferentes regiões do país e até mesmo do exterior, as informações isotópicas aqui obtidas poderão ser úteis na diferenciação de habitantes do estado de São Paulo dos de outras origens. Este conhecimento em isotopia oportuniza o refinamento da estimativa do perfil biológico a partir de remanescentes humanos para o estabelecimento de identidade de indivíduos no contexto forense.

Os indivíduos da grande região metropolitana de São Paulo (g2) apresentaram valores de $\delta^{18}\text{O}$ enriquecidos em relação às regiões interioranas g1 e g5 (Figura 4). Mesmo considerando que fatores metabólicos e ambientais afetam as razões isotópicas, as diferenças vistas entre esses grupos parecem estar relacionadas à fonte de água predominante usada nas regiões. Em geral, no estado de São Paulo, há um predomínio de consumo de águas superficiais na porção sudeste do estado e de águas subterrâneas na porção noroeste, com algumas áreas mistas⁸⁵. Águas mais superficiais tendem a apresentar valores mais enriquecidos em $\delta^{18}\text{O}$, se comparadas às de áreas mais profundas⁹⁹⁻¹⁰⁰. Estas diferenças acontecem devido às variações na composição isotópica da água precipitada, que abastece os recursos hídricos para consumo nas cidades¹⁰¹. A influência da precipitação ocorre porque os vapores de água do oceano têm valores mais baixos (mais empobrecidos) de $\delta^{18}\text{O}$ do que a água do oceano, e os vapores de água se movem para o interior e precipitam. À medida em que os vapores se movem para o interior e a latitude aumenta, a água (chuva) se torna cada vez mais empobrecida em ^{18}O ⁸.

Apesar dos aquíferos serem reabastecidos principalmente no verão, devido às frequentes chuvas torrenciais, a água armazenada nesses aquíferos corresponde à água total de todas as chuvas ocorridas ao longo do tempo, e reflete os padrões climáticos das regiões¹⁰². O acúmulo dessas águas precipitadas acarreta o predomínio de águas mais enriquecidas em ^{18}O em barramentos, o que, associado à evaporação, poderá enriquecer ainda mais as águas superficiais. Além disso, existem

os fatores da idade dos reservatórios. Águas subterrâneas muito antigas, como a dos aquíferos da Bacia do Paraná^{86,103}, apresentam águas mais empobrecidas em ^{18}O em relação aos reservatórios “mais jovens”¹⁰¹.

Como os participantes desta pesquisa costumavam consumir água da torneira durante a formação do esmalte dentário, já esperávamos ver certa divergência entre essas áreas opostas para os dados de oxigênio.

No geral, as estimativas isotópicas $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ dos dentes da região nordeste do estado (g1) são claramente diferentes em comparação aos valores observados nas partes sudeste (g2, g3) e noroeste (g5) (Figura 4). As regiões g1 e g5 estão localizadas sobre o mesmo tipo geológico (Bacia do Paraná). Este mostra valores diferentes das Coberturas Cenozóicas (onde se encontra g2, por exemplo). Em uma situação hipotética, por exemplo, em que as pessoas consumiram alimentos produzidos e vendidos localmente durante a infância e adolescência, as diferenças entre g1 e g5 na Bacia do Paraná, poderiam ser atribuídas ao fato de que a maioria das cidades do g5 estão localizadas sobre sedimentos, ao passo que algumas cidades do g1, sobre basaltos ou uma mistura dos dois tipos. Rochas do tipo basalto da região do Paranapanema-SP, na Bacia do Paraná, exibem razões de $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ entre 0,7055 a 0,7063 (n=7)¹⁰⁴. Por outro lado, razões de $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ de sedimentos podem variar entre 0,7161 a 0,7171 na região de Botucatu-SP (região mais central do estado)¹⁰⁵. Não foram encontradas razões de referência para rochas do período Terciário/Quaternário (Coberturas Cenozóicas) do estado de São Paulo. Entretanto, mesmo considerando essas diferenças, as amostras de esmalte das regiões sobre a Bacia do Paraná não refletem os valores das rochas da área.

Estudos prévios^{6,25} demonstraram que as razões de isótopos de Sr dos tecidos das pessoas modernas não correspondem diretamente às taxas de isótopos de Sr da água ou solo local, uma vez que podem existir outros fatores, como a dieta de supermercado – alimentos ultraprocessados e embalados, alimentos com diferentes origens (importados), fertilizantes no solo, urbanização – que podem confundir os valores verdadeiros e afetar a análise de georreferenciamento de pessoas. Como o Sr do meio ambiente é incorporado nos tecidos por uma variedade de fontes, incluindo alimentos, bebidas e água usada para cozinhar⁶⁴, parece fazer sentido dizer que as diferenças entre as regiões observadas no presente estudo podem estar relacionadas a diferenças nas fontes de alimento.

A população do estado de São Paulo é muito urbanizada. Mesmo as pessoas das áreas rurais paulistas dependem dos alimentos comprados nos supermercados porque, com o desenvolvimento das áreas urbanas, o acesso aos produtos ficou mais fácil. Além disso, a compra de alimentos depende da condição financeira e da disponibilidade dos produtos nos estabelecimentos. Os participantes deste estudo apresentaram uma dieta principal semelhante e, mesmo assim, foram observadas diferenças entre as regiões. Nesse sentido, é razoável pensar que áreas mais ricas e desenvolvidas e grupos com níveis sociais mais elevados podem consumir mais variedades de produtos (provenientes de diferentes origens) com mais frequência, apesar da dieta principal “padronizada”. Logo, uma análise considerando o histórico geológico da moradia dos indivíduos, como a apresentada acima, é inviável, pois não temos informações sobre a origem dos alimentos dos participantes. Mesmo que essas informações tivessem sido coletadas, dependeríamos da memória dos participantes (viés), porque os sinais isotópicos no esmalte dental estão relacionados ao período da infância e adolescência.

Os achados relacionados à condição socioeconômica sustentam essa ideia. Observamos uma diferença nos valores de $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ entre o status socioeconômico “A” e “D-E”, indicando claramente razões mais elevadas em dentes de indivíduos do status “D-E” - a categoria socioeconômica mais baixa. A região g5 era classificada como uma das regiões de condições de vida menos favorecidas (baixa riqueza, longevidade e escolaridade intermediárias-insatisfatórias)^{88,96}. Em nossa amostra, g5 é a região com mais indivíduos que pertencem proporcionalmente à categoria “D-E” (58%) contra menos de 30% em outras áreas. Isto pode significar que as pessoas pertencentes às classes socioeconômicas inferiores consomem alimentos de origem diferente, quando comparado com classes socioeconômicas elevadas.

Uma possível explicação para tal diferença em relação à origem de alimentos é a de que a origem dos alimentos não é determinada pelas pessoas diretamente, mas sim pelos estabelecimentos da região, e estes por sua vez, determinam a origem dos seus produtos com base na classe socioeconômica a que estão servindo. Assim, pode-se depreender que produções mais baratas de alimento vão servir classes sociais mais inferiores e produções mais caras servirão classes superiores, que têm a possibilidade de serem mais exigentes com seus alimentos. Em relação à ausência de diferenças entre as classes socioeconômicas adjacentes, interpretamos esses achados como sendo uma questão de lógica. É uma comparação entre classes em

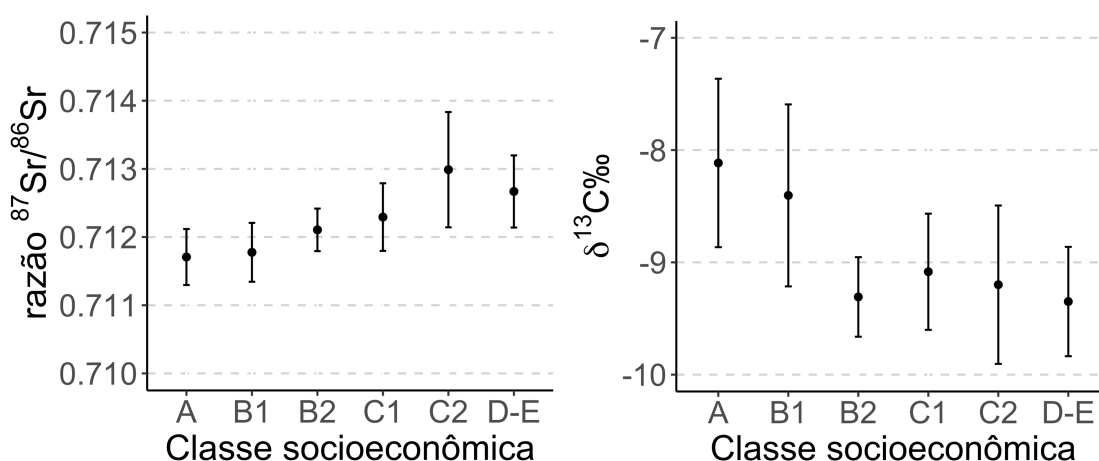
uma escala: classes adjacentes apresentam padrões semelhantes devido às transições, e as diferenças ficam mais evidentes conforme as classes ficam mais distantes.

O mesmo comportamento entre o nível socioeconômico mais alto e o mais baixo observado para a população total (figura 6) foi identificado quando consideramos a análise restrita a uma única região: escolhemos g2 porque é a região com mais amostras no estudo. Esse comportamento dos padrões isotópicos entre as categorias socioeconômicas para g2 pode ser visto na figura 7. Embora oriundos da mesma área (g2), que abrange cidades consideradas em geral como cidades de elevada riqueza, com várias taxas de longevidade e escolaridade^{88,96}, pessoas dos níveis socioeconômicos mais baixos apresentam valores isotópicos diferentes dos grupos dos níveis socioeconômicos mais elevados (classes extremas). O peso dos gastos com alimentos em relação aos gastos totais, no grupo socioeconômico mais baixo, costuma ser muito maior em comparação ao grupo socioeconômico mais alto⁹⁶. Consequentemente, pessoas de status socioeconômico mais baixo acabam consumindo menos variedades de produtos e mais alimentos básicos. Não foram encontrados estudos anteriores comparando razões de $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ em tecidos humanos com o status socioeconômico.

Da mesma forma, acreditamos que o nível socioeconômico pode ser um fator importante nas diferenças de valores isotópicos de ^{13}C nos indivíduos. Foi observado que a classe socioeconômica mais baixa (D-E) é empobrecida em $\delta^{13}\text{C}$ em comparação com a classe socioeconômica mais alta (A e B1), mesmo entre pessoas da mesma região (figura 7), e esses resultados estão de acordo com dados publicados²⁰. É de conhecimento que os níveis de carbono dependem da área de produção (latitude, longitude, clima) e do tipo de planta (C3, C4) ingerida por animais (gado, galinhas) consumidos pelo homem; no entanto, não foi possível mensurar essa variável (a origem dos alimentos). Na dispensa de brasileiros, é possível encontrar bananas do Equador ou Colômbia, uvas/vinhos do Chile..., ou seja, alimentos de diversas origens. Mas, considerando que as pessoas ingeriram o mesmo tipo de alimento, as de classes mais inferiores podem ter consumido menos quantidade e menos variedade de produtos, em comparação às de classes mais superiores, especialmente aqueles alimentos à base de C4 (carne, frango, açúcar), que são produtos mais caros do que alimentos básicos (arroz e feijão, que são plantas C3). No entanto, também não medimos a frequência de consumo de alimentos, o que

configura uma outra limitação do estudo. Além disso, pessoas de classes socioeconômicas mais inferiores podem ter sofrido privação de nutrientes (má nutrição infantil) influenciando valores isotópicos, o que não foi medido nesta pesquisa. De fato, os participantes disseram que não apresentaram nenhuma condição de saúde séria durante a infância e adolescência, mas entendemos que isso pode ser um viés de memória. Assim como a coleta de informações sobre a origem dos alimentos consumidos durante a infância e a adolescência, a frequência de ingestão de cada alimento naquela época é impraticável de se obter, pois essas informações também dependem da memória dos participantes.

Figura 7 – Valores isotópicos de g2 segundo condição socioeconômica



N=70.

As barras de erro em torno das médias representam os ICs 95% baseados na distribuição z, exceto em D-E para dados de $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$, que foram baseadas na distribuição t.

Fonte: Elaboração própria.

A variação humana é essencial para a identificação forense. Estudos anteriores identificaram a possibilidade de usar informações isotópicas para distinguir pessoas de diferentes origens, apesar da questão da dieta mais “homogênea”. Dados isotópicos de tecidos biológicos de diferentes regiões podem ser especialmente úteis em cenários de identificação de desastres em massa (acidentes ou ataques terroristas), em que um número grande de vítimas pode ser de diferentes partes do mundo. Comparamos os dados deste trabalho com informações da literatura e observamos diferenças entre as regiões.

A comparação de nossos dados com os dados publicados de dentes humanos modernos é mostrada na Figura 8. Foram escolhidos apenas dentes humanos para essa comparação devido a diferenças nos sinais isotópicos, dependendo do tecido coletado do mesmo indivíduo, mesmo quando formado “ao mesmo tempo” como é o caso da urina e saliva⁶⁷. Como os dados estão disponíveis na literatura, calculamos os valores de assimetria e curtose e, em alguns casos, realizamos o teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade. Todos os dados, exceto $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ da Colômbia, apresentaram distribuição normal. Mesmo assim, criamos o IC para ter uma ideia do possível comportamento do isótopo na região. Apesar da imprecisão dos valores para alguns países (IC muito amplos), observamos que os indivíduos do estado de São Paulo podem ser distinguidos dos de outros locais pelos isótopos separadamente. A combinação de elementos, no entanto, permitiu uma melhor discriminação das regiões, também demonstrada em estudos anteriores^{4,99}.

É importante mencionar que as estimativas para a população poderão ser outras no futuro. Isso porque os valores isotópicos nos tecidos são explicados por aspectos ambientais, socioeconômicos e culturais, não se limitando a isso. Com as mudanças climáticas e o aquecimento global, os ciclos de águas podem se alterar, alterando também os valores de $\delta^{18}\text{O}$ da água. Mudanças frente ao incentivo de redução de emissão de carbono podem gerar impacto inclusive nos padrões de dieta (por exemplo, o incentivo ao consumo de dieta com baixos teores de carbono)¹⁰⁶ o que, por consequência, poderá alterar os valores de $\delta^{13}\text{C}$. Da mesma forma, a urbanização e fatores antropogênicos podem impactar o ciclo das águas, refletindo na assinatura isotópica dos tecidos. Assim, é importante o monitoramento da variação dos valores isotópicos na população moderna.

Não obstante, os achados deste estudo, isoladamente, não asseguram a determinação exata da origem geográfica. A combinação de elementos isotópicos auxilia tal estimativa, reduzindo o número de possíveis identidades, e deve ser usada em conjunto com outras evidências durante o processo investigativo. Como o Brasil é um país de grande extensão e diversidade (ambiental, cultural...), pode ser que diferenças entre áreas maiores (entre estados, por exemplo) sejam mais evidentes. Neste sentido, caracterizar valores isotópicos de indivíduos de outras regiões pode ser importante.

Apesar do metabolismo entre homens e mulheres ser diferente, o impacto do sexo nas razões de $\delta^{18}\text{O}$, $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ e $\delta^{13}\text{C}$ não é significativo. Tais achados corroboram

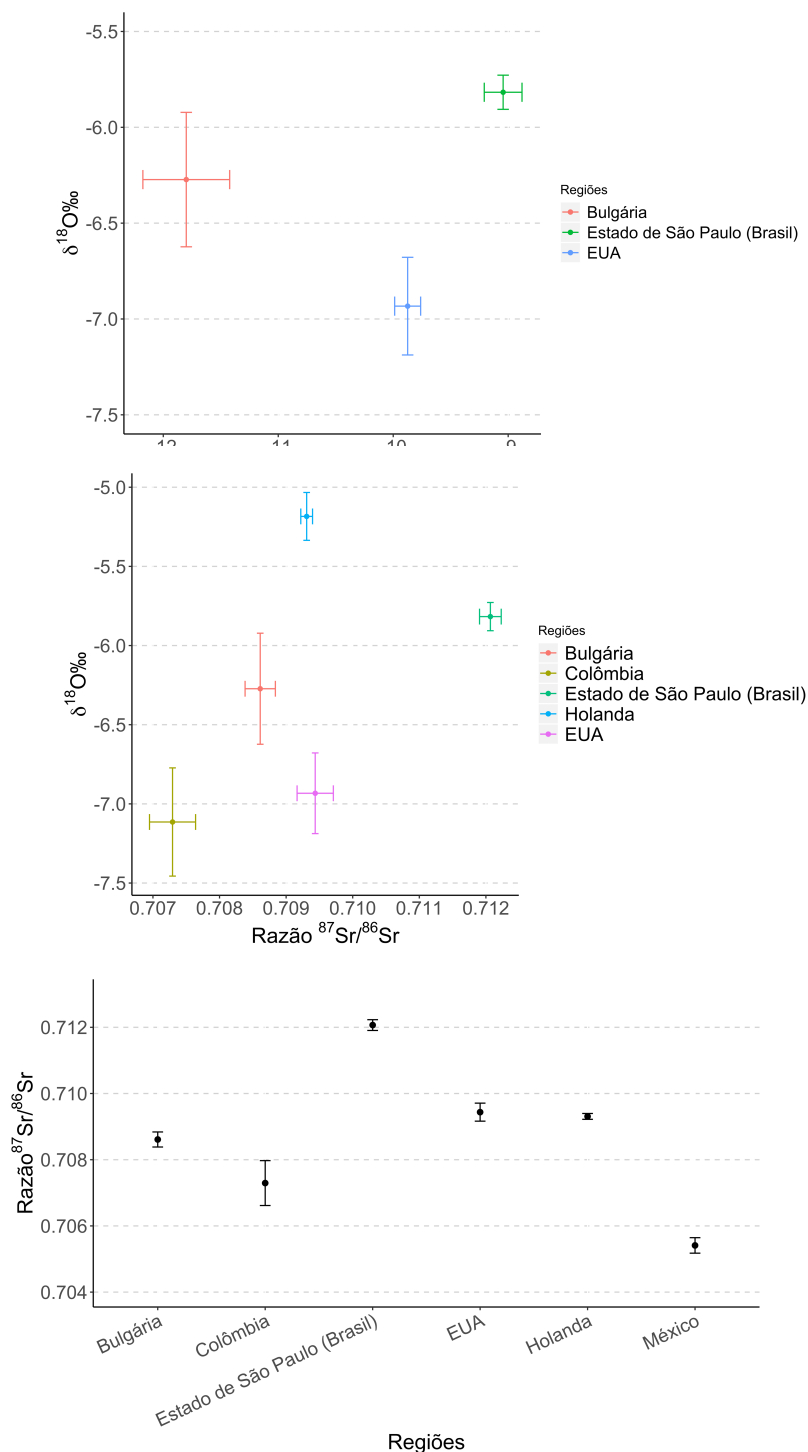
com observações prévias em esmalte dentário⁷ bem como em outros tipos de tecidos biológicos^{9,20}. Assim, esses isótopos não são adequados para diferenciação do sexo.

Atenção deve ser dada ao fato de que as amostras deste trabalho foram obtidas de diferentes partes do estado para tentar buscar representatividade em extensão da população em questão. Cerca de 30 amostras foram usadas para se ter uma ideia do tamanho amostral total, o qual foi calculado da seguinte forma⁹⁸:

$$n = \frac{z_{GC}^2 * \sigma^2}{d^2}$$

onde z é a abscissa na curva normal para um nível de confiança de 95%, σ é o desvio-padrão obtido no piloto e d é a semi-amplitude (calculada a partir do piloto, ou da literatura ou ainda pode ser um desvio-padrão aceitável – por exemplo, para a reprodutibilidade do padrão internacional aceitável mensurado na análise). Para o σ , foi usado o desvio-padrão mais alto do piloto (que foi para as medidas de $\delta^{13}\text{C}$); para d , foi usado um valor menor do que o valor do desvio-padrão aceitável para a reprodutibilidade das medidas do padrão internacional IAEA-603 ($\leq 0.15\text{‰}$), uma vez que essa abordagem pareceu ser a mais conservativa e que resultaria em estimativas com menos erros. Porém, quando o cálculo foi realizado considerando cada região (aquéferos) separadamente, a amostra utilizada ficou aquém à necessária para alguns grupos, dificultando a extrapolação de valores para a estimativa considerando tais grupos, mesmo com a normalidade dos dados (um exemplo é o g6 para dados de $\delta^{13}\text{C}$, que apresentou IC muito amplo, indicando uma representação ruim do grupo). Esse raciocínio é estendido aos estudos da literatura aqui utilizados (figura 8). Para tais estudos, a normalidade dos dados foi analisada e o IC foi construído apenas para se ter uma ideia do possível comportamento dos isótopos em cada região, comparado aos deste trabalho. Porém, alguns trabalhos da literatura usados aqui apresentam amostras muito pequenas para representar valores para um país. Isso mostra a importância de amostras bem planejadas para possibilitar a extrapolação de valores (inferência) de uma forma mais confiável.

Figura 8- Comparação de estimativas de valores isotópicos em esmalte dental por regiões geográficas



As barras de erros em torno das médias representam os ICs 95% baseados na distribuição z. Os dados de $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ para a Colômbia não apresentam distribuição normal. Bulgária (Kamenov et al.²⁴; n=11 para $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^{13}\text{C}$; n=10 para $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$); Colômbia (Eck et al.²⁶; n=61); estado de São Paulo, Brasil (n=141 para $\delta^{18}\text{O}$; n=142 para $\delta^{13}\text{C}$ e $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$); Holanda (Font et al.⁴; n=30); USA (Keller et al.⁶; n=156 para $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^{13}\text{C}$; n=22 para $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$); México (Juarez²⁵; n=19).

Fonte: Elaboração própria.

7 CONCLUSÃO

As razões de $\delta^{18}\text{O}$, $\delta^{13}\text{C}$ e $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ estimadas para a população do estado de São Paulo são respectivamente: $-5,82\text{‰} \pm 0,09$, $-9,04\text{‰} \pm 0,16$ e $0,712067 \pm 0,000162$.

Não foi possível estabelecer características isotópicas exclusivas para todas as regiões do estado de São Paulo analisadas neste trabalho. Porém, algumas regiões apresentaram valores isotópicos diferentes entre si, para os elementos estudados - $\delta^{18}\text{O}$, $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ e $\delta^{13}\text{C}$. Em casos reais, a análise conjunta dos diferentes elementos isotópicos pode ser importante na busca da estimativa geográfica, considerando as diferentes regiões do estado. Os dados obtidos poderão também ser úteis na diferenciação de indivíduos residentes do estado de São Paulo dos de outras origens brasileiras ou mesmo de estrangeiros. Também foram verificadas diferenças para $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$, entre os níveis socioeconômicos mais extremos (classes A e D-E).

Vale reforçar a importância do estudo de isotopia forense em humanos para estimativa de origem geográfica considerando regiões geográficas de maiores extensões. Em casos de desastres em massa, onde haja pessoas de diferentes nacionalidades incluindo brasileiros crescidos (infância e adolescência) no estado de São Paulo, a estimativa da origem geográfica demonstra grande potencial de aplicação.

No contexto forense, dados do ambiente (isoscapes ambientais) são importantes na estimativa da origem geográfica, porém a comparação de valores isotópicos de tecidos biológicos de uma vítima com valores obtidos de humanos modernos de origens e perfis conhecidos, acaba sendo muito mais confiável para estabelecer qualquer conclusão. Nesse sentido, os dados desta pesquisa – pioneira no Brasil para a estimativa da origem geográfica de indivíduos modernos - poderão constituir a base de importante banco de dados, para auxiliar no processo da estimativa da origem geográfica em casos reais em que se busque a identificação de corpos e ossadas, contribuindo com as Ciências Forenses, a Justiça e a sociedade.

REFERÊNCIAS*

1. Fórum Brasileiro de Segurança Pública. Segurança pública em números 2018. [acesso 2020 jan 12]. Disponível em: http://www.forumseguranca.org.br/wp-content/uploads/2019/02/Infografico_an12_atualizado.pdf.
2. Ministério Público do Estado de São Paulo. Estatística de notícias desaparecimento e encontro de pessoa no Estado de São Paulo. [acesso 2020 jan 12]. Disponível em: <http://www.mpsp.mp.br/portal/page/portal/plid/estatisticas>.
3. Meier-Augenstein W, Fraser I. Forensic isotope analysis leads to identification of a mutilated murder victim. *Sci Justice*. 2008; 48(3): 153-9.
4. Font L, van der Peijl G, van Leuwen C, van Wetten I, Davies GR. Identification of the geographical place of origin of an unidentified individual by multi-isotope analysis. *Sci Justice*. 2015; 55(1): 34-42.
5. Font L, Jonker G, van Aalderen PA, Schiltmans EF, Davies GR. Provenancing of unidentified World War II casualties: application of strontium and oxygen isotope analysis in tooth enamel. *Sci Justice*. 2015; 55(1): 10-7.
6. Keller AT, Regan LA, Lundstrom CC, Bower NW. Evaluation of the efficacy of spatiotemporal Pb isoscapes for provenancing of human remains. *Forensic Sci Int*. 2016; 261: 83-92.
7. Someda H, Gakuhari T, Akai J, Araki Y, Kodera T, Tsumatori G, et al. Trial application of oxygen and carbon isotope analysis in tooth enamel for identification of past-war victims for discriminating between Japanese and US soldiers. *Forensic Sci Int*. 2016;261: 166.e1-5.
8. Chesson LA, Tipple BJ, Ehleringer JR, Park T, Bartelink EJ. Forensic applications of isotope landscapes (“isoscapes”): a tool for predicting region-of-origin in forensic anthropology cases. In: Boyd Jr CC, Boyd DC. *Forensic anthropology: theoretical framework and scientific basis*. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc.; 2018.
9. Grolmusova Z, Rapcanova A, Michalko J, Cech P, Veis P. Stable isotope composition of human fingernails from Slovakia. *Sci Total Environ*. 2014;496: 226-32.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

10. Ehleringer JR, Bowen GJ, Chesson LA, West AG, Podlesak DW, Cerling TE. Hydrogen and oxygen isotope ratios in human hair are related to geography. *PNAS*. 2008;105(8): 2788-93.
11. Warner MM, Plemons AM, Herrmann NP, Regan LA. Refining stable oxygen and hydrogen isoscapes for the identification of human remains in Mississippi. *J Forensic Sci*. 2018;63(2): 395-402.
12. Jaouen K, Herrscher E, Balter V. Copper and zinc isotope ratios in human bone and enamel. *Am J Phys Anthropol*. 2017;162(3): 491-500.
13. Alkass K, Saitoh H, Buchholz BA, Bernard S, Holmlund G, Senn DR, et al. Analysis of radiocarbon, stable isotopes and DNA in teeth to facilitate identification of unknown decedents. *PLoS One*. 2013;8(7): e69597.
14. Pryor AJE, Stevens RE, O'Connell TC, Lister JR. Quantification and propagation of errors when converting vertebrate biomineral oxygen isotope data to temperature for palaeoclimate reconstruction. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*. 2014;412: 99-107.
15. Pollard AM, Pellegrini M, Lee-Thorp JA. Technical note: some observations on the conversion of dental enamel $\delta^{18}O_p$ values to $\delta^{18}O_w$ to determine human mobility. *Am J Phys Anthropol*. 2011;145(3): 499-504.
16. Badea M, Luzardo OP, Gonzalez-Antuna A, Zumbado M, Rogozea L, Floroian L, et al. Body burden of toxic metals and rare earth elements in non-smokers, cigarette smokers and electronic cigarette users. *Environ Res*. 2018;166: 269-75.
17. Petzke KJ, Feist T, Fleig WE, Metges CC. Nitrogen isotopic composition in hair protein is different in liver cirrhotic patients. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2006;20(19): 2973-8.
18. Taran K, Fraczek T, Sikora-Szubert A, Sitkiewicz A, Mlynarski W, Kobos J, et al. The first investigation of Wilms' tumour atomic structure-nitrogen and carbon isotopic composition as a novel biomarker for the most individual approach in cancer disease. *Oncotarget*. 2016;7(47): 76726-34.
19. Brettell R, Montgomery J, Evans J. Brewing and stewing: the effect of culturally mediated behaviour on the oxygen isotope composition of ingested fluids and the implications for human provenance studies. *J Anal At Spectrom*. 2012;27: 778-85.

20. Gragnani JG, Garavello ME, Silva RJ, Nardoto GB, Martinelli LA. Can stable isotope analysis reveal dietary differences among groups with distinct income levels in the city of Piracicaba (southeast region, Brazil)? *J Hum Nutr Diet*. 2014;27(3): 270-9.
21. Kamakura WA, Mazzon JA. Socioeconomic status and consumption in an emerging economy. *Int J Mark*. 2013; 30(1): 4-18.
22. Aranha F. *Bioquímica do sistema dental*. 2.ed. São Paulo: Sarvier; 2002.
23. Alkass K, Buchholz BA, Druid H, Spalding KL. Analysis of ^{14}C and ^{13}C in teeth provides precise birth dating and clues to geographical origin. *Forensic Sci Int*. 2011;209(1-3): 34-41.
24. Regan LA. Isotopic determination of region of origin in modern peoples: Applications for identification of U.S. war-dead from the Vietnam Conflict [tese de doutorado]. Gainesville: University of Florida; 2006. [acesso 2020 jan 12]. Disponível em: http://etd.fcla.edu/UF/UFE0015561/regan_l.pdf.
25. Kamenov GD, Curtis JH. Using carbon, oxygen, strontium, and lead isotopes in modern human teeth for forensic investigations: a critical overview based on data from Bulgaria. *J Forensic Sci*. 2017;62(6): 1452-9.
26. Juarez CA. Strontium and geolocation, the pathway to identification for deceased undocumented mexican border-crossers: a preliminary report. *J Forensic Sci*. 2008;53(1): 46-9.
27. Eck CJ, DiGangi EA, Bethard JD. Assessing the efficacy of isotopic provenancing of human remains in Colombia. *Forensic Sci Int*. 2019; 302: 109919.
28. Stringer C. What makes a modern human. *Nature*. 2012; 485(7396): 33-5.
29. Brasil. Código Civil Brasileiro. Lei nº 12030 de 17 de setembro de 2009. Dispõe sobre as perícias oficiais e dá outras providências. [acesso 2020 abril 15]. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2009/lei/L12030.htm.
30. Ducatti C. *Isótopos estáveis ambientais [Apostila]*. Botucatu: Centro de Isótopos Estáveis Ambientais do Departamento de Física e Biofísica da Unesp; 2007.
31. Delabarde T, Ludes B. *Manuel pratique d'Anthropologie Médico-Légale*. France: Eska; 2014.

32. Schuh C, Makarewicz CA. Tracing residential mobility during the Merovingian period: an isotopic analysis of human remains from the Upper Rhine Valley, Germany. *Am J Phys Anthropol.* 2016;161(1): 155-69.
33. McLean SJ, Ikegaya H, Saukko PJ, Zheng HY, Itoh K, Fushiki S. The utilization of stable isotope analysis for the estimation of the geographic origins of unidentified cadavers. *Forensic Sci Int.* 2014;245: 45-50.
34. Jaouen K, Beasley M, Schoeninger M, Hublin J-J, Richards MP. Zinc isotope ratios of bones and teeth as new dietary indicators: results from a modern food web (Koobi Fora, Kenya). *Scientific Reports.* 2016;6(1): 26281.
35. Grimmeisen F, Lehmann MF, Liesch T, Goeppert N, Klinger J, Zopfi J et al. Isotopic constraints on water source mixing, network leakage and contamination in an urban groundwater system. *Sci Total Environ.* 2017;583: 202-13.
36. Zhao X, Yan X, Xie Y, Wang S, Xing G, Zhu Z. Use of nitrogen isotope to determine fertilizer- and soil-derived ammonia volatilization in a rice/wheat rotation system. *J Agric Food Chem.* 2016;64(15): 3017-24.
37. Laffoon JE, Hoogland MLP, Davies GR, Hofman CL. A multi-isotope investigation of human and dog mobility and diet in the Pre-Colonial Antilles. *Environmental Archaeology.* 2017;24(2): 132-48.
38. Müldner G, Chenery C, Eckardt H. The 'Headless Romans': multi-isotope investigations of an unusual burial ground from Roman Britain. *J Arch Sci.* 2011;38(2): 280-90.
39. Dunne J, Rebay-Salisbury K, Salisbury RB, Frisch A, Walton-Doyle C, Evershed RP. Milk of ruminants in ceramic baby bottles from prehistoric child graves. *Nature.* 2019;574(7777): 246-8.
40. Som S, De A, Banik GD, Maity A, Ghosh C, Pal M, et al. Mechanisms linking metabolism of *Helicobacter pylori* to ^{18}O and ^{13}C -isotopes of human breath CO_2 . *Scientific Reports.* 2015;5(1): 10936.
41. Hynson NA. The carbon and nitrogen ecophysiologicals of two endemic tropical orchids mirrors those of their temperate relatives and the local environment. *R Soc Open Sci.* 3(11): 160427.
42. Linnebjerg JF, Hobson KA, Fort J, Nielsen TG, Møller P, Wieland K et al. Deciphering the structure of the West Greenland marine food web using stable isotopes ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$). *Mar Biol.* 2016;163: 230-45.

43. Sun S, Guo B, Wei Y. Origin assignment by multi-element stable isotopes of lamb tissues. *Food Chem.* 2016;213: 675-81.
44. Vinciguerra V, Stevenson R, Pedneault K, Poirier A, Helie JF, Widory D. Strontium isotope characterization of wines from Quebec, Canada. *Food Chem.* 2016;210: 121-8.
45. Kawashima H, Suto M, Suto N. Stable carbon isotope ratios for organic acids in commercial honey samples. *Food Chem.* 2019;289: 49-55.
46. Bizjak Bat K, Eler K, Mazej D, Mozetič Vodopivec B, Mulič I, Kump P et al. Isotopic and elemental characterisation of Slovenian apple juice according to geographical origin: preliminary results. *Food Chem.* 2016;203: 86-94.
47. Phillips SA, Doyle S, Philp L, Coleman M. Network developing forensic applications of stable isotope ratio mass spectrometry conference 2002. *Sci Justice.* 2003;43(3): 153-60.
48. Reidy LJ, Meier-Augenstein W, Kalin RM. ^{13}C -Isotope ratio mass spectrometry as a potential tool for the forensic analysis of white architectural paint: a preliminary study. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2005;19(13): 1899-905.
49. Bartelink EJ, Berg GE, Chesson LA, Tipple BJ, Beasley MM, Prince-Buitenhuys JR et al. Applications of stable isotope forensics for geolocating unidentified human remains from past conflict situations and large-scale humanitarian efforts. In: Latham KE, Bartelink EJ, Finnegan M. *New perspectives in forensic human skeletal identification.* Cambridge: Academic Press; 2018. p. 175-84.
50. Fraser I, Meier-Augenstein W, Kalin RM. The role of stable isotopes in human identification: a longitudinal study into the variability of isotopic signals in human hair and nails. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2006;20(7): 1109-16.
51. Muccio Z, Jackson GP. Isotope ratio mass spectrometry. *Analyst.* 2009;134(2): 213-22.
52. Schwarcz HP, White CD, Longstaffe FJ. Stable and radiogenic isotopes in biological Archaeology: some applications. In: West JB, Bowen GJ, Dawson TE, Tu KP. *Isoscapes: understanding movement, pattern, and process on earth through isotope mapping.* Dordrecht: Springer; 2010.p.335-56.
53. Bryant JD, Koch PL, Froelich PN, Showers WJ, Genna BJ. Oxygen isotope partitioning between phosphate and carbonate in mammalian apatite. *Geochim Cosmochim Acta.* 1996;60(24): 5145-8.

54. Chenery CA, Pashley V, Lamb AL, Sloane HJ, Evans JA. The oxygen isotope relationship between the phosphate and structural carbonate fractions of human bioapatite. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2012;26(3): 309-19.
55. Gat JR. Comments on the stable isotope method in regional groundwater investigations. *Water Resour Res*. 1971;7(4): 980-93.
56. Bowen GJ. Isoscapes: spatial pattern in isotopic biogeochemistry. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*. 2010;38(1): 161-87.
57. Lin GP, Rau YH, Chen YF, Chou CC, Fu WG. Measurements of δD and $\delta^{18}O$ stable isotope ratios in milk. *Journal of Food Science*. 2003;68(7): 2192-5.
58. Daux V, Lecuyer C, Heran MA, Amiot R, Simon L, Fourel F et al. Oxygen isotope fractionation between human phosphate and water revisited. *J Hum Evol*. 2008;55(6): 1138-47.
59. Widory D. Oxygen and nitrogen isotopic fractionations during human respiration. *C R Biol*. 2004;327(8): 729-34.
60. Lightfoot E, O'Connell TC. On the use of biomineral oxygen isotope data to identify human migrants in the archaeological record: intra-sample variation, statistical methods and geographical considerations. *PLoS One*. 2016;11(4): e0153850.
61. Coplen TB. Normalization of oxygen and hydrogen isotope data. *Chemical Geology: Isotope Geoscience section*. 1988;72(4): 293-7.
62. Beaumont J, Montgomery J. The great Irish famine: identifying starvation in the tissues of victims using stable isotope analysis of bone and incremental dentine collagen. *PLoS One*. 2016;11(8): e0160065.
63. Gueguen F, Stille P, Lahd Geagea M, Perrone T, Chabaux F. Atmospheric pollution in an urban environment by tree bark biomonitoring - part II: Sr, Nd and Pb isotopic tracing. *Chemosphere*. 2012;86(6): 641-7.
64. Melnyk LJ, Donohue MJ, Pham M, Donohue J. Absorption of strontium by foods prepared in drinking water. *J Trace Elem Med Biol*. 2019;53: 22-6.
65. Dahl SG, Allain P, Marie PJ, Mauras Y, Boivin G, Ammann P, et al. Incorporation and distribution of strontium in bone. *Bone*. 2001;28(4): 446-53.
66. Gulson BL, Gillings BR. Lead exchange in teeth and bone - a pilot study using stable lead isotopes. *Environmental health perspectives*. 1997;105(8): 820-4.

67. McLean SJ, Ikegaya H, Saukko PJ, Zheng HY, Akutsu T, Miyamori D et al. A trial of the utilization of stable isotope analysis for the estimation of the geographic origins of unidentified cadavers. *Forensic Sci Int.* 2013;232(1-3): 237.e1-5.
68. Katchburian E, Arana VEC. *Histologia e embriologia oral: texto, atlas, correlações clínicas.* 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2012.
69. Reid DJ, Dean MC. Variation in modern human enamel formation times. *J Hum Evol.* 2006;50(3): 329-46.
70. Snoeck C, Pellegrini M. Comparing bioapatite carbonate pre-treatments for isotopic measurements: part 1—Impact on structure and chemical composition. *Chemical Geology.* 2015;417: 394-403.
71. LeGeros RZ. Apatites in biological systems. *Prog Crystal Growth Charact.* 1981;4(1): 1-45.
72. Reade H, Stevens RE, Barker G, O'Connell TC. Tooth enamel sampling strategies for stable isotope analysis: potential problems in cross-method data comparisons. *Chemical Geology.* 2015;404: 126-35.
73. AlQahtani SJ, Hector MP, Liversidge HM. The London atlas of human tooth development and eruption. *Am J Phys Anthropol.* 2010;142(3): 481-90.
74. Vautour G, Poirier A, Widory D. Tracking mobility using human hair: what can we learn from lead and strontium isotopes? *Sci Justice.* 2015;55(1): 63-71.
75. Geagea ML, Stille P, Gauthier-Lafaye F, Millet M. Tracing of industrial aerosol sources in an urban environment using Pb, Sr, and Nd isotopes. *Environ Sci Technol.* 2008;42(3): 692-8.
76. Böhlke JK, Horan M. Strontium isotope geochemistry of groundwaters and streams affected by agriculture, Locust Grove, MD. *Applied Geochemistry.* 2000;15(5): 599-609.
77. Grimes V, Pellegrini M. A comparison of pretreatment methods for the analysis of phosphate oxygen isotope ratios in bioapatite. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2013;27(3): 375-90.
78. Koch PL, Tuross N, Fogel ML. The effects of sample treatment and diagenesis on the isotopic integrity of carbonate in biogenic hydroxylapatite. *J Archaeol Sci.* 1997;24(5): 417-29.

79. Pellegrini M, Lee-Thorp JA, Donahue RE. Exploring the variation of the $\delta^{18}\text{O}_\text{p}$ and $\delta^{18}\text{O}_\text{c}$ relationship in enamel increments. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*. 2011;310(1): 71-83.
80. Jeffrey A, Denys C, Stoetzel E, Lee-Thorp JA. Influences on the stable oxygen and carbon isotopes in gerbillid rodent teeth in semi-arid and arid environments: implications for past climate and environmental reconstruction. *Earth Planet Sci Lett*. 2015;428: 84-96.
81. Pellegrini M, Snoeck C. Comparing bioapatite carbonate pre-treatments for isotopic measurements: part 2 – impact on carbon and oxygen isotope compositions. *Chemical geology*. 2016;420: 8.
82. Wunder MB. Using isoscapes to model probability surfaces for determining geographic origins. In: West JB, Bowen GJ, Dawson TE, Tu KP. *Isoscapes: understanding movement, pattern, and process on earth through isotope mapping*. Dordrecht: Springer; 2010.p.251-72.
83. IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [homepage na Internet]. Brasil: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística; 2018-2019 [acesso 2020 fev 7]. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/sp.html>
84. Garcia MDGM, Brilha J, Lima FF, Vargas JC, Pérez-Aguilar A, Alves A, et al. The inventory of geological heritage of the state of São Paulo, Brazil: methodological Basis, results and perspectives. *Geoheritage*. 2018; 10: 239-58.
85. São Paulo (Estado). Secretaria de Saneamento e Recursos Hídricos. Universidade Estadual Paulista. Águas subterrâneas no estado de São Paulo. Diretrizes de utilização e proteção. Departamento de Águas e Energia Elétrica, Instituto Geociências e Ciências Exatas. Laboratório de Estudo de Bacias. São Paulo: DAEE/LEBAC; 2013. [acesso 2020 fev 7]. Disponível em: [http://www.daee.sp.gov.br/acervoepesquisa/Atlas%20-%20Águas%20Subterrâneas%20\(DAEE-LEBAC\).pdf](http://www.daee.sp.gov.br/acervoepesquisa/Atlas%20-%20Águas%20Subterrâneas%20(DAEE-LEBAC).pdf)
86. Mapa de águas subterrâneas do estado de São Paulo: escala 1:1.000.000: nota explicativa. São Paulo: DAEE - Departamento de Águas e Energia Elétrica: IG-Instituto Geológico : IPT- Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo: CPRM- Serviço Geológico do Brasil; 2005. [acesso 2020 fev 7]. Disponível em: <https://www.infraestruturameioambiente.sp.gov.br/wp-content/uploads/sites/233/2012/03/Nota%20Explicativa%20Mapa%20Aguas%20Subterraneas.pdf>

87. Torres HG, Ferreira MP, Dini NP. Indicadores sociais. Por que construir novos indicadores como IPRS. São Paulo em Perspectiva. 2003; 17(3-4): 80-90.
88. IPRS – Índice Paulista de Responsabilidade Social [homepage na internet]; 2006-2008 [acesso em 2020 fev 7]. Disponível em: <https://iprs.seade.gov.br/#>
89. IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [homepage na Internet]. Pesquisa de orçamentos familiares; 2018-2019 [acesso 2020 fev 7]. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv101670.pdf>
90. IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [homepage na Internet]. Pesquisa de orçamentos familiares; 2002-2003 [acesso 2020 fev 7]. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv81847.pdf>
91. IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [homepage na Internet]. Pesquisa de orçamentos familiares; 2008-2009 [acesso 2020 fev 7]. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv47307.pdf>
92. Demirjian A, Goldstein H, Tanner JM. A new system of dental age assessment. Hum Biol. 1973;45(2): 211-27.
93. AlQahtani SJ. Atlas of human tooth development and eruption [figure]. London: Queen Mary University of London; 2009. [acesso 2020 jan 12]. Disponível em: https://www.qmul.ac.uk/dentistry/media/dentistry/images/atlas/atlas_of_tooth_development_in_English.pdf.
94. Associação Brasileira de Empresas de Pesquisa. Critério de Classificação Econômica Brasil; 2015. [acesso 2017 set 10]. Disponível em: <http://www.abep.org/criterio-brasil>.
95. Santos MA, Bernardes-de-Oliveira MEC, Sant'anna LG. Evidências paleoclimáticas e paleoecológicas, segundo dados paleobotânicos e mineralógicos, dos argilitos neógenos de Jaguariúna (SP), correlatos à formação Rio Claro (2007). Revista UnG. 2007; 6(1): 80-106. Disponível em: <http://revistas.ung.br/index.php/geociencias/article/view/136>
96. IPRS – Índice Paulista de Responsabilidade Social [homepage na internet]; 2010-2012 [acesso 2020 fev 7]. Disponível em: <https://iprs.seade.gov.br/#>
97. Kootker LM, Mbeki L, Morris AG, Kars H, Davies GR. Dynamics of Indian ocean slavery revealed through isotopic data from the Colonial Era Cobern Street Burial Site, Cape Town, South Africa (1750-1827). Plos One. 2016; 11(6): e0157750.

98. Arango H. Bioestatística teórica e computacional. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2009.
99. Ehleringer JR, Thompson AH, Podlesak D, Bowen GJ, Chesson LA, Cerling TE et al. A framework for the incorporation of isotopes and isoscapes in geospatial forensic investigations. In: West JB, Bowen GJ, Dawson TE, Tu KP. Isoscapes: understanding movement, pattern, and process on earth through isotope mapping. Dordrecht: Springer; 2010.p.357-88.
100. Kennedy CD, Bowen GJ, Ehleringer JR. Temporal variation of oxygen isotope ratios ($\delta^{18}\text{O}$) in drinking water: implications for specifying location of origin with human scalp hair. *Forensic Sci Int.* 2011; 208 (1-3): 156-66.
101. Bowen GJ, Ehleringer JR, Chesson LA, Stange E, Cerling TE. Stable isotope ratios of tap water in the contiguous United States. *Water Resources Research.* 2007; 43(3): 1-12.
102. Nardoto GB, Ribeiro JF, Sena-Souza JP, Guaraldo AC, Saquetti CH. Rastreamento Forense: uso dos isótopos estáveis no combate ao crime. In: Costa FJV, Ferreira JM, Monteiro KRG, Mayrink RR. Ciência contra o tráfico - avanços no combate ao comércio ilegal de animais silvestres. João Pessoa: Imprel Editora; 2017.p.51-78.
103. Mero F, Gilboa Y. A methodology for the rapid evaluation of groundwater resources, Sao Paulo State, Brazil. *Hydrological Sciences Bulletin*; 1974. 19(3): 347-58.
104. Rocha-Júnior ERV, Marques LS, Babinski M, Nardy AJR, Figueiredo AMG, Machado FB. Sr–Nd–Pb isotopic constraints on the nature of the mantle sources involved in the genesis of the high-Ti tholeiites from northern Paraná Continental Flood Basalts (Brazil). *J S Am Earth Sci.* 2013; 46: 9-25.
105. Elliot T, Bonotto DM. Hydrogeochemical and isotopic indicators of vulnerability and sustainability in the GAS aquifer, São Paulo State, Brazil. *Journal of Hydrology: Regional Studies.* 2017; 14: 130-149.
106. Hoegh-Guldberg O, Northrop E, Lubchenco J. The ocean is key to achieving climate and societal goals. *Science.* 2019; 365(6460): 1372-4.

APÊNDICE A - QUESTIONÁRIO



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA
FILHO" (UNESP)
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA



Pesquisa: Antropologia Forense e estimativa da origem geográfica: análise de isótopos estáveis de carbono e oxigênio em esmalte dentário.

Preenchimento pelo dentista

Identificador: _____

Número dos dentes: _____

Questões:

1) Data de nascimento (dia/mês/ano): ____/____/____

2) Sexo: ☐ Masculino ☐ Feminino

3) Você fuma atualmente? ☐ Sim ☐ Não

4) Das opções abaixo, circule as referentes ao seu **principal** tipo de dieta dos 7 aos 14 anos:

Arroz, feijão, soja, trigo, frutas, hortaliças, mandioca, milho, cana-de-açúcar, carne vermelha, frango, peixe, leite.

5) Você teve alguma dessas doenças durante sua **infância/adolescência**?

Problemas hormonais (hipófise, tireóide) ☐ Sim ☐ Não
Falta de vitaminas (vitaminas A e D) ☐ Sim ☐ Não
Falta de proteínas ☐ Sim ☐ Não
Problemas de calcificação (ossos e dentes) ☐ Sim ☐ Não
Outra doença que considere relevante: _____

6) Em quais cidades você já viveu? (dos 7 os 14 anos).

	De (anos)	Até (anos)	Cidade	Estado	País
Ex.	7	8	Campinas	SP	Brasil
	8	14	São Paulo	SP	Brasil
1)					
2)					
3)					
4)					
5)					
6)					
7)					

7) Durante sua infância você consumiu mais água:

☐ de torneira ☐ de garrafa (Você lembra da marca? Qual era? _____)

8) Quando você era criança/adolescente (7-14 anos) você morou **predominantemente** em:

☐ Zona urbana
☐ Zona rural

9) Quantos itens de conforto havia na sua casa (durante os 7 aos 14 anos)?

Itens de conforto	Quantidade				
	0	1	2	3	4+
Quantidade de automóveis de passeio exclusivamente para uso particular					
Quantidade de empregadas mensalistas (5 dias por semana)					
Quantidade de máquinas de lavar roupa – tanquinho não conta					
Quantidade de vasos sanitários					
Quantidade de leitores de DVD					
Quantidade de geladeira					
Quantidade de freezers					
Quantidade de microcomputadores (computadores de mesa, laptops, notebooks)					
Quantidade de lavadora de louças					
Quantidade de forno de micro-ondas					
Quantidade de motocicletas de uso pessoal ou misto (pessoal e profissional)					
Quantidade de máquinas secadoras de roupas/ lava e seca					

10) A água usada na sua casa, dos 7 aos 14 anos, era proveniente de:

1	Rede geral de distribuição	
2	Poço ou nascente	
3	Outro meio	

11) Considerando o trecho da rua da sua casa (onde você morou dos 7-14 anos), você diria que a rua era:

1	Pavimentada/Asfaltada	
2	Terra/ cascalho	

12) Qual era o grau de instrução do chefe da família na época que você tinha 7-14 anos? Considere como chefe da família a pessoa que contribuiu com a maior parte da renda do domicílio:

1	Analfabeto/ Primário incompleto	
2	Primário completo/ ginásio incompleto	
3	Fundamental completo/médio incompleto	
4	Médio completo/superior incompleto	
5	Superior completo	

ANEXO A – CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

unesp  **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
CAMPUS DE ARARAQUARA

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS**

Rua Humaitá, 1680 - 14801-903 Araraquara - SP - FONE: 0xx16 3301-6432 - FAX: 0xx16 33016433

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins, que o projeto de pesquisa CAAE nº 90922418.7.0000.5416, intitulado ***“ANTROPOLOGIA FORENSE E ESTIMATIVA DA ORIGEM GEOGRÁFICA: ANÁLISE DE ISÓTOPOS ESTÁVEIS DE CARBONO E OXIGÊNIO EM ESMALTE DENTÁRIO”***, de responsabilidade da Profa. Dra. **MÔNICA DA COSTA SERRA**, foi aprovado por este CEP em 21/06/2018.

Araraquara, 03 de setembro de 2018.


Prof. Dra. Andréa Gonçalves
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
da Faculdade de Odontologia

Não autorizo a publicação deste trabalho até 19 de março de 2022.

Direitos de publicação reservado ao autor

Araraquara, 19 de março de 2020.

Lara Maria Herrera