

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

TAÍS RIBEIRO MUNIZ

**ANÁLISE DE ISÓTOPOS ESTÁVEIS EM TECIDOS HUMANOS ORGÂNICOS E  
BIOMINERAIS APLICADA À ANTROPOLOGIA FORENSE**

CURITIBA

2017

TAÍS RIBEIRO MUNIZ

**ANÁLISE DE ISÓTOPOS ESTÁVEIS EM TECIDOS HUMANOS ORGÂNICOS E  
BIOMINERAIS APLICADA À ANTROPOLOGIA FORENSE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à disciplina GC132 - *Trabalho de Conclusão de Curso II*, como requisito parcial para obtenção de grau de Bacharel em Geologia na Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cristina Valle Pinto-Coelho.

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Anelize Manuela Bahniuk Rumbelsperger.

CURITIBA

2017

*...aos meus pais, que alicerçaram meu crescimento como ser humano, e a todas as mulheres que ousam questionar os duvidosos preceitos de nossa sociedade.*

## AGRADECIMENTOS

Às Prof<sup>as</sup> Dr<sup>a</sup> Anelize Manuela Bahniuk Rumbelsperger e Dr<sup>a</sup> Cristina Valle Pinto-Coelho pela orientação e acompanhamento durante a pesquisa, bem como em minha jornada pela graduação.

Ao Dr. Thiago Gomes da Silva, por todo o tempo dedicado à análise de amostras, apoio durante o processo de interpretação de dados e valiosas dicas e sugestões.

À equipe do Laboratório de Análise de Minerais e Rochas (LAMIR - UFPR) por todos os dias de convivência harmoniosa e especificamente ao técnico Douglas pelo apoio com as análises e operação do espectrômetro.

Ao Prof. Dr. Rubens Alexandre de Faria e sua orientanda Lucilene Yumi Ishida, pelo suporte com a preparação de alguns dentes.

Pela doação de amostras, agradeço ao odontólogos Prof. Dr. Paulo Henrique Couto e Dr. Ademir Franco, assim como a Rafael, Bruno, Ismael, Mariam, Clara e seus responsáveis.

Ao Prof. Dr. Vladimir Eliodoro Costa, Cibele Regina Kruliski e toda a equipe do Centro de Isótopos Estáveis Prof. Dr. Carlos Ducatti (CIE - UNESP) pelo acolhimento e tempo despendido na orientação, preparação e análise de amostras orgânicas.

Aos amigos e familiares pela paciência, apoio e puxões de orelha.

Às maravilhosas Janaína Pereira Duarte e Bianca Lemos Rocha, pelo nosso casamento geológico tão harmonioso que venceu os obstáculos de penosas disciplinas e noites em claro diante da tela de um notebook.

Aos peritos do SETEC/PF/PR que demonstram interesse nas pesquisas desenvolvidas e na parceria com a comunidade acadêmica, sobretudo ao Dr. Fábio Augusto da Silva Salvador, que me apontou o caminho e me permitiu encontrar minha vocação, à qual me dedicarei pelo resto de minha vida.

Por fim, mas não menos importante, ao Prof. Dr. José Manoel dos Reis Neto (*in memoriam*) por todos os dias de orientação, dedicação, apoio e, de modo geral, fomento dos meus então primeiros passos num longo caminho de dedicação à pesquisa científica no Brasil. Muito obrigada, Professor, sem você nada disso teria sido possível.

*“There is a pleasure in the pathless woods,  
There is a rapture on the lonely shore,  
There is society, where none intrudes,  
By the deep Sea, and music in its roar:  
I love not Man the less, but **Nature** more.  
From these our interviews, in which I steal  
From all I may be, or have been before,  
To mingle with the **Universe**, and feel  
What I can ne'er express, yet cannot all conceal.”*

Trecho de “A peregrinação de Childe Harold”, **Lord Byron** (1788 - 1824)

## RESUMO

A análise de isótopos estáveis para determinação de razões isotópicas é uma técnica que pode ser aplicada a diversas áreas do conhecimento, incluindo a Antropologia Forense, onde pode ser utilizada como ferramenta auxiliar no processo de identificação de cadáveres ou mesmo indivíduos vivos com origem desconhecida, como crianças vítimas de tráfico humano. Mais comumente, é útil na determinação da origem geográfica sobretudo de restos humanos esqueletizados, onde técnicas clássicas, como perfilagem de DNA, se mostram insatisfatórias. Já existem registros, na literatura internacional, de investigações criminais solucionadas em parte devido à contribuição de resultados obtidos a partir da espectrometria de massa de razões isotópicas, porém, poucos são os trabalhos que apresentam de maneira clara os protocolos ideais para aplicação da técnica em Criminalística, sobretudo levando em consideração o atual cenário da perícia criminal no Brasil, bastante precária se comparada a países desenvolvidos, onde não há menor carências de verbas, infraestrutura e pessoal como em países latino-americanos. Avaliando o cenário atual de desenvolvimento das Ciências Forenses no Brasil, considerando os mais diversos obstáculos, desafios e limitações, torna-se bastante evidente a importância da contribuição da comunidade acadêmica à causa, com a realização de experimentos e desenvolvimento de procedimentos padrões facilmente reproduzíveis em escala nacional, suficientemente confiáveis para utilização pelo sistema de Justiça criminal brasileiro. O presente trabalho descreve os métodos e resultados de experimentos relacionados à aplicação da análise de isótopos estáveis para determinação de assinaturas isotópicas de tecidos humanos, voltados para a compreensão da importância de adoção de procedimentos consistentes e para a observação de processos de fracionamento isotópico que influenciam os resultados obtidos e dificultam a interpretação dos dados. Amostras de cabelo, unhas e dentes humanos foram preparadas e analisadas em espectrômetro de massa, dando atenção a eventuais variações dos valores devido a alterações propositais de fatores externos, como pH do ambiente e exposição a produtos químicos. Os dados obtidos permitiram concluir que os processos de fracionamento desencadeados internamente no organismo de indivíduos são preponderantes, sendo portanto pouco afetados por processos mais superficiais aos quais as amostras possam ser submetidas, o que contribui para a confirmação da fidedignidade da técnica. Entretanto, trata-se apenas de um pequeno passo na jornada de aperfeiçoamento da aplicação, que demanda a aumento do espaço amostral e da acurácia do método.

Palavras-chave: isótopos estáveis, Geoquímica isotópica, Antropologia Forense, tecidos humanos.

## ABSTRACT

Stable isotope analysis for the determination of isotopic ratios is a technique that can be applied to several areas of knowledge, including Forensic Anthropology, where it can be used as an auxiliary tool in the identification process of deceased human bodies or even living individuals of unknown origin, such as child victims of human trafficking. More commonly, it is useful in the determination of geographical origin of human skeletonized remains, where classical techniques, such as DNA profiling, are unsatisfactory. There are many records in the international literature of criminal investigations solved in part due to the contribution of results obtained from Isotope Ratio Mass Spectrometry, however there are few papers that present in a clear way the ideal protocols for application of the technique in Criminalistics, especially considering the current scenario of criminal investigation in Brazil, which is considerably behind developed countries, where there are no shortages of funds, infrastructure and personnel as in Latin America. Considering the most diverse range of obstacles, challenges and limitations, it is very evident the importance of the academic community's contribution to the cause, with the carrying out of experiments and the development of standard procedures easily reproducible in national scale and sufficiently reliable for use by the Brazilian criminal justice system. The present research describes the methods and results of experiments related to the application of stable isotope analysis for the determination of isotopic signatures of human tissues, aimed at understanding the importance of adopting consistent procedures and observing isotopic fractionation processes that influence the obtained results and make it difficult to interpret the data. Human hair samples, nails and teeth were prepared and analyzed in mass spectrometers, paying attention to possible variations of values due to purposive changes of external factors such as pH of the environment and exposure to chemicals. The obtained data allowed to conclude that the fractionation processes triggered internally in the body of individuals are preponderant, being therefore little affected by more superficial processes to which the samples can be submitted, which contributes to the confirmation of the trustworthiness of the technique. However, it is only a small step in the process of improving the application, which demands the expansion of the sample space and the accuracy of the method.

Keywords: Stable isotopes, isotope Geochemistry, Forensic Anthropology, human tissues.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Representação simplificada da anatomia de um dente humano.....	16
FIGURA 2 - Representação de uma seção transversal de cabelo humano.....	17
FIGURA 3 - Amostra de dente cortada longitudinalmente para realização de experimento....	22
FIGURA 4 - Registro fotográfico das ferramentas utilizadas durante o processo de pulverização de dentes em gral de ágata.....	22
FIGURA 5 - Diagramas representando as porcentagens aproximadas de elementos químicos presentes na crosta terrestre e no corpo humano.....	27
FIGURA 6 - Esquema representando os padrões de variação das assinaturas isotópicas de oxigênio-18 em função do ambiente.....	28
FIGURA 7 - Mapa global de distribuição média anual de razões isotópicas de oxigênio-18 em águas pluviais.....	29
FIGURA 8 - Esquema representando a variação de assinaturas isotópicas de carbono em diferentes ambientes e tipos vegetais.....	30
FIGURA 9 - Representação gráfica do padrão geral de variação do delta-C-13 em uma cadeia trófica.....	31
FIGURA 10 - Representação gráfica da variação de assinatura isotópica do nitrogênio-15 nos tecidos de animais e plantas em uma cadeia alimentar hipotética.....	33
FIGURA 11 - Ilustração dos mecanismos internos presentes em um espectrômetro.....	34
FIGURA 12 - Amostra de dente após permanecer submersa em vinagre por 5 meses.....	41



## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Descrição simplificada dos procedimentos pré-análise adotados para amostras orgânicas específicas.....	25
TABELA 2 - Assinaturas isotópicas obtidas a partir de amostras de dentes humanos provenientes do Paraguai, Amazonas e Ceará.....	36
TABELA 3 - Valores de delta-C-13 e delta-N-15 obtidos para amostras de unha.....	37
TABELA 4 - Lista dos valores de assinatura isotópica determinados para seis amostras de cabelo humano, naturais ou modificados por procedimentos estéticos.....	39

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - Representação gráfica da variação das assinaturas isotópicas de carbono-13 de amostras de unha em função da data de coleta.....	37
GRÁFICO 2 - Gráfico representando a variação das assinaturas isotópicas de nitrogênio-15 de amostras de unha, em função da data de coleta.....	38
GRÁFICO 3 - Representação gráfica de todos os resultados obtidos a partir de amostras de unha.....	38
GRÁFICO 4 - Disposição gráfica dos resultados de C e N obtidos para cabelos humanos..	39
GRÁFICO 5 - Disposição dos dados de amostras de dente de diferentes localidades do Brasil.....	41

## LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS

UFPR - Universidade Federal do Paraná

LAMIR - Laboratório de Análise de Minerais e Rochas

IRMS - *Isotope Ratio Mass Spectrometry* (Espectrometria de massa de razões isotópicas)

C - Carbono

O - Oxigênio

N - Nitrogênio

H - Hidrogênio

AIE - análise de isótopos estáveis

‰ - permil ou partes por mil (unidade)

δ - delta (notação de razões isotópicas)

V-SMOW - *Vienna Standard Mean Ocean Water*

VPDB - *Vienna PeeDee Belemnite*

CAM - Metabolismo ácido de crassulárias (tipo vegetal)

C<sub>3</sub> e C<sub>4</sub> - Tipos vegetais com ciclos metabólicos específicos

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	14
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
<b>3 TECIDOS HUMANOS E SUA IMPORTÂNCIA FORENSE</b> .....	15
<b>4 ESTADO DA ARTE</b> .....	18
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	21
5.1 ANÁLISE DE ISÓTOPOS ESTÁVEIS DE C & O EM DENTES HUMANOS.....	21
5.2 ANÁLISE DE ISÓTOPOS ESTÁVEIS DE C & N EM UNHAS HUMANAS.....	23
5.3 ANÁLISE DE ISÓTOPOS ESTÁVEIS DE C & N EM CABELOS HUMANOS.....	24
<b>6 A ESPECTROMETRIA DE MASSA PARA OBTENÇÃO DE RAZÕES ISOTÓPICAS</b> .....	26
6.1 O CICLO DA ÁGUA E O FRACIONAMENTO DE ISÓTOPOS DE OXIGÊNIO.....	26
6.2 O CICLO DO CARBONO NA BIOSFERA.....	29
6.3 PROCESSOS DE FRACIONAMENTO DO NITROGÊNIO NO MEIO-AMBIENTE.....	32
6.4 INSTRUMENTAÇÃO.....	33
<b>7 RESULTADOS</b> .....	36
7.1 ASSINATURAS ISOTÓPICAS DE AMOSTRAS DE DENTE.....	36
7.2 ASSINATURAS ISOTÓPICAS DE UNHAS HUMANAS.....	37
7.3 ASSINATURAS ISOTÓPICAS DE CABELOS HUMANOS.....	39
<b>8 DISCUSSÕES</b> .....	40
<b>9 CONCLUSÕES</b> .....	44
<b>10 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	46
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	47

## 1 INTRODUÇÃO

A aplicação do estudo de razões isotópicas em Ciências Forenses é uma iniciativa recente que vem ganhando popularidade nos últimos anos graças à compreensão de sua importância como suporte às técnicas analíticas tradicionalmente usadas em Criminalística (Ehleringer *et al.*, 2007). Base de estudos em diversas áreas da Biologia e das Geociências, a técnica de espectrometria de massa para análise de isótopos estáveis permite a obtenção de razões isotópicas de diferentes tipos de tecidos animais e vegetais, estando estes resultados intrinsecamente relacionados a fatores ambientais da região de origem da amostra como, por exemplo, altitude, clima, distância da costa, dentre outros (Sulzman, 2007). Estas variáveis influenciam as quantidades relativas de isótopos mais pesados e mais leves nas moléculas que compõem ar e as fontes de água locais, por sua vez modificando os valores presentes no organismo dos animais e plantas presentes naquele ambiente, através de processos de fracionamento isotópico (Reitesema, 2015). O cenário, portanto, ímpar de acordo com a variação dos parâmetros supracitados, permite o estabelecimento de um padrão de razões isotópicas para diversos tipos de amostras de acordo com sua origem geográfica, resultados que possibilitam interpretações valiosas, capazes de mudar os rumos de uma eventual investigação criminal quando a técnica é devidamente aplicada às Ciências Forenses.

Para que possa ser utilizada por peritos criminais no Brasil como ferramenta de auxílio no processo de identificação de corpos e ossadas (uma das principais possibilidades de uso da IRMS por estes profissionais), a análise de isótopos estáveis em tecidos humanos tanto orgânicos quanto biominerais demanda pleno desenvolvimento, de forma controlada, de protocolos analíticos estabelecidos a partir da realização extensiva de experimentos com materiais de diferentes origens, de modo a alcançar o máximo nível de conhecimento necessário para replicação dos procedimentos de forma consistente, obtendo resultados passíveis de utilização pelo sistema de justiça. Tal prática é ainda bastante incipiente no país, cenário que vem sendo gradativamente melhorado à medida que são estabelecidas parcerias entre a comunidade acadêmica e instituições periciais.

O trabalho aqui descrito abarcou a realização de análises de isótopos estáveis de carbono e oxigênio em dentes, bem como carbono e nitrogênio em unhas e cabelos humanos, para observação de eventuais padrões de fracionamento desencadeados por

mudanças no pH da dieta do indivíduo e/ou variações temporais, assim como possíveis “contaminações” de amostras de cabelo humano submetidos a procedimentos estéticos, especificamente tintura e descoloração. Paralelamente, foi avaliada a possibilidade de distinção entre indivíduos a partir dos resultados obtidos.

Já há alguns anos foram iniciadas pesquisas com isótopos estáveis em tecidos humanos no Laboratório de Análise de Minerais e Rochas do Departamento de Geologia da UFPR, mas tendo em vista a escassez de publicações voltadas para a identificação experimental de mudanças de assinatura isotópica neste tipo de amostra, simulando as variações de fatores externos que podem ocorrer naturalmente ao longo da vida de um indivíduo, a compreensão da presença ou ausência destes processos de fracionamento isotópico nas amostras analisadas mostrou-se essencial para a confirmação da viabilidade da técnica e confiabilidade dos dados obtidos anteriormente. Os resultados preliminares aqui apresentados permitiram avaliar a eficácia do procedimento analítico adotado e observar quais aspectos do método e da interpretação mais demandam aperfeiçoamento. Esta avaliação é essencial para a garantia da reprodutibilidade e possibilidade de aplicação do procedimento em casos reais que possam vir a surgir no futuro, impulsionando, portanto, o avanço das Ciências Forenses no Brasil, essenciais no processo de conquista de uma segurança pública satisfatória refletindo um sistema de justiça aprimorado, estabelecido em alicerce de conhecimento técnico-científico de alta qualidade.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

Buscando, subordinadamente, representar uma contribuição da comunidade acadêmica no processo de desenvolvimento das Ciências Forenses no Brasil, o presente trabalho apresenta o processo de obtenção e interpretação de dados levantados a partir da análise de isótopos estáveis de C, O e N em tecidos humanos queratinizados (cabelo e unha) e biominerais (dentes) para identificação de eventuais processos de fracionamento isotópico desencadeados experimentalmente e, a partir dos resultados obtidos, avaliar a possibilidade de utilização da técnica e procedimento aqui adotados no processo de identificação de indivíduos em futuras investigações criminais.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I) Identificar eventuais mudanças no valor da assinatura isotópica de C e O de dentes humanos com origem conhecida expostos a líquidos com diferentes pHs, por tempo pré-estabelecido, e comparar os resultados com dados obtidos anteriormente para o mesmo grupo de amostras;

II) Determinar a existência de variação temporal da assinatura isotópica de unhas de um mesmo indivíduo com origem geográfica e dieta conhecidas;

III) Analisar a possibilidade de distinção entre dois indivíduos com diferentes dietas, porém mesma origem, a partir da assinatura isotópica de C e N de suas unhas;

IV) Analisar a possibilidade de distinguir indivíduos de diferentes origens geográficas a partir da assinatura isotópica de C e N de suas unhas;

V) Verificar eventuais alterações das razões isotópicas de cabelo humano devido a procedimentos estéticos como tintura e descoloração.

### 3 TECIDOS HUMANOS E SUA IMPORTÂNCIA FORENSE

Dentes e tecidos humanos queratinizados, como cabelos e unhas, podem ser considerados valiosos vestígios forenses por apresentarem características mineralógicas e químicas intimamente relacionadas a condições ambientais e hábitos de vida de um indivíduo. Esses atributos destacam a importância da aplicação de estudos destes materiais que compõem o corpo humano especificamente em Antropologia Forense, que pode ser definida como a aplicação da Antropologia Física em investigações criminais para identificação de restos humanos esqueletizados, em estágio avançado de decomposição ou, de modo geral, sem qualquer identificação (Klepinger, 2006), visto que em diversas situações as ferramentas clássicas de identificação de cadáveres, como análise de impressões digitais e perfilagem de DNA, por exemplo, se mostram inconclusivas.

Além de componentes orgânicos como o colágeno (~40%), os dentes humanos (FIGURA 1) também são compostos pelo biomineral hidroxiapatita, que representa o principal composto inorgânico do órgão, apresentando em sua estrutura de 4 a 6% do íon poliatômico carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) (Leventouri et al., 2009). A existência deste ânion na estrutura do mineral implica em variações morfológicas, afetando o índice de cristalinidade dos dentes que, quando determinado, possibilita inferências sobre a idade de um indivíduo (Souza, 2015). Sua presença também permite a aplicação da técnica de espectrometria de massa de razão isotópica (IRMS) para obtenção da assinatura do C e O liberados com a exposição da molécula a ácido fosfórico, processo que será apresentado em maior detalhe adiante.

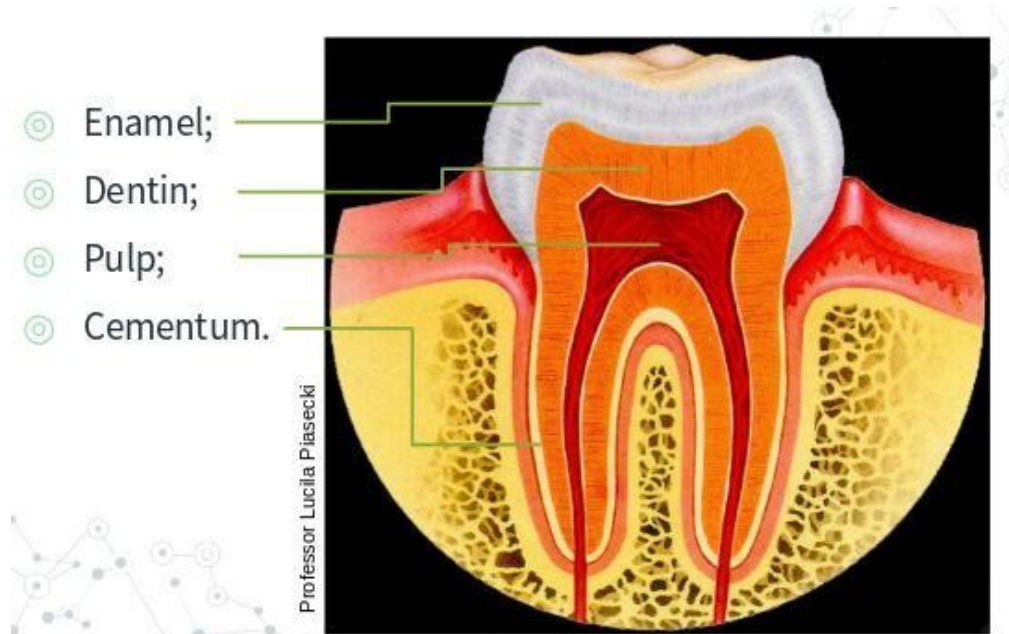


FIGURA 1 - Representação simplificada da anatomia de um dente humano. O esmalte (*enamel*), a dentina (*dentin*) e o cimento (*cementum*) são as partes mineralizadas, sobretudo o esmalte, o tecido mais resistente do corpo humano. Imagem adaptada, fornecida pela Professora Lucila Piasecki - Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

Cabelos e unhas humanas são tecidos derivados da epiderme, formados a partir da compactação e queratinização de células mortas da pele, apresentando em sua composição sobretudo a queratina, uma proteína secundária sintetizada pelo próprio corpo, portanto permitindo a caracterização como materiais totalmente orgânicos. Apesar de tecidos queratinizados carecerem de complexidade morfológica que permita inferências acerca da idade e sexo, apresentam em sua estrutura características que possibilitam distinguir amostras de indivíduos diferentes (FIGURA 2), bem como podem ser utilizados como provedores de assinaturas isotópicas recentes devido à elevada taxa de crescimento destes materiais. Entretanto, é importante ressaltar que o método de AIE adotado para tecidos orgânicos é diferente daquele para biominerais, o que será exposto em detalhe no *Capítulo 5 – Materiais e métodos*.



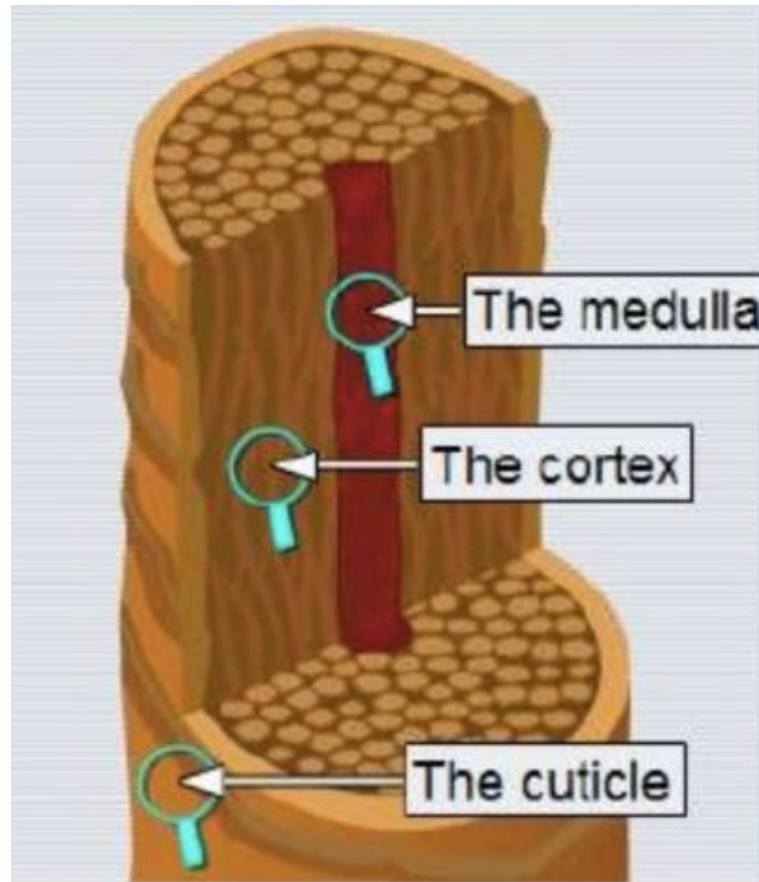


FIGURA 2 - Representação de uma seção transversal de cabelo humano, com suas principais estruturas. Variações da textura da cutícula (*cuticle*) e arranjo do córtex, dão à amostra características diversas que permitem a distinção entre indivíduos. Imagem adaptada de <https://pt.slideshare.net/erinmucci/hair-evidence-6049409>. Acesso em Setembro/2017.

Como a descrição permite concluir, as propriedades físicas e químicas dos tecidos humanos variam largamente, por isso o desenvolvimento de pesquisas do tipo pressupõe a interdisciplinaridade. Com profissionais de diversas áreas trabalhando em conjunto, torna-se mais fácil garantir que diversos pontos de vista estarão em pauta, o que enriquece os trabalhos propostos. Os experimentos descritos no presente trabalho, foram conduzidos sempre com a contribuição de peritos criminais e pesquisadores de outras áreas para que a responsabilidade social da aplicação das AIE em Antropologia Forense fosse mantida como principal justificativa da necessidade urgente de pleno conhecimento de suas especificidades e possíveis interpretações.

## 4 ESTADO DA ARTE

Como já mencionado anteriormente, a aplicação do estudo de razões isotópicas em Ciências Forenses é bastante recente. Mais especificamente, foi a partir do início do anos 70 que a importância arqueológica desse tipo de análise passou a ser reconhecida (Tykot, 2006), só então a aplicação deste conhecimento para determinação da origem geográfica de restos humanos foi possibilitada.

Nos últimos 15 anos, a divulgação de investigações criminais nas quais as análises de isótopos estáveis em tecidos humanos foram utilizadas com sucesso, corroboram a necessidade do desenvolvimento da técnica no Brasil. Alguns exemplos destes casos são o assassinato de uma mulher ocorrido em Mammoth Lakes, nos Estados Unidos, em 2003 (Dostie, 2007) e o assassinato de Kenyan Noor em Dublin, Irlanda, em 2005 (Meier-Augenstein, 2007). Em ambos os casos, foram realizadas análises de isótopos estáveis em amostras de ossos, dentes, cabelos e unhas, e os resultados permitiram a determinação da procedência geográfica dos indivíduos e uma estimativa do tempo de residência na região onde seus corpos foram encontrados, visto que as análises permitiram concluir também que, em ambos os casos, as vítimas haviam emigrado de seus países de origem após a idade adulta.

Chesson *et al.*, no livro *Treatise on Geochemistry*, de 2014, descreve a aplicação do estudo de razões isotópicas de carbono, nitrogênio, oxigênio e hidrogênio em Ciências Forenses. Estes elementos, especificamente, são os mais abundantes no corpo humano, portanto as razões isotópicas destes são os principais alvos da aplicação deste estudo em Antropologia Forense. C e N são assimilados ao organismo através da dieta, portanto possibilitam a obtenção de informações sobre hábitos alimentares específicos de um indivíduo, como, por exemplo, se a mesma é composta predominantemente por alimentos de origem animal ou vegetal, ao passo que os valores para oxigênio e hidrogênio, assimilados aos tecidos humanos a partir das fontes de hidratação, oferecem pistas sobre sua origem geográfica. Em 2016, foi apresentado por Someda *et al.* um trabalho onde os resultados de razões isotópicas de C e O de esmalte dentário permitiram a distinção entre dois grupos de pessoas, um de origem americana, outro de origem japonesa. Já no Brasil, existem trabalhos publicados voltados para a análise de isótopos estáveis em unhas humanas para obtenção

de informações sobre hábitos alimentares de populações específicas, avaliando a possibilidade de distinção entre grupos de diferentes níveis socioeconômicos (Gragnani *et al.*, 2013) e também a mudança do padrão de dieta de indivíduos provenientes de áreas rurais, pequenas vilas e grandes cidades na Região Amazônica (Nardoto *et al.*, 2011). Estes são exemplos recentes da possibilidade de aplicação da técnica, onde são apresentados resultados bastante favoráveis, que permitiriam enriquecer cientificamente eventuais investigações criminais relacionadas.

As assinaturas isotópicas obtidas a partir da análise dos tecidos não são exatamente aquelas observadas nos alimentos e nas fontes de água, devido aos processos metabólicos de assimilação dos elementos que favorecem os isótopos mais leves em detrimento aos pesados, nas reações químicas que ocorrem no organismo (Klepinger e Mintel, 1986), porém o padrão geral de predominância de razões isotópicas mais negativas em indivíduos provenientes de localidades onde água e mantimentos apresentam também essa tendência, por exemplo, é mantido. Com essas informações, observa-se que toda a pesquisa que envolve AIE para desenvolvimento de inferências acerca de aspectos do meio-ambiente de origem da amostra está embasada no conceito de *fracionamento*, ou seja, na variação da abundância relativa de isótopos mais pesados e mais leves, como citado anteriormente. Os resultados obtidos, especificamente para carbono, nitrogênio e oxigênio, em permilagem (‰), são denominados delta-C-13 ( $\delta^{13}\text{C}$ ), delta-N-15 ( $\delta^{15}\text{N}$ ) e delta-O-18 ( $\delta^{18}\text{O}$ ), calculados com a seguinte fórmula (Roy *et al.*, 2005):

$$\delta(\text{‰}) = \{(R_{\text{amostra}} - R_{\text{padrão}}) / R_{\text{padrão}}\} \times 1000$$

Onde R representa a proporção do isótopo mais pesado em relação ao mais leve, tanto na amostra propriamente dita, quanto no padrão internacional utilizado, que apresenta valor próximo de zero. Os processos de fracionamento observados na natureza e em organismos vivos, bem como especificidades da técnica de IRMS, encontram-se descritos em maior detalhe no *Capítulo 6 – A espectrometria de massa para obtenção de razões isotópicas*.

Os procedimentos de preparação e análise de amostras de tecido humano, como descrevem os artigos envolvendo o assunto, são bastante criteriosos e seguidos rigorosamente de modo a evitar contaminação, perda de material, fracionamento induzido, entre outros fatores que possam vir a dificultar a interpretação dos dados ou até mesmo

inutilizá-los. Devido à alta precisão da técnica de espectrometria de massa, até mesmo a forma de armazenamento do material, antes de sua preparação, deve ser escolhida com cautela, como apresentado por Fraser *et al.* (2008). A infraestrutura necessária para a realização das análises apresentadas neste trabalho, em conformidade com os padrões seguidos por outros laboratórios que realizam o mesmo tipo pesquisa, já se encontra disponível na Universidade Federal do Paraná, assim como o cadastro na Plataforma Brasil, necessário para utilização de amostras de origem humana.

Desde 2013 vêm sendo apresentados, em eventos científicos, os resultados já produzidos de análise de isótopos estáveis de carbono e oxigênio em dentes humanos provenientes de diferentes partes do Brasil (Muniz *et al.*, 2016). Entretanto, à medida que as pesquisas avançavam e houve necessidade de maior preciosismo nas interpretações, observou-se a ausência, tanto na literatura nacional quanto internacional, de trabalhos mais específicos que tratem da influência direta da exposição de tecidos orgânicos a produtos químicos e também da exposição superficial de organominerais a bebidas com pH ácido, ou seja, nos trabalhos que vêm sendo realizados ao redor do mundo não é bem discutida a possibilidade de alteração da abundância relativa de isótopos mais pesados e mais leves devido ao contato de cabelos, por exemplo, com substâncias com composição potencialmente tóxica, como tintas (Nohynek *et al.*, 2004) ou de dentes a soluções com pH muito diferente do padrão corporal, visto que a eventual diminuição do pH no corpo humano atua como desencadeadora de processo de dissolução do mineral hidroxiapatita presente em dentes e ossos (Grinspoon *et al.*, 1995). Esses aspectos, pouco abordados, serão estudados nesta pesquisa para compreensão de sua potencial influência nos resultados.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

Os isótopos de carbono, nitrogênio e oxigênio que constituem os tecidos humanos são provenientes da alimentação e fonte de hidratação dos indivíduos, como já apresentado anteriormente. Partindo dessa premissa, observa-se a possibilidade de variação das razões isotópicas nos tecidos tanto orgânicos (pele, cabelo, unha, etc.) quanto organominerais (dentes e ossos), a partir de singularidades dos hábitos nutricionais de diferentes pessoas, de acordo com suas origens geográficas. Porém, há também a possibilidade de mudança desses valores devido a possíveis processos de fracionamento desencadeados a partir de mudanças do pH fisiológico dos tecidos ou exposição a agentes químicos utilizados em procedimento estéticos, por exemplo.

Se confirmada essa possibilidade de alteração dos valores das assinaturas isotópicas de determinado tecido animal, a determinação de sua origem geográfica, bem como de outras especificidades dos hábitos de vida, seriam prejudicadas, pois os valores estariam submetidos à influência de outros fatores externos que dificultariam uma interpretação acurada e, conseqüentemente, a validação da técnica para utilização em perícia criminal. Por isso, a necessidade de realização de experimentos específicos para testar as hipóteses supracitadas. Buscando contribuir para a solução desta questão, foram realizadas as análises descritas neste trabalho, seguindo métodos específicos baseados em resultados anteriores e dados publicados em artigos correlatos. A seguir, são apresentadas as descrições dos procedimentos.

### 5.1 ANÁLISE DE ISÓTOPOS ESTÁVEIS DE C & O EM DENTES HUMANOS

O experimento consistiu na análise de isótopos estáveis de carbono e oxigênio em 10 dentes humanos com origem conhecida, doados pelo banco de dentes da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, com a autorização dos pacientes.

Todas as amostras foram cortadas longitudinalmente e secadas em estufa a 50°C por 24h após limpeza com água deionizada. Em seguida, uma das metades de cada amostra (FIGURA 3) foi pulverizada em gral de ágata (FIGURA 4) ou panela de tungstênio em moinho

de disco. Uma pequena alíquota do pó resultante foi então utilizada para obtenção de uma assinatura isotópica padrão, pré-experimento, para comparação posterior.

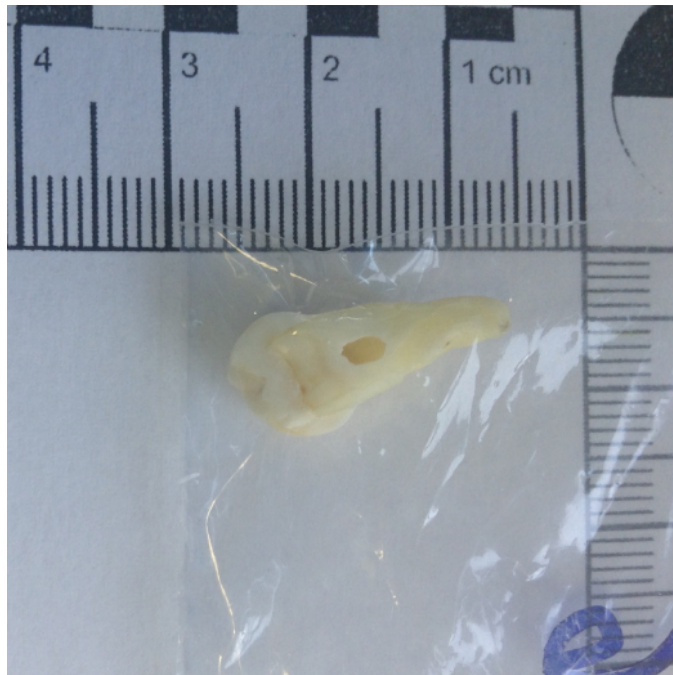


FIGURA 3 - Amostra de dente utilizada no experimento, antes da preparação, cortada longitudinalmente, armazenada em embalagem plástica identificada.

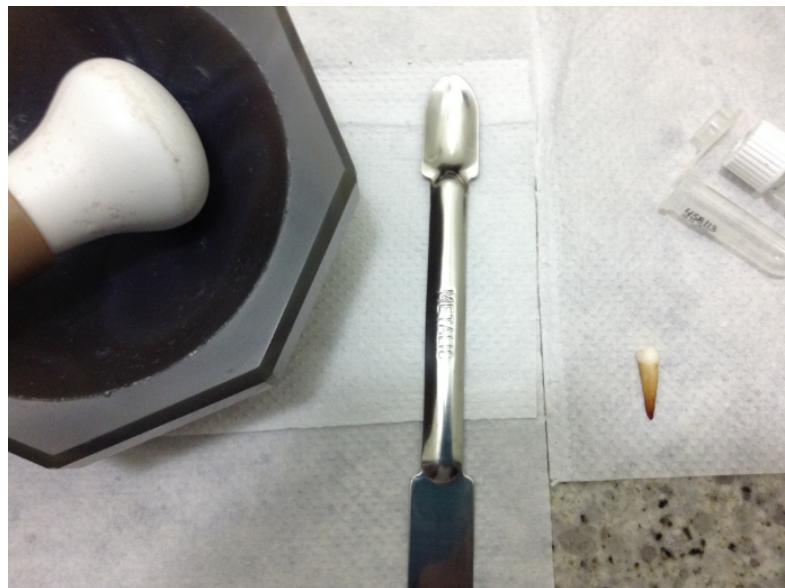


FIGURA 4 - Registro fotográfico das ferramentas utilizadas durante o processo de pulverização em gral de ágata. Do lado direito, abaixo, observa-se uma das amostras, pronta para o procedimento.

As outras metades dos dentes foram então expostas a líquidos com pH ácido (vinagre), neutro (água da torneira) ou alcalino (leite de magnésia) por um período de até 5

meses. Posteriormente, foram submetidas ao mesmo processo de preparação já citado, até a pulverização para, em seguida, análise no espectrômetro de massa DeltaV Advantage da Thermo Scientific, obtendo assim uma assinatura isotópica pós-exposição, para comparação com os resultados obtidos a partir das metades não expostas, bem como valores de dentes de mesma origem, analisados previamente.

Para que o C e O presentes na hidroxiapatita dos dentes analisados fossem acessados, as amostras pulverizadas, pesadas e depositadas em *vials* de vidro foram então expostas a ácido fosfórico por 6 horas, tempo mínimo necessário para abertura da estrutura do mineral e liberação de CO<sub>2</sub> com a reação do carbonato em meio ácido, segundo experimentos realizados previamente (Muniz *et al.*, 2016). Após esse período de reação, o espectrômetro de massa coletou automaticamente o gás liberado no *vial*, finalizando a análise.

Os resultados obtidos para as amostras analisadas encontram-se relacionados no *Capítulo 7 – Resultados*.

## 5.2 ANÁLISE DE ISÓTOPOS ESTÁVEIS DE C & N EM UNHAS HUMANAS

Foram analisadas um total de 14 amostras de unha doadas pelos responsáveis legais por 4 crianças. Doze foram coletadas durante o período de março a maio de 2017, sendo 6 provenientes de um indivíduo de 3 anos, com dieta variada, e outras 6 de seu irmão, então com 5 meses de idade e dieta restrita a leite materno, ambos provenientes de Curitiba/PR. As outras duas amostras foram obtidas também de irmãos, porém com 5 e 8 anos de idade, provenientes de São Paulo/SP. Estas últimas foram utilizadas sobretudo para avaliar a possibilidade de distinção entre grupos de indivíduos de localidades diferentes, baseando-se na assinatura isotópica de C e N, ao passo que as coletadas pelo período de três meses permitiram observar a presença ou ausência de variação da assinatura com o tempo, ainda que a dieta fosse mantida.

O procedimento de preparação das amostras envolveu uma limpeza física externa das unhas com material aderido à superfície, seguido de banho para retirada de gordura e resíduos em uma solução de metanol e clorofórmio (proporção 2:1 v/v) por um período total de duas horas e vinte minutos, com um intervalo de 20 minutos após uma hora para lavagem

em água deionizada e novamente imersão na solução citada, por uma hora adicional. Após esse período, as mesmas foram novamente lavadas em água deionizada e colocadas em estufa a 60°C para secagem por 24h. Em seguida, as mesmas foram cortadas e pesadas para então serem depositadas em cápsulas de estanho nas quantidades de 0,05 mg a 0,07 mg, para obtenção da assinatura isotópica do carbono, e 0,5 a 0,6 mg, para o nitrogênio. As cápsulas de estanho foram então inseridas no espectrômetro, com sistema Flash 2000 OEA, que para acessar o C e N disponíveis na composição do material, submeteu as amostras a combustão a 1.050°C, analisando então o gás liberado durante o processo.

### 5.3 ANÁLISE DE ISÓTOPOS ESTÁVEIS DE C & N EM CABELOS HUMANOS

Doadas por dois indivíduos de São Paulo/SP, foram separadas de cada uma das duas mechas um total de 90 fios, 30 destes foram submetidos a descoloração com produtos de farmácia e outros 30 foram pintados com tintura comum de pigmentação escura. Os 30 fios restantes foram mantidos naturais, sem qualquer procedimento estético, para fins de comparação após o experimento. Foram consideradas, portanto, 6 amostras de cabelo, três de cada doador.

O processo de preparação e análise das amostras seguiu o mesmo procedimento descrito anteriormente para as unhas, também com banho em solução de metanol e clorofórmio, lavagem com água deionizada e secagem em estufa a 60°C. A princípio foi considerada a possibilidade de homogeneização dos trinta fios de cada amostra, porém a medida adotada foi de apenas corte e pesagem das quantidades necessárias para análise do carbono e nitrogênio, já especificadas no tópico acima.

A TABELA 1 apresenta, resumidamente, o procedimento adotado para as amostras orgânicas.



Limpeza externa	Tintura	Descoloração	Lavagem (metanol + clorofórmio)	Lavagem com H <sub>2</sub> O deionizada	Secagem em estufa
Amostras B2, B5 e Mu, que apresentavam resíduos aderidos	Amostras Cp e Mp	Amostras Cd e Md	Todas as amostras	Todas as amostras	Todas as amostras

TABELA 1 - Descrição simplificada dos procedimentos pré-análise adotados para amostras orgânicas específicas. As únicas amostras submetidas a raspagem para retirada de material aderido foram as unhas B2, B5 e Mu. Já as amostras de cabelo Cp, Mp, Cd e Md foram as submetidas a procedimento estético. Todas as outras 13 amostras (11 unhas e 2 mechas de cabelo) foram submetidas ao procedimento padrão.

Cabe ressaltar aqui que, devido à ausência do equipamento Flash 2000 OEA, necessário para combustão e análise de amostras orgânicas, acoplado ao Delta V Advantage IRMS, as mesmas não puderam ser analisadas no LAMIR-UFPR, portanto todo o procedimento foi conduzido no Centro de Isótopos Estáveis Prof. Dr. Carlos Ducatti (CIE/UNESP) em Botucatu/SP.

## 6 A ESPECTROMETRIA DE MASSA PARA OBTENÇÃO DE RAZÕES ISOTÓPICAS

No ano de 1907, como apresentado por Ferreira (2008), foi realizado por Francis W. Aston o primeiro experimento que permitiu a descoberta de um dos isótopos estáveis do gás neônio, mais especificamente  $^{21}\text{Ne}$ . Seis anos depois, em 1913, J.J. Thompson confirmou a existência dos isótopos estáveis deste elemento quando descobriu experimentalmente Neônio-20 e Neônio-22. No mesmo ano, foi cunhado o termo “isótopo” por F. Soddy e A. Fleck, tendo sido utilizado o primeiro espectrômetro de massa para obtenção de razões isotópicas de C, N e O apenas em 1950, por A. O. Nier.

Os isótopos são definidos como elementos com diferentes massas atômicas mas que ocupam a mesma posição na tabela periódica por apresentarem mesmo número de elétrons e de prótons, diferindo apenas no número de nêutrons. A massa atômica representada para cada elemento conhecido na tabela é calculada a partir da média ponderada de cada isótopo do mesmo elemento, de acordo com sua abundância na natureza. Essa abundância é pré-fixada no meio-ambiente com a formação do planeta a partir de processos de fusão nuclear nas estrelas de origem do sistema planetário, entretanto, a composição inicial de isótopos não-estáveis (radiogênicos) varia com os processos de decaimento radioativo que dão origem a elementos distintos, ao passo que os isótopos estáveis mantêm suas quantidades indefinidamente, porém passando por variações de abundância relativas devido a fracionamentos isotópicos desencadeados em processos físicos, químicos e bioquímicos (Urey, 1947), ou seja, nesses processos há um enriquecimento ou empobrecimento de um isótopo em relação ao outro, variabilidade que só é possível devido a diferenças das propriedades físicas e químicas do isótopo mais leve, geralmente mais abundante. Moléculas com isótopos mais leves são favorecidas em reações químicas em detrimento às mais pesadas que, além de comumente apresentarem maiores energias de ligação, também se movem mais lentamente, dificultando a colisão com outras moléculas.

### 6.1 O CICLO DA ÁGUA E O FRACIONAMENTO DE ISÓTOPOS DE OXIGÊNIO

Elemento mais abundante na crosta terrestre e no corpo humano (FIGURA 5), o oxigênio encontra-se disponível sobretudo nas águas marinhas e meteóricas do planeta,

associado ao hidrogênio, portanto estes dois elementos são submetidos aos mesmos processos de fracionamento isotópico.

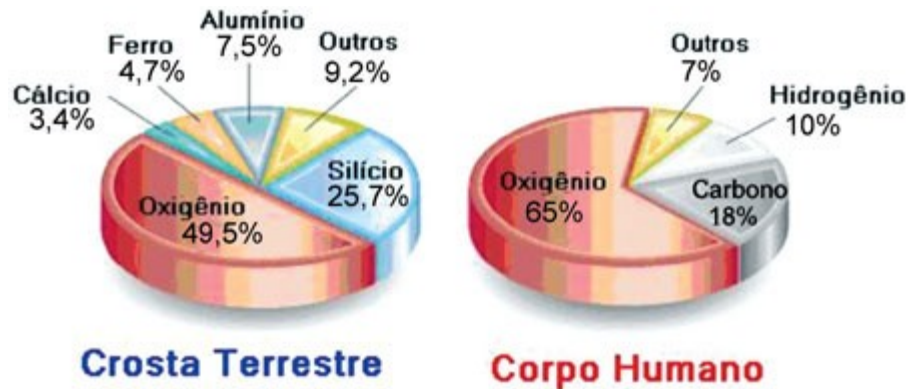


FIGURA 5 - Diagramas em representando as porcentagens aproximadas de elementos químicos presentes na crosta terrestre e no corpo humano. Fonte: Quimlab. Acesso em outubro/2017.

[http://www.quimlab.com.br/guiadoselementos/abundancia\\_elementos.htm](http://www.quimlab.com.br/guiadoselementos/abundancia_elementos.htm)

A origem dos estudos do padrão de variação da abundância dos isótopos de oxigênio no globo remonta a 1961, quando Craig verificou a existência de mudanças nos teores de  $^{18}\text{O}$  em relação ao  $^{16}\text{O}$  em amostras de diferentes lugares do mundo. Foi observada a maior abundância do isótopo mais pesado na região equatorial enquanto em localidades mais frias o O-16 apresentava-se em maior quantidade. Isso é devido à maior facilidade de evaporação de moléculas de água com isótopos mais leves, portanto no equador, onde as temperaturas do ambiente são mais altas, as moléculas mais leves de  $\text{H}_2\text{O}$  são evaporadas mais rapidamente, de modo que permanecem nos oceanos, rios e lagos, águas mais pesadas. Ao mesmo tempo, as moléculas com O-18 que alcançam a atmosfera precipitam mais rápido por conta de seu maior peso, assim, as chuvas que chegam a latitudes mais frias ou regiões de maior altitude já encontram-se bastante empobrecidas em oxigênio-18 (FIGURA 6).

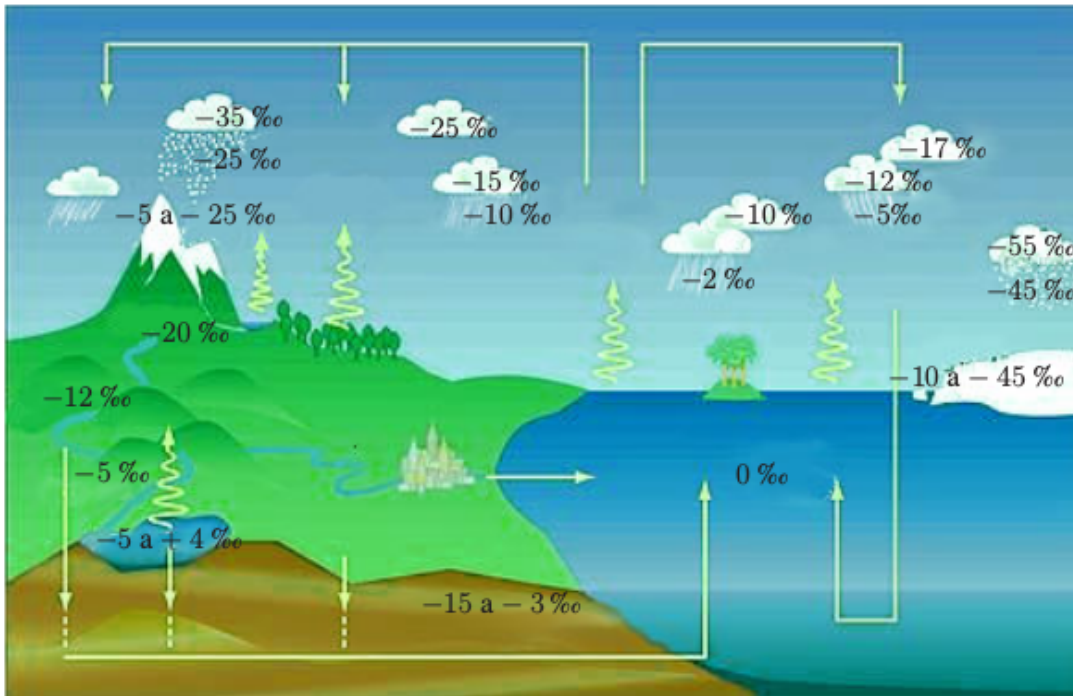


FIGURA 6 - Esquema representando os padrões de variação das assinaturas isotópicas de oxigênio-18 em função do ambiente. Observa-se valores substancialmente mais negativos em regiões mais frias (calotas polares e neve, por exemplo) e de altitudes mais altas, como montanhas. Fonte: Ferreira (2008).

Em resumo, as assinaturas isotópicas de amostras de água estão ligadas ao ciclo hidrológico, por sua vez dependente de fatores geográficos. A FIGURA 7 apresenta os valores delta-O-18 observados para a água meteórica em diferentes regiões, calculados em relação ao padrão adotado V-SMOW (*Vienna-Standard Mean Ocean Water*) para o qual foi estipulado o valor de 0‰. Estes resultados, previsivelmente dependentes da latitude, altitude e distância do oceano de uma determinada localidade, acabam assimilados pelo organismo de animais e plantas daquele ambiente, o que permite o estabelecimento de correlação geográfica de suas assinaturas isotópicas de H e O.

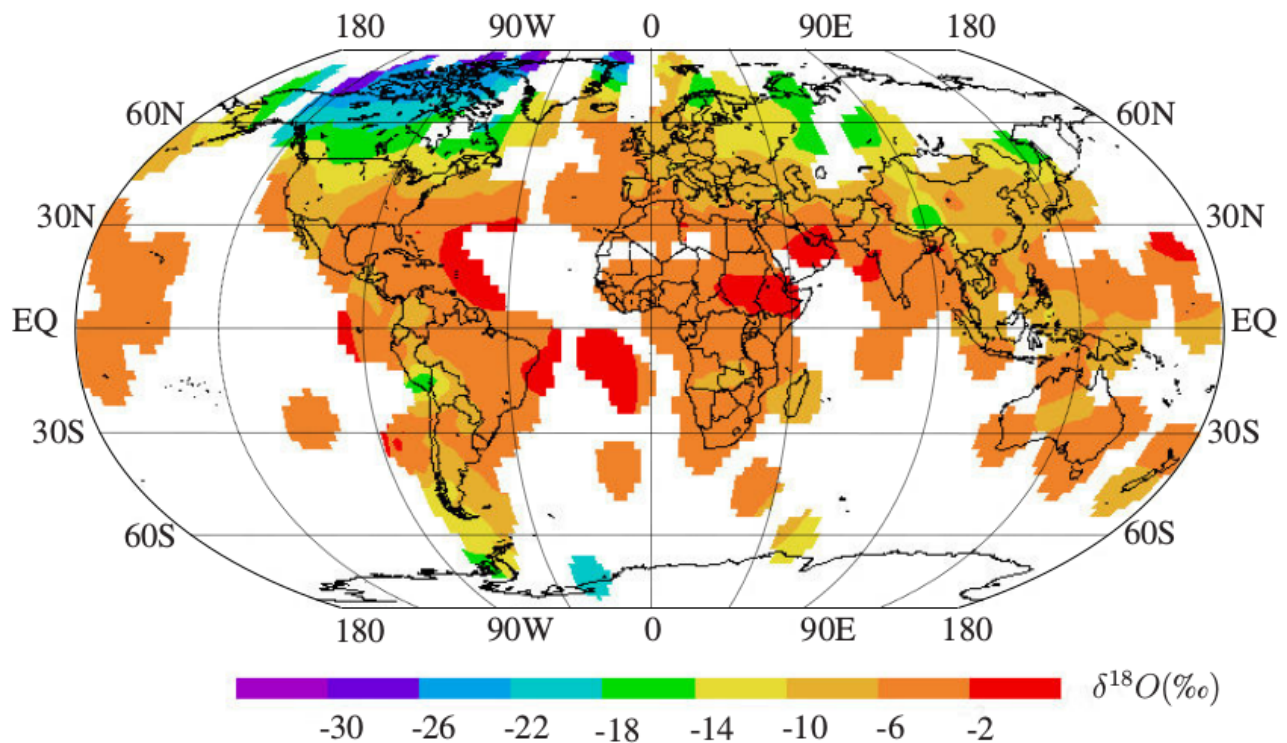


FIGURA 7 - Mapa global de distribuição média anual de razões isotópicas de oxigênio-18 em águas pluviais. Fonte: IAEA (2001). GNIP Maps and Animations, International Atomic Energy Agency, Vienna.

<http://isohis.iaea.org>. Acesso em outubro/2017.

## 6.2 O CICLO DO CARBONO NA BIOSFERA

Durante o processo de fixação do  $\text{CO}_2$  presente na atmosfera pelas plantas, os isótopos de  $^{13}\text{C}$  e  $^{12}\text{C}$  passam por processo de fracionamento e elas adquirem uma assinatura isotópica empobrecida em  $^{13}\text{C}$ , como constatado por Smith e Epstein (1971).

De modo geral, o  $\text{CO}_2$  presente no ar já apresenta quantidades menores de  $^{13}\text{C}$  em relação ao padrão VPDB (*Vienna Pee Dee Belemnite*), calibrado para a mesma razão isotópica do padrão original, um fóssil marinho do cretáceo proveniente da formação Pee Dee nos EUA, para o qual foi estabelecido o valor de 0‰. No processo de assimilação do  $\text{CO}_2$  atmosférico para realização da fotossíntese, a assinatura isotópica resultante nos tecidos vegetais se torna ainda mais depletada em carbono-13, entretanto, este processo não é o mesmo para todas as espécies de planta.

São três os principais ciclos fotossintéticos observados na natureza, como descrito por Ferreira (2008): o ciclo de Calvin, ciclo de Hatch-Slack e o ciclo de Metabolismo Ácido das Crassuláceas (CAM). O primeiro é típico das plantas denominadas  $C_3$ , espécies de regiões com temperaturas mais amenas. Neste ciclo, quando há absorção e fixação do  $CO_2$ , é formado um composto intermediário com três átomos de carbono. Alguns exemplos de alimentos deste grupo são a batata, arroz, feijão, o trigo e a soja. No ciclo de Hatch-Slack, das plantas  $C_4$ , são formados compostos intermediários com quatro átomos de carbono. As espécies com este ciclo são típicas de regiões com clima tropical. Alguns exemplos incluem a cana-de-açúcar e o milho. Já as plantas CAM, como cactos e a baunilha, são mais comuns em climas áridos e apresentam ambos os ciclos das plantas  $C_3$  e  $C_4$  alternadamente, sendo o primeiro vigente durante o dia e o segundo à noite.

Essas especificidades do ciclo metabólico fazem com que os processos de fracionamento sejam diferentes de um grupo para o outro, portanto as razões isotópicas desses vegetais são distintas, como resume a FIGURA 8, onde é possível observar um enriquecimento mais pronunciado em carbono-13 nas plantas  $C_4$ .

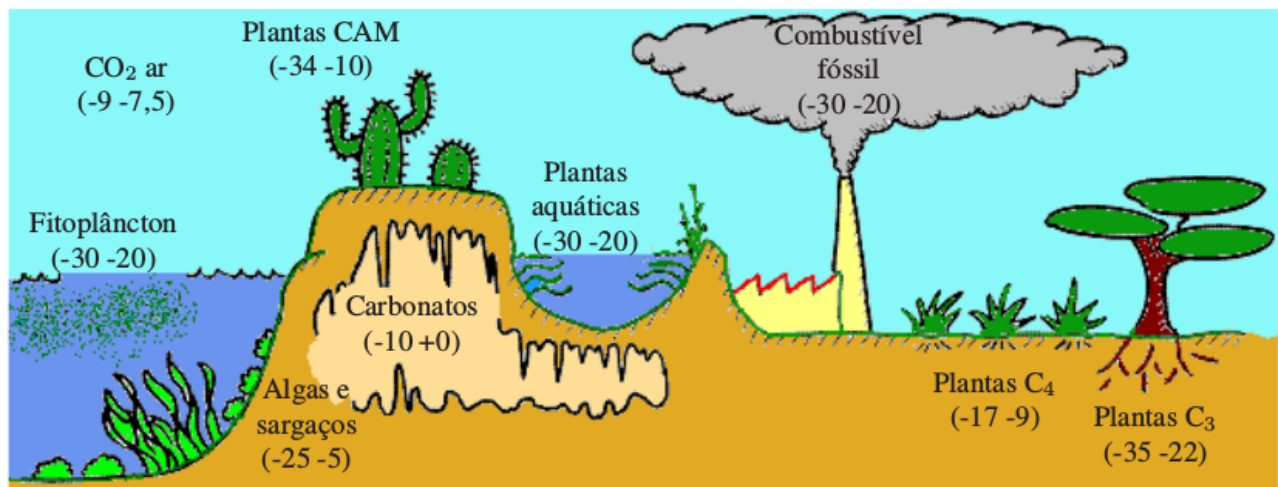


FIGURA 8 - Esquema representando a variação de assinaturas isotópicas de carbono em diferentes ambientes e tipos vegetais. Padrão: VPDB. Observa-se a influência da assinatura isotópica de combustíveis fósseis no ar, o que faz com que uma mesma espécie em região industrial apresente assinatura mais negativa que suas cogêneres vivendo distantes de grandes centros urbanos. Fonte: Ferreira (2008).

É importante ressaltar que o ciclo metabólico não é o único fator de influência na assinatura isotópica de tecidos vegetais. Os estômatos presentes na estrutura foliar, quando fechados em situações de seca (stress hídrico) acabam por desencadear enriquecimento em  $^{13}\text{C}$  em plantas  $\text{C}_3$  e empobrecimento deste isótopo em plantas  $\text{C}_4$  sob as mesmas condições.

De qualquer forma, o processo de assimilação do  $\text{CO}_2$  pelo vegetal vai definir sua assinatura isotópica, que será refletida nos animais que incluem estes alimentos em suas dietas. A FIGURA 9 exemplifica um modelo de assimilação do carbono por animais herbívoros a partir da ingestão de 50% de plantas  $\text{C}_3$  e 50% de plantas  $\text{C}_4$ .

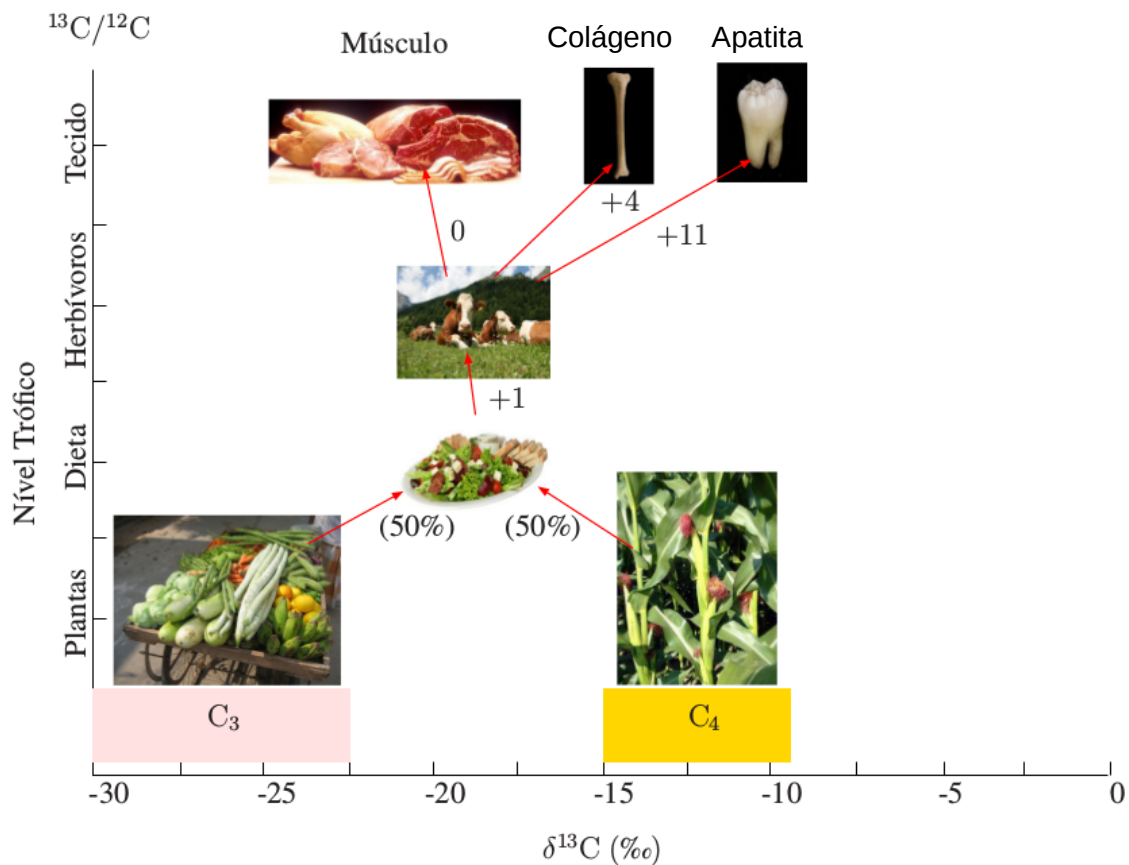


FIGURA 9 - Gráfico demonstrando sumariamente o padrão geral de variação do delta-C-13 em uma cadeia trófica. De modo geral, observa-se uma tendência a enriquecimento em carbono-13. Adaptado de Ferreira (2008).

### 6.3 PROCESSOS DE FRACIONAMENTO DO NITROGÊNIO NO MEIO-AMBIENTE

Como descreve Ferreira (2008), o nitrogênio presente no planeta Terra pode ser encontrado em maior quantidade na atmosfera, em sua forma molecular  $N_2$ , onde representa 78% dos gases que a compõe. Este elemento é fracionado em processos sobretudo de metabolismo de microorganismos, que transformam compostos nitrogenados em nitrato, amoníaco, aminoácidos e proteínas.

De modo geral, há uma tendência a valores mais positivos de delta-N-15, em relação ao padrão  $N_2$  atmosférico (0‰), à medida que se dão as interações químicas nos organismos que compõem determinada cadeia trófica. Isso é devido à maior facilidade de eliminação do  $^{14}N$  nos tecidos vegetais ou animais. A FIGURA 10 ilustra de maneira didática essa interação, onde é possível observar que indivíduos consumidores de alimento de origem animal possuem assinaturas isotópicas mais enriquecidas em  $^{15}N$  que suas presas, ou seja, há uma sobreposição dos resultados dos processos de enriquecimento dos organismos no isótopo mais pesado, resultando em razões isotópicas significativamente mais positivas em espécies do topo de cadeias alimentares. Isso permite a caracterização de especificidades nutricionais de animais, baseado nas assinaturas do nitrogênio em seus tecidos.



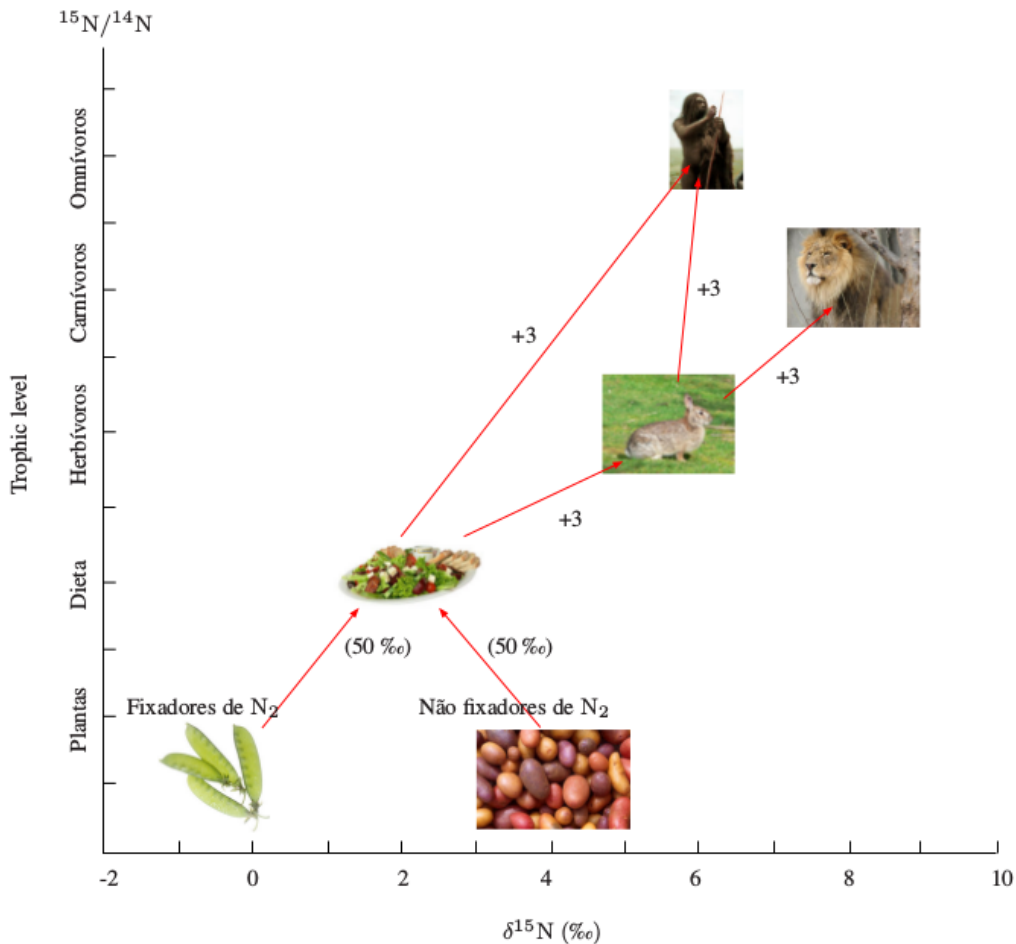


FIGURA 10 - Representação gráfica da variação de assinatura isotópica do nitrogênio-15 nos tecidos de animais e plantas em uma cadeia alimentar hipotética. Observa-se que tubérculos, como a batata, são denominados vegetais “não fixadores de  $\text{N}_2$ ”, pois vivem em subsuperfície, obtendo nitrogênio diretamente do solo. Por isso apresentam assinatura mais positiva, já que no solo o N pode ser obtido a partir do nitrato disponível, proveniente do metabolismo de microorganismos, portanto uma molécula já enriquecida em  $^{15}\text{N}$ .

## 6.4 INSTRUMENTAÇÃO

Já mencionado anteriormente, o instrumento utilizado para obtenção das razões isotópicas apresentadas neste trabalho é o espectrômetro de massa de fonte gasosa. Trata-se do principal equipamento usado na medição de razões isotópicas de elementos leves, como o C, N e O.

Nele, a amostra de interesse, em estado sólido, é transformada em gás por instrumentos acoplados ao espectrômetro, especificamente o GasBench II para amostras

inorgânicas ou organominerais, como dentes e ossos, e o Flash 2000 Organic Elemental Analyzer (OEA), para amostras orgânicas. No primeiro, o material pulverizado permanece a 72°C em *vial* de vidro, exposto a ácido fosfórico pelo tempo necessário para liberação total do CO<sub>2</sub> existente na estrutura do mineral, ao passo que no segundo, a amostra é submetida a processo de queima entre 800 e 1.100°C e em seguida redução para obtenção do CO<sub>2</sub> ou N<sub>2</sub> dependendo da assinatura isotópica de interesse. Após esse processo, em ambos os equipamentos, a amostra já em sua forma gasosa reduzida, segue para o interior do espectrômetro onde é ionizada. Estes íons formados são acelerados em feixe, que entra em um tubo curvado (FIGURA 11) envolto por um eletroímã responsável pela deflexão desse feixe de íons de acordo com a razão de sua massa pela carga, portanto o feixe original deixa o setor magnético como diversos feixes separados com trajetórias de diferentes ângulos.

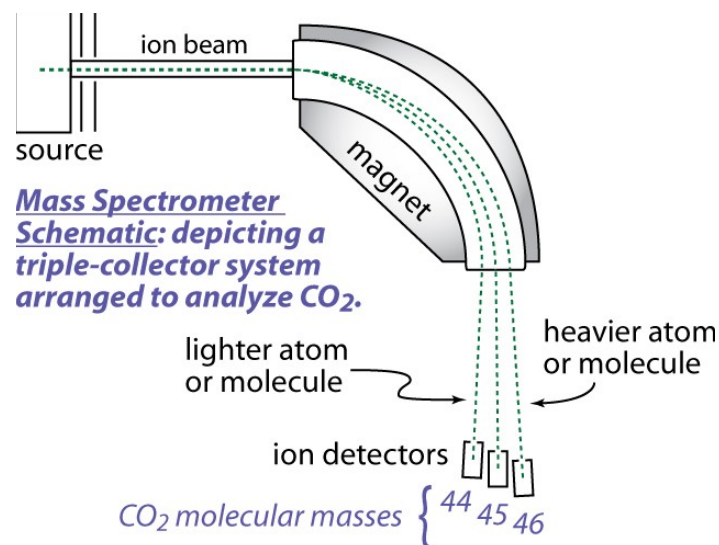


FIGURA 11 - Esquema simplificado dos mecanismos internos presentes em um espectrômetro de massa. *Ion beam*: feixe de íons; *magnet*: ímã; *ion detectors*: coletores dos íons. Observa-se que átomos ou moléculas mais pesadas apresentam desvio menor de sua trajetória do que moléculas mais leves. Fonte: Dunn (2007).

Estes íons alcançam, por fim, detectores posicionados estrategicamente, que os coletam e realizam sua medida como uma corrente que pode ser amplificada e determinada com alta precisão (Dunn, 2007). A partir disso, o equipamento pode determinar a quantidade de cada isótopo presente nas moléculas ionizadas e definir o valor da razão isotópica requisitada, conforme a equação já apresentada no *Capítulo 4 - Estado da Arte*:

$$\delta(\text{‰}) = \{(R_{\text{amostra}} - R_{\text{padrão}}) / R_{\text{padrão}}\} \times 1000$$

Que especificamente para os elementos de interesse desta pesquisa pode ser escrita das seguintes maneiras:

$$\delta^{13}\text{C} = \left( \frac{\left(\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}}\right)_{\text{sample}}}{\left(\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}}\right)_{\text{standard}}} - 1 \right) * 1000 \text{ ‰} \quad , \text{ para o carbono};$$

$$\delta^{15}\text{N} = \left( \frac{\left(\frac{^{15}\text{N}}{^{14}\text{N}}\right)_{\text{Probe}}}{\left(\frac{^{15}\text{N}}{^{14}\text{N}}\right)_{\text{Standard}}} - 1 \right) * 1000 \text{ ‰} \quad , \text{ para o nitrogênio};$$

$$\delta^{18}\text{O} = \left( \frac{\left(\frac{^{18}\text{O}}{^{16}\text{O}}\right)_{\text{sample}}}{\left(\frac{^{18}\text{O}}{^{16}\text{O}}\right)_{\text{standard}}} - 1 \right) * 1000 \text{ ‰} \quad , \text{ para o oxigênio.}$$

## 7 RESULTADOS

### 7.1 ASSINATURAS ISOTÓPICAS DE AMOSTRAS DE DENTE

O experimento como descrito no *Capítulo 5 – Materiais e métodos*, previa a obtenção de ao menos 10 novas análises para comparação com dados anteriores, ou 20, contando com a etapa de obtenção de assinaturas de amostras não submetidas a exposição em líquido algum. Entretanto, no procedimento adotado para as amostras analisadas em outros experimentos (Muniz *et al.*, 2016), era prevista a utilização de uma cureta de Bruns com a qual era possível obter a quantidade de pó ideal para análise no espectrômetro. A cureta não pôde ser utilizada para medida das novas amostras, por isso, foram pesadas cerca de 0,30 a 0,45 mg de cada um dos dentes pulverizados. Este volume, entretanto, mostrou-se insuficiente, como será discutido no próximo capítulo. Devido a este cenário, das 10 novas análises previstas, apenas 5 apresentaram resultados satisfatórios, ainda que não ideais. Os mesmos encontram-se relacionados na TABELA 2 a seguir.

	C	O	dC	dO
B2 0	-9.35	-8.2	0.14	0.2
B2 1m 2,7	-7.43	-5.02	0.22	0.18
B4 1m 2,7	-10.1	-8.33	0.25	0.2
B5 <sub>a</sub> 5m 2,7	-12.36	-8.67	0.1	0.16
B1 2m 6,7	-9.12	-7.96	0.21	0.31
B3	-10.08	-6.35	0.04	0.03
B5	-11.8	-6.45	0.03	0.02
A5	-10.25	-8.11	0.04	0.06
A6	-9.18	-8.94	0.03	0.05
A8	-10.81	-9.37	0.05	0.04
C5	-8.78	-6.39	0.04	0.06
C6	-9.64	-4.42	0.01	0.04
C7	-8.76	-4.3	0.02	0.04
C8	-9.78	-4.1	0.02	0.03

TABELA 2 – Assinaturas isotópicas obtidas a partir de amostras de dentes humanos provenientes do Paraguai (letra B), Amazonas (letra A) e Ceará (letra C). As amostras B2 0 a B1 (2m 6,7) foram submetidas ao experimento descrito anteriormente. Seus altos desvios padrões (dC e dO em destaque), maiores do que 0.1‰, indicam resultados insatisfatórios, confirmando que a quantidade utilizada não foi ideal. 1m a 5m denotam o tempo de exposição da amostra ao líquido com pH especificado ao lado (2,7 – vinagre - ou 6,7 – água da torneira). Padrão: VPDB

## 7.2 ASSINATURAS ISOTÓPICAS DE UNHAS HUMANAS

As 28 assinaturas isotópicas obtidas para as 14 amostras de unha analisadas são apresentadas na TABELA 3, a seguir.

Assinatura / Amostra	R1	R2	R3	R4	R5	R6	lu
Delta-C-13 (‰)	-18.15	-18.11	-18.02	-18.14	-17.94	-17.84	-17
Delta-N-15 (‰)	11.4	11.22	11.43	11.51	11.96	11.79	9.91
Assinatura / Amostra	B1	B2	B3	B4	B5	B6	Mu
Delta-C-13 (‰)	-18.38	-18.28	-17.77	-18.21	-17.85	-18.23	-17.58
Delta-N-15 (‰)	10.16	10.19	9.95	10.08	10.14	9.78	9.4

TABELA 3 - Valores de delta-C-13 e delta-N-15 obtidos para amostras de unha. Padrão: VPDB

É possível notar que não há uma mudança significativa dos valores, que se mantêm consideravelmente constantes ao longo do tempo, sobretudo para o nitrogênio, que apresenta valores mais positivos nas amostras R1 a R6. A média dos resultados do carbono para as amostras do grupo R foi de  $-18.03 \pm 0.12\text{‰}$ , ao passo que para o grupo B  $-18.12 \pm 0.25\text{‰}$ . Já o nitrogênio, para R apresenta média  $11.55 \pm 0.27\text{‰}$ , enquanto para B  $10.05 \pm 0.16\text{‰}$ . O GRÁFICO 1 apresenta o padrão de variação de delta-C-13, enquanto o GRÁFICO 2 de delta-N-15 em função das datas de coleta das amostras. Nota-se que os valores do carbono se sobrepõem, enquanto as razões isotópicas do nitrogênio encontram-se bem distintas entre os dois grupos.

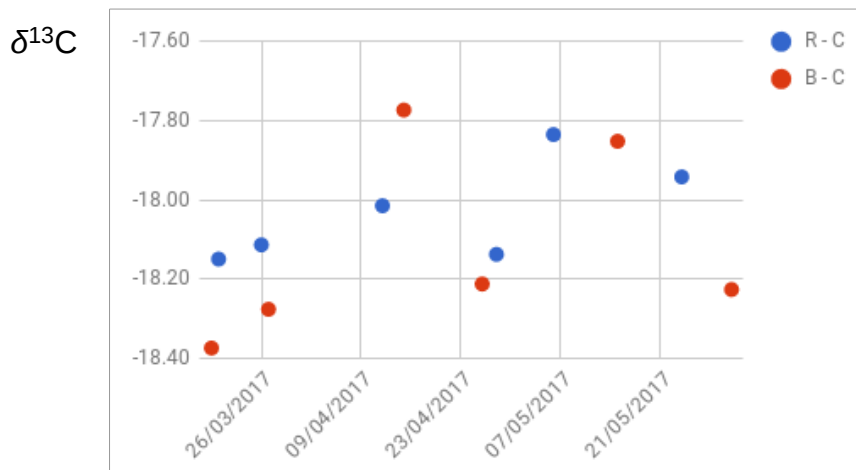


GRÁFICO 1 - Representação da variação das assinaturas isotópicas de carbono-13 obtidas com a análise de amostras de unha do grupo R e do grupo B, em função das datas de coleta.

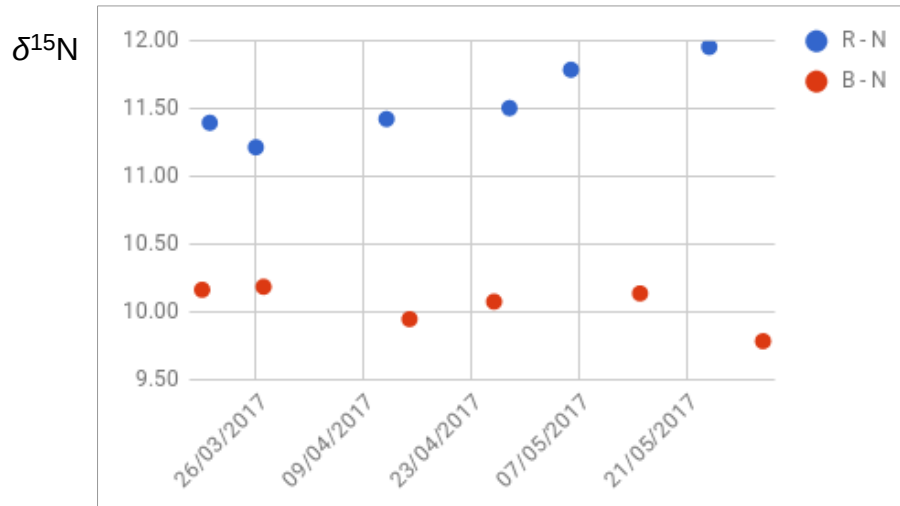


GRÁFICO 2 - Gráfico representando a variação das assinaturas isotópicas de nitrogênio-15, obtidas com a análise de amostras de unha, em função das datas de coleta. Observa-se uma melhor distinção entre os grupos R e B quando observados os valores de delta-N-15.

No GRÁFICO 3 encontram-se representados todos os valores obtidos para as 14 amostras, incluindo aquelas provenientes de São Paulo/SP (Amostras lu e Mu). Os grupos R e B são bastante distintos entre si, sobretudo devido aos valores de nitrogênio de R, o que pode ser observado no gráfico anterior. As amostras lu e Mu apresentaram resultados com valores de delta-C-13 consideravelmente menos negativos que ambos os grupos, porém são bastante similares a B em termos de delta-N-15, bastante distintos de R.

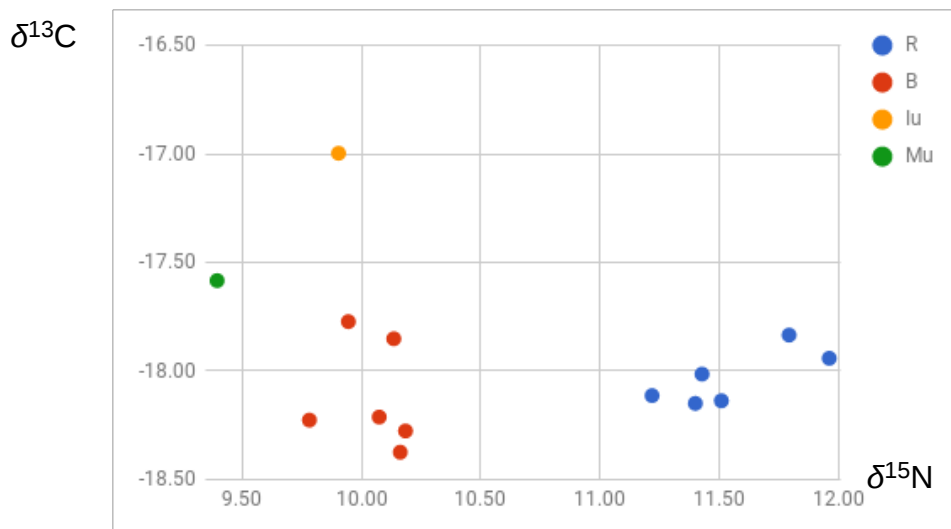


GRÁFICO 3 - Representação gráfica de todos os resultados obtidos a partir de amostras de unha. Ainda é possível constatar, como no gráfico anterior, que a distinção entre os grupos pode ser melhor realizada a partir da comparação dos valores de delta-N-15.

### 7.3 ASSINATURAS ISOTÓPICAS DE CABELOS HUMANOS

Na TABELA 4, estão dispostos os resultados do experimento com as mechas de cabelo. Nota-se uma diferença bastante pequena entre os valores de cabelo natural (Mn e Cn) e suas respectivas versões analisadas após descoloração (Md e Cd).

Assinatura / Amostra	Cn	Cd	Cp	Mn	Md	Mp
Delta-C-13 (‰)	-17.33	-17.27	-17.91	-18.09	-18.07	-19.12
Delta-N-15 (‰)	10.42	10.36	10.24	9.43	9.54	9.29

TABELA 4 - Lista dos valores de assinatura isotópica determinados para seis amostras de cabelo humano, naturais ou modificados por procedimentos estéticos. P: com tintura, D: descolorido, N: natural. Padrão: VPDB

É considerável a mudança, comparadas às anteriores, das amostras tingidas (Cp e Mp), com valores mais negativos para C e menos positivos para N. No GRÁFICO 4, esse padrão, discutido no próximo capítulo, pode ser melhor observado.

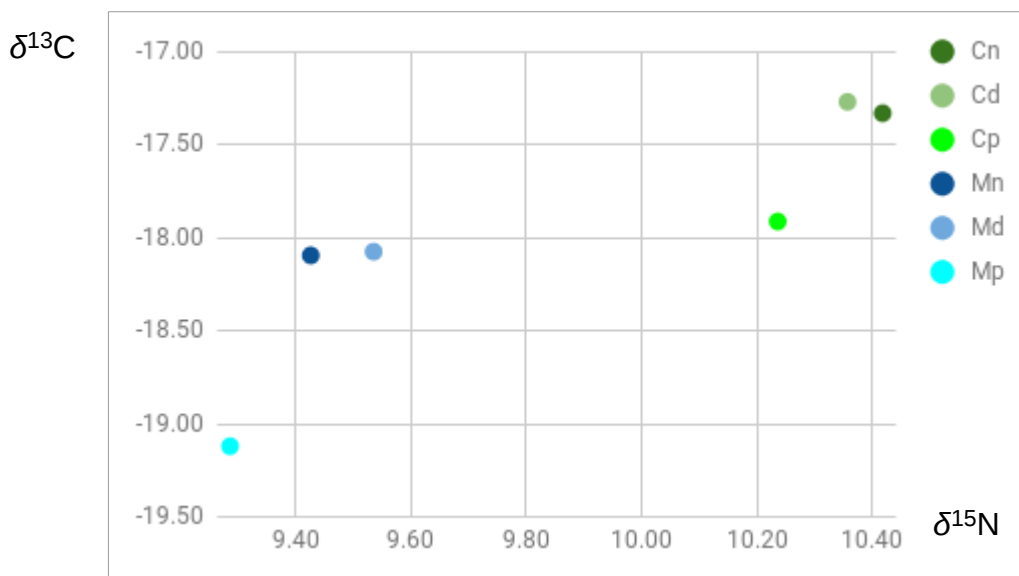


GRÁFICO 4 - Disposição gráfica dos resultados obtidos para cabelos humanos. Destaque para os valores mais negativos/menos positivos observados nas amostras com tinta de cabelo escura (Mp e Cp).

## 8 DISCUSSÕES

Os dados obtidos com a análise de dentes humanos, como já alertado anteriormente, foram insatisfatórios. Este fato se deu sobretudo devido a quantidades insuficientes de pó utilizado para a reação no espectrômetro de massa, que precisa de um volume considerável de amostra a depender da porcentagem de carbonato na mesma. Como dentes humanos contém entre 4 e 6% de carbonato, apenas, é justificável a necessidade de maiores quantidades. Se o volume de amostra for muito reduzido, as contagens dos íons são conseqüentemente baixas, o que faz com que a média calculada pelo equipamento apresente um desvio padrão alto demais, sem conformidade com os critérios de qualidade adotados, que admitem um intervalo de até  $\pm 0,1\%$ . Porém, é importante levar em consideração que o equipamento utilizado passou por manutenção apenas algumas semanas antes das análises e até então nenhuma amostra de dente havia sido passada. Com a troca de peças, algumas especificidades do maquinário são modificadas o que pode levar a resultados diferentes ainda que o método e os volumes de amostra utilizados sejam exatamente os mesmos, por isso se faz tão necessária a passagem de amostras rotineiramente, sobretudo após troca de peças, para garantir que os procedimentos adequados possam se manter os mesmos, se não, devem então ser adaptados às novas condições, o que terá de ser feito para as amostras aqui analisadas.

Ainda assim, mesmo com resultados pouco confiáveis, a princípio, a hipótese de fracionamento isotópico de amostras devido a exposição superficial a diferentes pHs, sobretudo mais ácidos do que o pH fisiológico, parece pouco provável. Os resultados de amostras paraguaias que permaneceram em vinagre por pelo menos 1 mês, mostram que suas assinaturas isotópicas foram muito menos afetadas (GRÁFICO 5) do que o esperado. Entretanto, foi nítida a influência do líquido na resistência do dente e em seu aspecto externo, o mesmo se tornou muito mais susceptível a quebra e adquiriu uma coloração externa acastanhada (FIGURA 12). É simples imaginar uma circunstância onde um indivíduo tem a assinatura isotópica de seus dentes alterada por desenvolver o hábito de ingerir bebidas com caráter ácido. Estas poderiam desencadear reações químicas na estrutura da hidroxiapatita dos dentes, que se desestabilizaria, perdendo ânions carbonato no processo, sobretudo aqueles compostos por isótopos mais leves de carbono e oxigênio o que



desencadearia assinaturas isotópicas mais positivas ou menos negativas, que não foram constatadas para a maioria das amostras analisadas. Um dos resultados é mais similar aos observados para amostras do Ceará, que apresentam valores consideravelmente menos negativos que amostras de outras localidades, contudo, não é possível afirmar se essa mudança do valor é devido à reação desencadeada pelo baixo pH ou se pode ser atribuído a um erro estatístico graças à quantidade insuficiente de amostra.

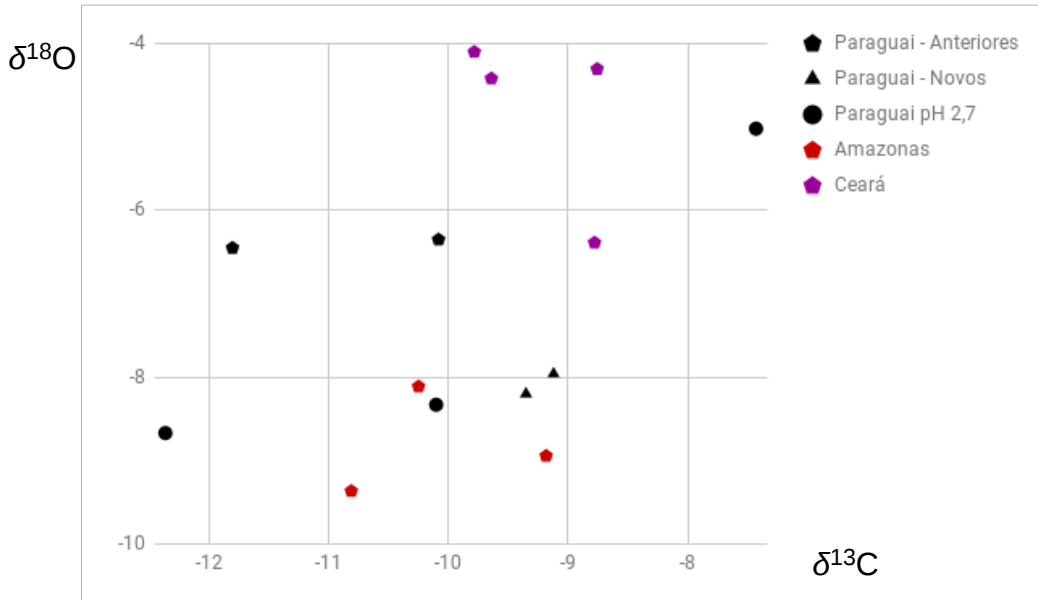


GRÁFICO 5 – Disposição dos dados de amostras de dente de diferentes localidades do Brasil. Os pentágonos representam assinaturas obtidas em experimentos anteriores, com quantidades suficientes de amostra. Observa-se que das três amostras expostas a baixo pH (círculos pretos) apenas uma apresenta assinaturas bem menos negativas, já as outras duas mantiveram o mesmo padrão observado anteriormente.



FIGURA 12 – Amostra de dente após permanecer submersa em vinagre por 5 meses. Apresenta coloração escura e maior fragilidade.

Com as amostras de unha dos grupos R e B, ambos de Curitiba/PR, foi possível constatar que as variações observadas ao longo do tempo não constituem um fator capaz de desconsiderar seu padrão. Especificamente para o carbono, é possível notar que há sobreposição dos valores inclusive quando comparando com amostras de origem paulistana. Esta similaridade é compatível com as características dos doadores, com faixa etária similar, onívoros, residentes em grandes cidades, ingerindo alimentos processados de origem comum, fator que acaba por “homogeneizar” suas assinaturas isotópicas para este elemento, especificamente. Mais curioso foram as assinaturas isotópicas do nitrogênio-15 observadas nas amostras do grupo R. Estes valores são bastante mais positivos que as assinaturas das outras três crianças. Trata-se das amostras provenientes de um bebê com apenas alguns meses de vida, alimentado exclusivamente com leite materno, o que explica os valores mais positivos. Como já explicado no *Capítulo 6*, tópico *Processos de fracionamento do Nitrogênio no ambiente*, há uma tendência a acúmulo de  $^{15}\text{N}$  no organismo dos animais, sobretudo aqueles que ingerem alimentos provenientes de outros animais, ou seja, localizados mais ao topo da cadeia trófica. A situação é análoga no caso da alimentação por leite materno, o bebê está ingerindo um alimento já enriquecido em  $^{15}\text{N}$  pelo organismo de sua mãe, fazendo com que a assinatura isotópica deste elemento em seus tecidos seja ainda mais positiva. Este resultado permite, não só distinguir os diferentes grupos de amostra como constatar experimentalmente que o processo de fracionamento do Carbono no organismo tem, de fato, uma trajetória distinta do Nitrogênio.

Os resultados obtidos para as amostras de cabelo também permitiram constatações interessantes. Observa-se que entre as amostras descoloridas e naturais (Cd e Cn/Md e Mn) a diferença de valores não é grande o suficiente para que possa ser constatado um processo de fracionamento desencadeado pela descoloração. Essencialmente, as concentrações de isótopos mais pesados em relação aos mais leves se mantiveram as mesmas, o que não pode ser afirmado para as amostras tingidas. Ambas seguiram um mesmo padrão de mudança, apresentando valores mais negativos para o Carbono-13 e também consideravelmente menores para o Nitrogênio-15. Aparentemente, a análise permitiu a detecção da assinatura isotópica do pigmento aderido ao fio após o procedimento, visto que a tinta utilizada foi a mesma, o que seria mais provável do que o desencadeamento de uma diminuição da concentração de isótopos mais pesados na estrutura do fio, já que são as

versões mais leves dos elementos as favorecidas em reações químicas, portanto as mais facilmente “removidas” do material. De qualquer forma, 6 amostras é um número demasiado pequeno para a partir dele estabelecer com certeza as causas das variações observadas. O universo amostral precisa ser aumentado, bem como as variedades de tintas e procedimentos estéticos, incluindo inclusive outros bastante comuns como alisamentos, por exemplo. Desse modo a compreensão da influência destes produtos de beleza nos resultados será mais definitiva.

## 9 CONCLUSÕES

Em conclusão, baseando-se nas observações realizadas, é possível constatar os seguintes fatos:

1 - O procedimento adotado para amostras de dente precisa ser revisto, sobretudo em termos da quantidade necessária para atingir um bom sinal no espectrômetro de massa;

2 - O padrão para determinação do volume de amostra deve seguir uma especificação menos subjetiva, para que, na ausência de ferramenta específica, não haja risco de perda de um longo ciclo analítico devido a erro da quantidade estipulada. Por isso, sugere-se sempre realizar a análise de uma única amostra, antes do procedimento total, para avaliar as contagens detectadas pelo equipamento para aquele volume e tempo de reação;

3 - Aparentemente a exposição a líquidos ácidos não é suficiente para modificar as assinaturas isotópicas dos dentes, ainda que seja capaz de mudar sua resistência física e aspecto externo. Entretanto, mais uma vez, os procedimentos precisam ser conduzidos novamente;

4 - As assinaturas de Carbono-13 de unhas, mesmo para indivíduos de estados diferentes, varia pouco, o que pode ser devido a um mesmo padrão de dieta;

5 - O padrão do Nitrogênio-15 nos organismos de origem das amostras de fato percorre uma trajetória distinta do Carbono e permitiu a distinção entre um bebê de menos de um ano e seu irmão mais velho;

6 - Os resultados indicam que a descoloração de fios de cabelo não é capaz de alterar a assinatura isotópica destes, entretanto é necessário aumentar o número de amostras para observar se a similaridade se mantém também em grande escala;

7 - A princípio, tintas de cabelo influenciam as assinaturas isotópicas obtidas para a amostra, modificando-as consideravelmente, possivelmente devido à detecção da assinatura isotópica do pigmento da tinta. É necessário aumentar o espaço amostral, diversificando marcas e tonalidades. Se confirmada a alteração, é importante realizar a análise novamente após submeter as amostras tingidas a descoloração ou retirada de pigmentos para observar se o valor retorna ao original. Se sim, já será possível definir uma medida mitigadora da influência deste tipo de procedimento estético nos cabelos analisados no contexto de uma verdadeira investigação criminal;

De modo geral, os resultados produzidos mostram que, aparentemente, fatores externos, ainda que importantes, são incapazes de alterar completamente as assinaturas isotópicas produto de complexos processos de fracionamento *in vivo*, ao passo que destacam a necessidade de aumentar o número de amostras, o que poderia ser considerado mandatório em qualquer pesquisa que envolva aplicações em Ciências Forenses. Deve-se ter em mente que os procedimentos adotados pressupõem a utilização por órgãos periciais, portanto carregam em si uma grande responsabilidade social. A partir do momento que a liberdade ou condenação de um ser humano, ou mesmo seu direito (ou direito de sua família) à justiça, dependem ainda que parcialmente de resultados produzidos seguindo protocolos estabelecidos com a avanço de pesquisas como esta, toda a rigorosidade do método é pouca.

## 10 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A aplicação da técnica de análise de isótopos estáveis em tecidos humanos como ferramenta para identificação de restos mortais é bastante promissora e, com a divulgação de trabalhos onde resultados foram utilizados com sucesso e permitiram a conclusão de casos considerados de alta complexidade, nota-se a necessidade de avanço dessa ciência no Brasil, sobretudo levando em consideração as frequentes notícias de superlotação dos Institutos Médicos Legais (IML) em todo o país, não raro com quantidade de corpos acima de suas capacidades, com grande número de cadáveres não identificados que acabam enterrados em valas comuns pelo sistema funerário dos estados do país.

Como apresentado neste trabalho, trata-se de uma área de atuação onde o aprimoramento só é garantido, com eficiência, a partir do momento que as contribuições são realizadas por profissionais de diferentes formações, trabalhando em conjunto nas universidades.

Os experimentos aqui descritos, mais especificamente, comprovam que, ainda que em seus primeiros passos no Brasil, a AIE nas Ciências Forenses em geral está, e continuará, avançando. Um dos grandes desafios enfrentados pelos pesquisadores da área diz respeito à dificuldade de aumento do universo amostral adotado, graças a enfadonhos processos burocráticos para obtenção e utilização de maior número de amostras, por isso, para desenvolvimento da “cultura forense” no país, não só com a utilização de técnicas clássicas de geoquímica mas também tantas outras possibilidades inexploradas de aplicação de tecnologias avançadas em perícia criminal, é necessária a expansão do estabelecimento de parcerias entre grupos de pesquisa de diferentes universidades e órgãos de perícia, com sua maior influência política, facilitando o acesso ao material necessário.

## REFERÊNCIAS

- Chesson L.A., Tipple B.J., Howa J.D., Bowen G.J., Barnette J.E., Cerling T.E. e Ehleringer J.R. 2014. Stable Isotopes in Forensics Applications. In: Holland H.D. e Turekian K.K. (eds.) *Treatise on Geochemistry*. 2<sup>a</sup> ed., vol. 14. Elsevier, Oxford, p. 285-317.
- Craig, H. 1961. Isotopic variations in meteoric waters. *Science Magazine*, 133(3465):1702-3.
- Dostie P. 2007. Case Number 03-0929: Murder in Mammoth Lakes. *Forensic Magazine*. Disponível em: <https://www.forensicmag.com/article/2007/01/case-number-03-0929-murder-mammoth-lakes>. Acessado em 21 de maio de 2017.
- Dunn, S. 2007. Gas Source Mass Spectrometry: Stable Isotope Geochemistry. Geochemical Instrumentation and Analysis. *Science Education Resource Center, Carleton College*. Northfield, Minnesota/EUA. [https://serc.carleton.edu/research\\_education/geochemsheets/techniques/gassourcemassspec.html](https://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/techniques/gassourcemassspec.html) Acesso em Outubro/2017.
- Ehleringer J.R., Cerling T.E., West J.B. 2007. Forensic Science Applications of Stable Isotope Ratio Analysis. In: Blackledge R.D.(ed). *Forensic Analysis on the Cutting Edge: New Methods for Trace Evidence Analysis*. Wiley, New Jersey, p. 399-422.
- Ferreira, A.I.A.J.V. 2008. Espectrometria de massa de razões isotópicas. *Tese de doutoramento em Química. Universidade de Lisboa*, Especialidade em Química Analítica. Departamento de Química e Bioquímica. Lisboa, Portugal. 299p.
- Fraser I., Meier-Augenstein W., Kalin R.M. 2008. Stable Isotope Analysis of Human Hair and Nail Samples: the Effects of Storage on samples. *Journal of Forensic Sciences*. American Academy of Forensic Sciences. Wiley, Medford, 53(1):95-99.
- Gagnani, J. G. ; Garavello, M. E. P. E. ; Silva, R. J. ; Nardoto, G. B. ; Martinelli, L. A. 2013. Can stable isotope analysis reveal dietary differences among groups with distinct income levels in the city of Piracicaba (southeast region, Brazil)?. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, v. 10.

Grinspoon S.K., Baum H.B., Kim V., Coggins C., Klibanski A. 1995. Decreased Bone Formation and Increased Mineral Dissolution During Acute Fasting in Young Women. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. Oxford Academic, Oxford, 80(12):3628-3633.

Klepinger L.L. 2006. Fundamentals of Forensic Anthropology. *Foundations of human biology Series*. John Wiley & Sons, New Jersey. 185 p.

Klepinger L.L., Mintel R.W. 1986. Metabolic considerations in reconstructing past diet from stable carbon isotope ratios of bone collagen. In: *Proceedings of the 24th International Archaeometry Symposium*. Smithsonian Institution Press. Washington, p. 43-48.

Leventouri, T.; Antonakos, A.; Kuriacou, A.; Venturelli, R.; Liarokapes, E.; Perdikatsis, V. 2009. Crystal Structure Studies of Human Dental Apatite as a Function of Age. *International Journal of Biomaterials*, vol. 2009, 6p, ID 698547.

Meier-Augenstein W., Fraser I. 2007. Forensic Isotope Analysis Leads to Identification of a Mutilated Murder Victim. *Journal of the Forensic Science Society*. Elsevier, Dublin, p. 153-159.

Muniz T.R., Salvador F.A.S., Ozahata L.K.M., Silva T.G., Reis Neto J.M., Bahniuk A.M. 2016. C & O Isotope Signatures in Human Teeth: Correlation with Geographic Provenance in Brazil. In: *ANZFSS 23<sup>rd</sup> International Symposium on the Forensic Sciences*. Australian and New Zealand Forensic Science Society. Auckland, p. 115-116.

Nardoto, G.B. ; Murrieta, R.S.S. ; Prates, L.E.G.; Adams, C.; Garavello, M.E.P.E.; Schor, T.; De Moraes, A.; Rinaldi, F.D.; Gragnani, J.G.; Moura, E.A.F.; Duarte-Neto, P.J.; Martinelli, L.A. 2011. Frozen chicken for wild fish: Nutritional transition in the Brazilian Amazon region determined by carbon and nitrogen stable isotope ratios in fingernails. *American Journal of Human Biology*, v. 23, p. 642-650.

Nohynek G.J., Fautz R., Benech-Kieffer F., Toutain H. 2004. Toxicity and Human Health Risk of Hair Dyes. *Food and Chemical Toxicology*. Elsevier. Amsterdam, 42(4):517-543.



Reitesema L.J. 2015. Laboratory and Field Methods for Stable Isotope Analysis in Human Biology. *American Journal of Human Biology*, Wiley Periodicals. Medford, 27:593-604.

Roy D.M., Hall R., Mix A.C., Bonnicksen R. 2005. Using Stable Isotope Analysis to Obtain Dietary Profiles From Old Hair: A Case Study From Plains Indians. *American Journal of Physical Anthropology*, Wiley Periodicals. Medford, 128:444-452.

Souza, P.C. 2015. Análise de apatita de dentes humanos por difratometria de raios X e microscopia eletrônica de varredura: aplicação em Ciências Forenses para estimativa de idades de indivíduos. 50f. *Trabalho de conclusão de curso. Curso de graduação em geologia*. Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR.

Smith, B.N., Epstein, S. 1971. Two categories of  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratios in higher plants. *Journal of Plant Physiology*, 47(3): 380–384.

Someda, H.; Gakuhari, T.; Akai, J.; Araki, Y.; Koderu, T.; Tsumatori, G.; Kobayashi, Y.; Matsunaga, S.; Hashimoto, M.; Saito, M.; Yoneda, M.; Ishida, H. 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 Science International*, 2016.

Sulzman E.W. 2007. Stable Isotope chemistry and measurement: a primer. In: Michener R., Lajtha K. (eds.) *Stable Isotopes in Ecology and Environmental Science*. Blackwell Publishing, Oxford, p. 1-21.

Tykot R.H. 2006. Isotope Analysis and the Histories of Maize. In: Benz B., Tykot R.H. e Staller J. (eds.) *Histories of Maize in Mesoamerica: Multidisciplinary Approaches*. Routledge, New York, p. 131-142.

Urey, H.C. 1947. The thermodynamic properties of isotopic substances. *Journal of the Chemical Society*, Issue 0, 562-581p.