



Filipe Rodrigues dos Santos

Licenciado em Ciências de Engenharia Biomédica

Estudo espectral de estruturas ósseas para avaliação da contaminação por metais pesados

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Biomédica

Orientador: Prof. Doutor António Alberto Dias
Faculdade de Ciências e Tecnologias,
Universidade Nova de Lisboa

Co-orientadores: Prof. Doutora Sofia Pessanha,
Faculdade de Ciências e Tecnologias,
Universidade Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Carla Quintão

Arguentes: Prof. Doutora Diana Guimarães

Vogais: Prof. Doutor António Alberto Dias

Dezembro, 2020



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Estudo espectroscópico de estruturas ósseas para avaliação da contaminação por metais pesados

Copyright © Filipe Rodrigues dos Santos, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Em memória dos meus avós.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiro aos meus orientadores, Professor António Dias e Professora Sofia Pessanha por todo o apoio que me deram desde o início da realização desta dissertação. Quer pela ajuda que me forneceram nas etapas iniciais, na explicação do funcionamento do equipamento e dos conceitos teóricos de fluorescência de raios-X, na preparação das amostras, e na integração no laboratório, mas também pela constante atenção e acompanhamento que tiveram para com o meu trabalho ao longo dos meses. As horas e paciência, que dedicaram a ajudar-me na escrita da tese e na sua correção, é algo que vou guardar com muito carinho.

Um especial agradecimento ao professor Francisco Curate, pelo fornecimento das amostras e pelos comentários sobre os meus resultados, e à Professora Sofia Barbosa, pela explicação da linguagem de programação R, que se tornou uma ferramenta muito útil no tratamento estatístico do meu trabalho. Um especial agradecimento também à Professora Maria Luísa Carvalho pela transmissão dos seus vastos conhecimentos sobre a fluorescência de raios-X.

Quero agradecer também a todos meus amigos que me acompanharam ao longo deste percurso académico, da faculdade e de fora do meio académico, e que me proporcionaram memórias que vou guardar para sempre. Quero agradecer também à minha família, nomeadamente aos meus pais, pelo apoio constante que me deram ao longo destes 5 anos. E ao meu irmão David pelos conselhos e horas de diversão a fio.

Por fim, um agradecimento sentido ao meu avô António Rodrigues e avó Cassilda de Jesus, que ao longo da sua vida foram o maior exemplo de resiliência e, conseguiram mesmo assim, construir uma maravilhosa família, pautada por valores de solidariedade, justiça e fé. A educação que eles proporcionaram à minha mãe e aos meus tios e estes, por sua vez, aos seus filhos, foi o que me permitiu alcançar esta etapa.

Resumo

O ser humano encontra-se exposto à contaminação por metais pesados, e sujeito aos seus efeitos adversos na saúde, desde há milhares de anos. O estudo elementar de estruturas ósseas de antepassados é uma ferramenta útil para compreender e determinar a extensão dessa contaminação, devido à acumulação nos ossos de substâncias não excretadas. O objetivo desta dissertação foi a quantificação de metais pesados e elementos traço nos ossos de 8 indivíduos (II e I Milénios A.N.E.) inumados no Túmulo Megalítico de Santa Rita, recorrendo à Micro-Fluorescência de raios-X. Tendo em conta a relação da incorporação dos elementos traço e metais pesados com as condições *in vivo* de uma população, foi possível determinar os hábitos alimentares e a exposição a metais pesados dos indivíduos. Os elementos estudados foram o Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, As, Br, Sr, Cd, Hg e o Pb.

Os resultados obtidos demonstram que a exposição *in vivo* destes 8 indivíduos aos metais pesados As, Cd, e Pb, seria reduzida, visto que estes metais estavam ausentes, ou presentes em baixas concentrações, nos ossos. Relativamente ao Hg, como foram detetadas elevadas concentrações deste metal nos solos das áreas de inumação dos indivíduos 4, 7, e 8, é possível que as populações contemporâneas a esses indivíduos usassem cinábrio nos rituais fúnebres. Para o Cu foram obtidos resultados inconclusivos. O Mn, Fe, e Ni, terão sido incorporados nos ossos *post-mortem*. As elevadas concentrações de Br e baixas de Zn e Sr medidas nos ossos dos 8 indivíduos são indicativas de uma dieta rica em alimentos marinhos, nomeadamente em peixes, e pobre em carnes e vegetais. A comparação dos níveis de Br e dos rácios Zn/Ca e Sr/Ca obtidos neste trabalho, com os valores observados por outros autores no estudo de uma população moderna que habitava noutra zona costeira de Portugal, demonstrou que os habitantes dos arredores do Túmulo Megalítico de Santa Rita na antiguidade constituíam essencialmente comunidades piscatórias.

Palavras chave: Espectrometria por Micro-Fluorescência de raios-X, ossos, metais pesados, elementos traço, condições *in vivo*, contaminação.

Abstract

The human being has been exposed to heavy metals contamination, and subject to their adverse health effects, for thousands of years. The elemental study of bone structures of ancestors is a useful tool to understand and determine the extent of that contamination, due to the accumulation in the bones of unexcreted substances. The purpose of this thesis was the quantification of heavy metals and trace elements in the bones of 8 individuals (2nd and 1st Millennium B.C.E.) buried in Santa Rita Megalithic Tomb, by using Micro X-ray Fluorescence. By considering the relation of trace elements and heavy metals incorporation with a population *in vivo* conditions, it was possible to determine the dietary habits and heavy metal exposure of the individuals. The elements studied were Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, As, Br, Sr, Cd, Hg and Pb.

The obtained results demonstrate that the *in vivo* exposure of the 8 individuals to the heavy metals As, Cd, and Pb, was reduced, since these metals were absent, or present in low concentrations, in the bones. Regarding Hg, since it was detected high concentrations of this metal in the soil of the individual's 4, 7, and 8, burial areas, it is likely that the contemporary populations of these individuals used cinnabar in funeral rituals. For Cu, inconclusive results were obtained, while Mn, Fe, and Ni were incorporated *post-mortem* in the bone. The high Br and low Zn and Sr concentrations measured in the bones of the 8 individuals indicate a diet rich in marine foods, namely fish, and poor in meats and vegetables. The comparison of the levels of Br and of the Zn/Ca and Sr/Ca ratios obtained in this work, with the values observed by other authors in the study of a modern population that lived in another coastal region of Portugal, demonstrated that the inhabitants of the surroundings of the Megalithic Tomb of Santa Rita in antiquity would essentially constitute fishing communities.

Keywords: Micro X-ray Fluorescence spectrometry, bones, heavy metals, trace elements, *in vivo* conditions, contamination.

Conteúdo

Resumo.....	ix
Abstract.....	xi
Lista de figuras.....	xvii
Lista de símbolos.....	xxiii
Lista de siglas.....	xxv
Capítulo 1: Introdução	1
1.1 Objetivo	1
1.2 Contexto arqueológico	2
Capítulo 2: Ossos.....	7
2.1 Composição	7
2.2 Estrutura	8
Capítulo 3: Metais pesados	11
3.1 Impacto na saúde óssea	12
Capítulo 4: Elementos essenciais e não essenciais ao organismo.....	13
4.1 Manganês.....	14
4.2 Ferro	15
4.3 Níquel	16
4.4 Cobre	17
4.5 Zinco.....	18
4.6 Arsênio	19
4.7 Bromo.....	20
4.8 Estrôncio.....	20
4.9 Cádmio	21
4.10 Mercúrio	22
4.11 Chumbo	23

Capítulo 5: Técnica Analítica de Fluorescência de raios-X	25
5.1 Produção de raios-X	27
5.2 Transições Radiativas e não Radiativas	29
5.3 Interação com a matéria	31
5.3.1 Efeito fotoelétrico	32
5.3.2 Dispersão de Compton	33
5.3.3 Dispersão de Rayleigh	34
5.3.4 Produção de pares	34
5.4 Fluorescência de raios-X dispersiva em energia	36
5.4.1 Fonte de excitação	37
5.4.2 Detetor	38
5.4.3 Micro-Fluorescência de raios-X com geometria convencional (μ -XRF)	39
5.4.4 Espectro de raios-X	41
Capítulo 6: Metodologia	45
6.1 Descrição das amostras	45
6.2 Preparação das amostras	46
6.2.1 Preparação de pastilhas	46
6.2.2 Preparação de osso para mapeamento	49
6.3 Análise das amostras	49
6.3.1 Pastilhas	49
6.3.2 Fatia	51
6.4 Quantificação	52
6.4 Limites de detecção e exatidão	54
Capítulo 7: Discussão de resultados	57
7.1 Quantificação das pastilhas	57
7.1.1 Manganês	59
7.1.2 Ferro	62
7.1.3 Níquel	64
7.1.4 Cobre	66
7.1.5 Zinco	67
7.1.6 Arsênio	70
7.1.7 Bromo	71
7.1.8 Estrôncio	73

7.1.9 Mercúrio	75
7.2 Mapeamento da fatia	77
7.3 Discussão: Metais pesados	80
7.4 Discussão: Dieta alimentar	81
Capítulo 8: Conclusões e perspectivas futuras.....	85
8.1 Conclusões.....	85
8.2 Perspectivas futuras.....	86
Bibliografia	87

Lista de figuras

Figura 1.1: Vista aérea desde norte, com o litoral em pano de fundo, do anfiteatro natural controlado visualmente pelo monumento (Fotografia de Lúcio Alves).	3
Figura 1.2: Fotografia aérea do túmulo megalítico de Santa Rita após a conclusão dos trabalhos arqueológicos em 2008.....	3
Figura 1.3: Perspetiva geral dos contextos internos de utilização da câmara funerária.	4
Figura 1.4: Fotografia da necrópole externa, situada sobre o tumulus que cobria a câmara funerária.	5
Figura 2.1: Diagrama esquemático da tíbia.	9
Figura 5.1: O mecanismo da geração de raios-X característicos.....	26
Figura 5.2: Espectro de energia contínua (genérico) resultante da desaceleração de partículas carregadas.	27
Figura 5.3: Espectro de energia discreta (genérico) resultante das transições eletrónicas num átomo.....	28
Figura 5.4: Diagrama de níveis eletrónicos e principais transições de raios-X.....	29
Figura 5.5: Diagrama esquemático que ilustra o processo de emissão de eletrões de Auger e de fluorescência de raios-X.....	30
Figura 5.6: Rendimento de fluorescência e de efeito de Auger em função do número atómico de um átomo, para lacunas existentes na camada <i>K</i>	31
Figura 5.7: Ilustração do efeito de Compton.	33
Figura 5.8: Ilustração da dispersão de Rayleigh.....	34
Figura 5.9: Gráfico do coeficiente de atenuação linear total em função da energia do fóton incidente, assim como as contribuições das dispersões de Rayleigh (R), Compton (C), efeito fotoelétrico (PE), e produção de pares (PP).....	35
Figura 5.10: Esquema dos principais componentes de um espectrómetro de EDXRF.	36
Figura 5.11: Esquema de um tubo de raios-X com janela lateral.....	37

Figura 5.12: Espectro típico de um feixe de raios-X à saída de um tubo de raios-X.....	38
Figura 5.13: Componentes do sistema M4 Tornado.....	40
Figura 5.14: Visão geral esquemática do espectrómetro M4 Tornado.....	41
Figura 5.15: Espectro de raios-X de uma amostra óssea analisada por μ -XRF no M4-Tornado da Bruker (FCT-UNL), nas condições 50 kV, 300 μ A com um filtro de Al-12,5 μ m.	42
Figura 5.16: Espectros de raios-X de uma amostra óssea analisada por μ -XRF no M4-Tornado da Bruker (FCT-UNL), nas condições 50 kV, 300 μ A com um filtro de Al-12,5 μ m (espectro azul) e com um filtro de AlTiCu – 100/50/25 μ m (espectro verde).	43
Figura 6.1: Amostras ósseas antes (imagem da esquerda) e depois (imagem da direita) do processo de limpeza em água corrente.....	47
Figura 6.2: Material utilizado para obter e armazenar o pó dos ossos.	47
Figura 6.3: Prensa hidráulica manual de 13 toneladas da Specac e equipamento acessório utilizados para comprimir o pó dos ossos e o sedimento do solo em pastilhas.	48
Figura 6.4: Pastilhas das amostras ósseas coladas numa película de Mylar num suporte de 50x50 mm.	48
Figura 6.5: Colocação das pastilhas na plataforma X-Y-Z do espectrómetro M4 Tornado previamente à análise de micro fluorescência.	50
Figura 6.6: Espectro de raios-X de uma amostra óssea analisada por μ -XRF no M4-Tornado da Bruker (FCT-UNL), nas condições 50 kV, 300 μ A com um filtro de Al-12,5 μ m.	50
Figura 6.7: Espectro de raios-X de uma amostra óssea analisada por μ -XRF no M4-Tornado da Bruker (FCT-UNL), nas condições 50 kV, 600 μ A com um filtro de AlTiCu – 100/50/25 μ m.	51
Figura 7.1: Diferentes componentes de um diagrama de caixa.	59
Figura 7.2: Concentrações de Mn (μ g/g) nos ossos compactos dos 8 indivíduos inumados na Necrópole externa.	60
Figura 7.3: Concentrações de Mn (μ g/g) nos solos das 5 áreas de inumação.	60
Figura 7.4: Concentrações de Mn (μ g/g) no fémur do indivíduo 3 e no fémur e úmero do indivíduo 5.	61

Figura 7.5: Concentrações de Mn ($\mu\text{g/g}$) na costela e crânio do indivíduo 7 e no crânio e fêmur do indivíduo 8.	62
Figura 7.6: Concentrações de Fe ($\mu\text{g/g}$) nos ossos compactos dos 8 indivíduos inumados na Necrópole externa.	63
Figura 7.7: Concentrações de Fe ($\mu\text{g/g}$) nos solos das 5 áreas de inumação.	63
Figura 7.8: Concentrações de Fe ($\mu\text{g/g}$) nos fêmures dos indivíduos 3 e 5, no úmero do indivíduo 6 e crânio do indivíduo 7.	64
Figura 7.9: Concentrações de Ni ($\mu\text{g/g}$) nos ossos compactos dos 8 indivíduos inumados na Necrópole externa.	65
Figura 7.10: Concentrações de Ni ($\mu\text{g/g}$) nos solos das 5 áreas de inumação.	65
Figura 7.11: Concentrações de Cu ($\mu\text{g/g}$) nos ossos compactos dos 8 indivíduos inumados na Necrópole externa.	66
Figura 7.12: Concentrações de Cu ($\mu\text{g/g}$) nos solos das 5 áreas de inumação.	67
Figura 7.13: Concentrações de Zn ($\mu\text{g/g}$) nos ossos compactos dos 8 indivíduos inumados na Necrópole externa.	68
Figura 7.14: Concentrações de Zn ($\mu\text{g/g}$) nos solos das 5 áreas de inumação.	68
Figura 7.15: Concentrações de As ($\mu\text{g/g}$) nos ossos compactos dos indivíduos inumados na Necrópole externa.	70
Figura 7.16: Concentrações de As ($\mu\text{g/g}$) nos solos das 5 áreas de inumação.	71
Figura 7.17: Concentrações de Br ($\mu\text{g/g}$) nos ossos compactos dos 8 indivíduos inumados na Necrópole externa.	72
Figura 7.18: Concentrações de Br ($\mu\text{g/g}$) nos solos das 5 áreas de inumação.	72
Figura 7.19: Concentrações de Sr ($\mu\text{g/g}$) nos ossos compactos dos 8 indivíduos inumados na Necrópole externa.	73
Figura 7.20: Concentrações de Sr ($\mu\text{g/g}$) nos solos das 5 áreas de inumação.	74
Figura 7.21: Concentrações de Hg ($\mu\text{g/g}$) nos ossos compactos do indivíduo 8.	76
Figura 7.22: Concentrações de Hg ($\mu\text{g/g}$) nos solos das 5 áreas de inumação.	76
Figura 7.23: Concentrações de Hg ($\mu\text{g/g}$) nos ossos esponjosos dos indivíduos 4 e 7.	77

Figura 7.24: Fotografia da secção transversal da ulna do indivíduo 7 obtida no interior do espectrómetro M4 Tornado e delimitação (contorno verde) da área analisada.78

Figura 7.25: Mapeamento do P, Ca, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Br, e Sr, ao longo da secção transversal da ulna do indivíduo 7, recorrendo ao espectrómetro M4 Tornado.79

Lista de tabelas

Tabela 6.1: Informações relativas aos 8 indivíduos inumados na necrópole externa.	46
Tabela 6.2: Limites de detecção e exatidão ($\mu\text{g/g}$) no M4 Tornado para o padrão “Bone Ash SRM NIST-1400” utilizando um filtro Al-12,5 μm e 300 μA de corrente.	54
Tabela 6.3: Limites de detecção e exatidão ($\mu\text{g/g}$) no M4 Tornado para o padrão “Bone Ash SEM NIST-1400” utilizando um filtro AlTiCu e 600 μA de corrente.	55
Tabela 6.4: Limites de detecção e exatidão ($\mu\text{g/g}$) no M4 Tornado para o padrão “SRM IAEA-soil 7” utilizando um filtro Al-12,5 μm e 300 μA de corrente.	55
Tabela 6.5: Limites de detecção e exatidão ($\mu\text{g/g}$) no M4 Tornado para o padrão “SRM IAEA-soil 7” utilizando um filtro AlTiCu e 600 μA de corrente.	56
Tabela 7.1: Concentração ($\mu\text{g/g}$) de alguns elementos traço nos ossos do indivíduo 5 e no solo da sua área de inumação.	58
Tabela 7.2: Concentrações de alguns elementos traço ($\mu\text{g/g}$) obtidas no estudo de estruturas ósseas de indivíduo modernos e de diferentes períodos históricos.	58
Tabela 7.3: Parâmetros de referência para o rácio Zn/Ca.	69
Tabela 7.4: Resultados do rácio Zn/Ca para as 8 indivíduos e classificação da sua dieta.	69
Tabela 7.5: Parâmetros de referência para o rácio Sr/Ca.	74
Tabela 7.6: Resultados do rácio Sr/Ca para as 8 indivíduos e classificação da sua dieta.	75
Tabela 7.7: Resultados do rácio Zn/Ca para os 8 indivíduos do Tumulo Megalítico de Santa Rita e para os indivíduos #4, #6, #10, #17, e #31, da Ermida do Espírito Santo, e classificação da sua dieta.	82
Tabela 7.8: Resultados do rácio Sr/Ca para os 8 indivíduos do Tumulo Megalítico de Santa Rita e para os indivíduos #4, #6, #10, #17, e #31, da Ermida do Espírito Santo, e classificação da sua dieta.	83

Lista de símbolos

K_{α}	Radiação característica resultante da transição da camada L para a camada K
L_{α}	Radiação característica resultante da transição da camada M para a camada L
E	Energia do fóton
k_1	Constante dependente da linha espectral
k_2	Constante dependente da linha espectral
Z	Número atômico
ω_A	Rendimento do Efeito de Auger
ω_X	Rendimento de Fluorescência
W_X	Probabilidade de ocorrer uma transição radiativa
W_A	Probabilidade de ocorrer uma transição não radiativa
K	Série de orbitais com o número quântico principal igual a 1
L	Série de orbitais com o número quântico principal igual a 2
M	Série de orbitais com o número quântico principal igual a 3
I_x	Intensidade transmitida pelo material absorvedor
I_0	Intensidade inicial do feixe incidente
μ	Coeficiente linear de atenuação total
x	Espessura
ρ	Densidade
N_{AV}	Número de Avogadro
A	Número de massa
σ_{tot}	Secção eficaz total
E_k	Energia Cinética
h	Constante de Planck
ν	Frequência
E_b	Energia de ligação do eletrão

θ	Ângulo entre a direção da radiação incidente e a direção da radiação emitida
ϕ	Ângulo entre a direção da radiação incidente e a direção do elétron de Compton
m_o	Massa do elétron em repouso
c	Velocidade da luz no vácuo
I_i	Intensidade de fluorescência emitida pelo analito i
Ω	Ângulo sólido
Q_i	Sensibilidade do espectrómetro para a radiação característica do analito i
W_i	Fração mássica do analito i
W_j	Fração mássica do elemento da matriz j
λ_{min}	Comprimento de onda mínimo correspondente à energia máxima do espectro
λ_{edge}	Comprimento de onda da descontinuidade de absorção do analito i
$\tau_i(\lambda)$ de onda λ	Coefficiente de absorção fotoelétrico do analito i para a radiação primária de comprimento de onda λ
$I_0(\lambda)$	Intensidade da radiação primária de comprimento de onda λ
q_i	Sensibilidade do método para o analito i
$\chi(\lambda, \lambda_i)$	Coefficiente de atenuação mássico total da amostra para a radiação primária λ e radiação fluorescente λ_i
ϕ_1	Ângulo de incidência da radiação primária
S_{ij}	Termo de reforço para o elemento j da matriz que pode aumentar a emissão de radiação característica do elemento i
C_i	Concentração do elemento i
N_B	Taxa de contagem para o fundo
N_P	Taxa de contagem para o pico correspondente
Q_1	Quartil inferior
Q_3	Quartil superior

Lista de siglas

A.N.E.	Antes da Nossa Era
EDXRF	Fluorescência de raios-X por dispersão em energia
IAEA	<i>International Atomic Energy Agency</i>
IDR	Ingestão diária recomendada
IQR	Intervalo Interquartil
LM	Limite de Detecção
NIST	<i>Nacional Institute for Standards Technology</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
SDD	<i>Silicon Drift Detector</i>
SRM	<i>Standard Reference Materials</i>
μ -XRF	Micro fluorescência de raios-X
WDXRF	Fluorescência de raios-X por dispersão em comprimento de onda
XRF	Espectrometria por fluorescência de raios-X

CAPÍTULO

1

Introdução

1.1 Objetivo

Desde há milhares de anos que os seres humanos usam e convivem em ambientes ricos em metais pesados. Embora vários efeitos adversos destes metais na saúde humana sejam atualmente do nosso conhecimento, a exposição a metais pesados continua a ser muito significativa nos dias de hoje, quer por exemplo através da dieta alimentar, quer pelas condições ambientais específicas de trabalho e de lazer. A exposição ao chumbo, cádmio, mercúrio e arsénio representam as principais ameaças de metais pesados à saúde pública. Vários trabalhos científicos mostram que os ossos são a localização do organismo privilegiada para a acumulação de alguns destes metais [1]. No entanto, ainda são insuficientes as informações sobre os mecanismos de ação que originam os efeitos tóxicos desses depósitos de metais pesados. Para aumentar este conhecimento é fundamental medir a distribuição espacial de elementos traço no esqueleto humano, essenciais ao normal funcionamento do sistema biológico, tais como o cálcio, zinco, e o estrôncio, e a distribuição de metais pesados acima indicados, sobretudo de períodos históricos, em que não havia preocupação com a exposição às fontes de contaminação [1, 2, 3].

A determinação e quantificação de elementos traço e metais pesados em ossadas humanas pré-históricas também é importante devido à relação da incorporação desses elementos com os hábitos alimentares, condições ambientais e de vida de uma população. A definição de marcadores elementares pode desempenhar um papel importante para os arqueólogos, contribuindo para a reconstrução da história humana e da economia alimentar de populações antigas [4].

Deste modo, o objetivo deste trabalho é compreender a acumulação de metais pesados nas diferentes estruturas ósseas, através da quantificação e avaliação da distribuição espacial de elementos traço e metais pesados em ossos de cerca de 8 indivíduos que viveram nos últimos dois Milénios A.N.E, recorrendo à técnica espectroscópica de Micro-Fluorescência de Raios-X. A realização deste trabalho

decorreu no laboratório de Física Atómica e Molecular, do departamento de Física da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa.

Este trabalho está dividido em 8 capítulos. No primeiro capítulo são estabelecidos os objetivos deste trabalho, e o seu contributo para as diferentes áreas do conhecimento. Neste capítulo também é fornecido um contexto arqueológico das amostras ósseas analisadas. No capítulo 2, estão presentes as principais características dos ossos, de modo a compreender mais facilmente como os diferentes metais pesados e elementos traço se acumulam nos ossos de um indivíduo. No capítulo 3 é conferido destaque aos metais pesados, nomeadamente às suas fontes de contaminação e ao impacto na saúde óssea devido à sua exposição excessiva. As principais características destes metais e de outros elementos traço presentes nos ossos são referidas no capítulo 4. No capítulo 5 são explicados os fundamentos teóricos das técnicas de fluorescência de raios-X e é descrito o espectrómetro utilizado na realização deste trabalho. O procedimento experimental utilizado e os resultados obtidos neste trabalho estão descritos nos capítulos 6 e 7, respetivamente. Por fim, no último capítulo estão presentes as conclusões e as perspetivas de trabalhos futuros.

1.2 Contexto arqueológico

As amostras ósseas analisadas nesta dissertação foram obtidas no Túmulo Megalítico de Santa Rita durante os trabalhos arqueológicos desenvolvidos em 2007 e 2008. O Túmulo Megalítico de Santa Rita localiza-se a 0,5 km a nascente da aldeia de Santa Rita, na freguesia de Vila Nova de Cacela, concelho de Vila Real de Santo António. Este monumento arqueológico situa-se no topo de uma pequena elevação, dominando toda a paisagem do barrocal algarvio até ao litoral (figura 1.1) [5].



Figura 1.1: Vista aérea desde norte, com o litoral em pano de fundo, do anfiteatro natural controlado visualmente pelo monumento (Fotografia de Lúcio Alves).

A estrutura arquitetônica do monumento é constituída por uma câmara funerária e um corredor de acesso (figura 1.2). A câmara funerária, que terá sido construída e utilizada há cerca de 4500 anos (III Milénio A.N.E.), servia como um ossário, uma vez que no interior da câmara foram identificados ossos humanos (membros longos e crânios) de mais de duas dezenas de indivíduos (figura 1.3). Para além deste material osteológico, também foram identificados objetos que teriam servido como oferendas durante os rituais fúnebres [6].



Figura 1.2: Fotografia aérea do túmulo megalítico de Santa Rita após a conclusão dos trabalhos arqueológicos em 2008. Nesta imagem são visíveis a câmara funerária e o seu corredor de acesso. Imagem retirada da referência [5].

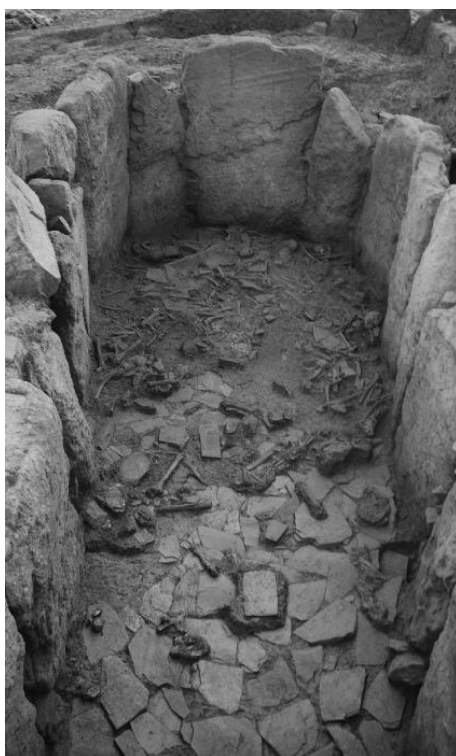


Figura 1.3: Perspetiva geral dos contextos internos de utilização da câmara funerária. Imagem retirada da referência [5].

A câmara funerária seria coberta por uma colina artificial (*tumulus*) composta por sedimentos e pedras e delimitada por um anel periférico [6]. Sobre o *tumulus* foi identificada uma necrópole (figura 1.4), que continha seis sepulturas e um número mínimo de oito indivíduos (indivíduos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, e 8/9). Nos laboratórios da Universidade de Uppsala (Tandem Laboratory), na Suécia, foram realizadas cinco datações absolutas sobre os indivíduos 1, 2, 3, 4, e 5, que definiram um largo espectro temporal para a ocupação funerária deste local, desde a segunda metade do II Milénio A.N.E. até aos últimos séculos de I Milénio A.N.E. No entanto, devido ao espólio arqueológico encontrado associado aos indivíduos 7 e 8 (punção de cobre, braçal de arqueiro, e dois recipientes de cerâmica), é possível que o uso da necrópole seja ainda mais antigo [5].

A maioria dos indivíduos foi inumada em sepulturas individuais, de fossa simples ou estruturada por pequenos blocos líticos, em posição fetal sobre o lado direito e orientados a Este e a Sul [5]. As diferentes deposições verificadas na câmara funerária e na necrópole, sugerem uma transformação do ritual funerário durante os III e II Milénios, mas, ao mesmo tempo, são uma prova da contínua utilização e sacralização deste monumento. Para além deste material arqueológico mais antigo, também foram detetados vestígios romanos nas imediações, indicando que a ocupação deste local pode estender-se até ao século IV ou V da nossa era [6].



Figura 1.4: Fotografia da necrópole externa, situada sobre o *tumulus* que cobria a câmara funerária. Imagem retirada da referência [7].

CAPÍTULO

2

Ossos

Os ossos do esqueleto são uma estrutura altamente dinâmica sujeita a constante remodelação. Neste processo o osso é renovado de modo a manter a sua rigidez e a homeostasia mineral [8]. Consequentemente, novos minerais estão continuamente a serem integrados no novo osso formado. A composição mineralógica dos ossos de um indivíduo, é influenciada pela sua alimentação, consumo de água, e exposição ao ambiente, *in vivo*. Deste modo, a análise da composição de ossos antigos permite-nos inferir sobre o estado socioeconómico de uma população, as práticas ocupacionais, as condições ambientais, e mesmo os hábitos alimentares [2].

Apesar de o osso ser um bom biomarcador, a sua composição morfológica é suscetível a alterações *post-mortem* devido aos efeitos da diagénese. O solo do local de sepultamento (pH e composição elementar), os objetos de inumação que acompanham os indivíduos, o clima, e as condições ambientais (precipitação, águas subterrâneas, erosão) desempenham um papel fundamental neste processo. Estes agentes são responsáveis pela captação e difusão de elementos químicos, que alteram a composição das estruturas ósseas [2, 9]. As principais características da composição e estrutura dos ossos são descritas nas próximas secções.

2.1 Composição

O tecido ósseo é a principal componente do sistema esquelético. A sua composição celular inclui osteoblastos, osteócitos, osteoclastos, e células do revestimento ósseo, e a sua matriz extracelular contém uma componente orgânica e inorgânica [10].

A matriz extracelular constitui aproximadamente 90% do volume ósseo, sendo o restante volume ocupado por células e vasos sanguíneos [10]. A matriz orgânica contém proteínas colagenosas

(90%), predominantemente colagénio de tipo I, e diversas proteínas não colagenosas. A componente inorgânica da matriz extracelular consiste predominantemente em iões de cálcio e fosfato, que se agrupam para formar cristais de hidroxiapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). As proteínas não colagenosas, junto com o colagénio, formam o substrato para a deposição da hidroxiapatite, a sua associação é responsável pela rigidez e resistência típica do tecido ósseo [11]. A matriz óssea é uma estrutura complexa e organizada que fornece suporte mecânico e desempenha um papel fundamental na homeostasia óssea. A matriz liberta várias moléculas que interferem na atividade das células ósseas e, consequentemente, tem participação na remodelação óssea [11].

As células ósseas podem ser divididas em 2 linhagens: a linhagem osteoblástica, responsável pela formação de tecido ósseo (osteoblastos maduros, osteócitos, células do revestimento ósseo), através da sintetização da matriz extracelular que é posteriormente mineralizada devido à deposição de fosfato de cálcio, e a linhagem osteoclástica, responsável pela sua reabsorção (macrófagos, osteoclastos, e células gigantes multinucleadas) [12, 13]. O equilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea é modificado ao longo da vida para atingir e preservar o tamanho, a forma e a integridade estrutural do esqueleto [12].

2.2 Estrutura

A estrutura geral do osso pode ser dividida em cortical (compacto) e trabecular (esponjoso). Os dois tipos de osso possuem uma matriz óssea com composição e estrutura similar, mas com massas muito diferentes, com o osso cortical a possuir uma maior densidade [14]. O osso cortical constitui 80% da massa total do esqueleto do ser humano, possui uma reduzida porosidade, e é responsável por proteger e definir a forma do osso [8]. Relativamente ao osso trabecular, existem espaços amplos entre as placas de osso e os canais, nunca formando células fechadas, o que confere uma porosidade elevada ao osso. Estas lacunas são denominadas de trabéculas ósseas e conferem elasticidade ao osso [8]. No osso esponjoso, devido à sua superior porosidade, a composição elementar é mais suscetível a alterações *post-mortem* [15].

Na superfície externa do osso, o perióstio e os osteoblastos compõem o osso cortical, por outro lado a superfície interna do osso é revestida por osteoblastos e endóstio [16]. O osso cortical envolve a cavidade medular e as placas trabeculares do osso esponjoso. Forma a diáfise, ou haste, dos ossos longos. A metáfise e a epífise dos ossos longos têm paredes corticais mais estreitas, com a epífise formando uma extremidade bulbosa ao redor do osso esponjoso interno [10]. Na figura 2.1 está presente um diagrama esquemático da tíbia, onde é possível visualizar que o osso esponjoso predomina nas regiões internas da metáfise e da epífise, enquanto o osso compacto possui uma espessura mais reduzida

nessas regiões. Nesta figura verifica-se também a presença do endósteo, na superfície interna do osso, e do periósteo, na superfície externa.

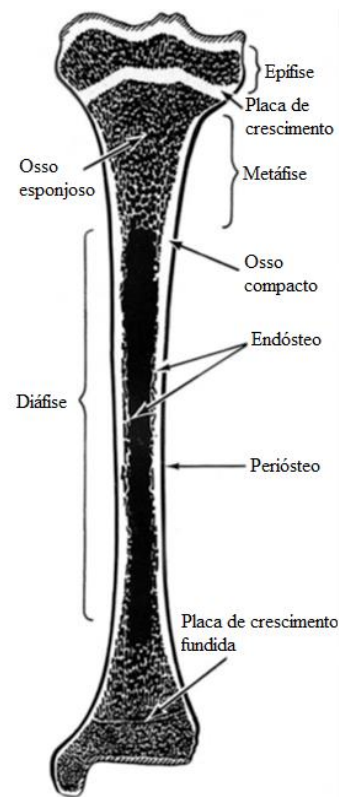


Figura 2.1: Diagrama esquemático da tíbia. Imagem adaptada da Referência [10].

Metais pesados

A designação “metal pesado” é um termo genérico, cuja definição varia dependendo do autor e da área em estudo. No entanto, tipicamente este termo é aplicado a metais ou metaloides com densidades superiores a 5 g/cm^3 [17]. Esses metais são libertados no ambiente tanto por fontes naturais como por fontes antropogénicas. Nos últimos anos, tem havido uma crescente preocupação ecológica e de saúde pública global associada à contaminação ambiental por esses metais. A exposição humana a metais pesados tem crescido dramaticamente como resultado do crescimento exponencial do seu uso em várias aplicações industriais, agrícolas, domésticas, e tecnológicas [18]. Apesar de algumas fontes de exposição modernas a esses elementos não existirem no passado, outras fontes de exposição seriam mais abundantes [19]. O uso de metais pesados em armas, utensílios de cozinha, ornamentos, cosméticos, e medicina, era comum na antiguidade [20]. A exploração mineira, associada à extração desses metais, é um exemplo de uma atividade na qual o ser humano se expõe a metais pesados desde há milhares de anos [21]. As principais vias de exposição são através da água poluída, solo, ar, fumo, fundição de metais, e o consumo de alimentos [18, 22].

Ao longo desta dissertação, os metais pesados que são alvo de maior destaque são o cádmio, zinco, cobre, níquel, mercúrio, chumbo, ferro, manganês e o arsénio, pois são os metais pesados mais comuns encontrados em áreas contaminadas [23]. Em particular, os metais pesados, chumbo, mercúrio, arsénio, e cádmio, são alvo ainda de maior ênfase, pois foram classificados pela OMS como poluentes químicos que requerem monitorização rigorosa. Estes 4 elementos são poluentes ambientais que possuem efeitos adversos à saúde mesmo em reduzidas quantidades [22].

3.1 Impacto na saúde óssea

Os metais pesados acumulam-se maioritariamente no esqueleto. São integrados na matriz óssea durante a calcificação, onde se mantêm até o osso ser remodelado ou reabsorvido. Até à adolescência quase 75% dos metais pesados são depositados nos ossos, enquanto na maturidade esse valor aumenta até 90-95% para pessoas que são expostas no seu trabalho [24].

A intoxicação metálica tem impacto negativos na saúde humana e pode alterar o funcionamento de diferentes sistemas biológicos dependendo do tipo de metal, da sua concentração, e do tempo de exposição. Tanto a falta como o excesso de metais pesados no corpo podem prejudicar o processo de remodelação óssea. Este processo envolve a ação coordenada da reabsorção, síntese, e mineralização da matriz óssea. No geral, os metais originam 2 problemas: por um lado, a sua direta toxicidade nas células óssea e, por outro, a sua acumulação na matriz óssea. A toxicidade direta afeta principalmente os osteoblastos, inibindo a diferenciação osteoblástica, atividade de síntese, e a mineralização da matriz extracelular. Como consequência, gera-se um desequilíbrio no processo de remodelação óssea, diminuindo a formação óssea e contribuindo para a geração de doenças ósseas, como osteopenia e osteoporose. Além disso, a acumulação de metais traço na matriz óssea extracelular permite a bioacumulação e, portanto, leva a um aumento na semivida do metal no corpo. Isto é de particular importância quando os níveis de exposição são baixos, mas a exposição é constante ao longo do tempo, pois, a longo prazo, os efeitos deletérios podem ser iguais ou piores que a exposição curta a altos níveis do metal [22, 23].

Um elemento é considerado tóxico para um organismo quando está presente em concentrações superiores às adequadas, o que pode prejudicar o seu desenvolvimento e as funções metabólicas do mesmo. Ou seja, um elemento essencial para o organismo pode-se tornar tóxico quando a sua concentração aumenta significativamente relativamente aos valores padrão [25]. Em baixas concentrações, alguns metais têm um efeito anabólico no tecido ósseo, como é o caso do zinco, cobre e do níquel. Esses elementos servem maioritariamente como cofatores de enzimas envolvidas em processos de remodelação óssea. No entanto, tanto a falta como o excesso desses metais no corpo podem danificar a integridade óssea. Se esse efeito é benéfico ou tóxico depende de fatores externos (nutrição e concentração ambiental), internos (absorção e metabolismo desses elementos, idade, género e disposição genética de um indivíduo) e das interações dos elementos entre si. Outros metais, como o cádmio, arsénio, mercúrio, e chumbo, são tóxicos para as células ósseas mesmo em baixas concentrações [23]. No próximo capítulo, o impacto na saúde óssea de cada um dos metais pesados previamente referidos é explicado mais ao detalhe.

CAPÍTULO

4

Elementos essenciais e não essenciais ao organismo

Os elementos básicos, carbono (C), oxigénio (O), hidrogénio (H), e azoto (N), e os elementos abundantes, cálcio (Ca) e fósforo (P), são os elementos maioritários dos ossos [26]. O Ca é a parte integrante da hidroxiapatite, e é o metal mais abundante do corpo humano (1,5% da massa total), concentrado principalmente no esqueleto (99%). Este elemento é essencial no desenvolvimento do esqueleto, na formação e rigidez de dentes e ossos [27]. O P também é um componente mineral fundamental da hidroxiapatite, está concentrado principalmente nos ossos e dentes (80%), e é um elemento importante na mineralização óssea [28].

Os elementos minoritários das estruturas ósseas são o cloro (Cl), potássio (K), sódio (Na) e o enxofre (S). Para além destes elementos, existem muitos outros cujas concentrações nos ossos são muito reduzidas, na ordem das $\mu\text{g/g}$. Esses elementos são denominados de elementos traço [26, 29]. Os elementos traço, apesar de existirem em quantidades reduzidas, podem interferir com o crescimento, desenvolvimento e manutenção dos ossos [30]. Os metais pesados, nomeadamente os que foram referidos no capítulo 3, são considerados elementos traço das estruturas ósseas [26].

Refira-se novamente que, apesar de muitos elementos traço essenciais serem benéficos para a saúde óssea, a incorporação excessiva desses elementos pode originar efeitos tóxicos. Por outro lado, existem outros elementos que só pelo facto de estarem presentes nas estruturas óssea, desencadeiam efeitos tóxicos no organismo [31]. Deste modo, pode-se afirmar que todos os elementos químicos são tóxicos, quando presentes em concentrações superiores às necessárias pelo organismo. Os elementos traço podem ser assim divididos em 2 grupos: os essenciais ao metabolismo celular que estão presentes na maior parte dos fluidos e tecidos, e os elementos não essenciais. Um elemento é essencial se, quando fornecido em doses inferiores a um determinado valor, a sua deficiência afetar as funções metabólicas normais ou o desenvolvimento de um determinado organismo. Por outro lado, um elemento é

considerado não essencial se não estiver envolvido em nenhuma função metabólica, e é tóxico mesmo em concentrações reduzidas [32].

De seguida, vão ser apresentados os aspetos fundamentais de alguns elementos traço nomeadamente, o uso prático desse elemento na antiguidade, as principais vias de exposição, o impacto do excesso/defeito desse elemento na saúde, conferindo maior destaque à saúde óssea, e a sua importância na manutenção da saúde humana.

4.1 Manganês

O manganês (Mn) é um elemento essencial à saúde humana, atua como cofator nos centros ativos de várias enzimas, e é necessário para o desenvolvimento normal e manutenção das funções das células nervosas e imunológicas. Este metal também é importante para a regulação do açúcar no sangue e das vitaminas, entre outras funções [33]. O Mn era conhecido muito antes de ser isolado como um elemento. Este metal está presente na pirolusite (dióxido de manganês), que era utilizada na pré-história como pigmento para pintura de cavernas. Os romanos usariam a pirolusite na fabricação de vidro, de modo a tornar os seus produtos cristalinos [34].

A exposição ao Mn ocorre numa variedade de cenários ambientais, fontes nutricionais, alimentos contaminados, e através da água, solo, e ar com contaminações naturais ou provocadas pelo homem. Uma das principais vias de exposição é através da inalação de poeiras e fumos, comum em soldadores e fundidores. Os níveis elevados de exposição nestas profissões são responsáveis pela maioria dos casos de intoxicação por este elemento [33]. A inalação prolongada a altos níveis de Mn afeta negativamente o sistema nervoso central, os tempos de reação visuais, a firmeza da mão e a coordenação oculomotora [3]. A exposição oral também é outra via comum de exposição. No entanto, intoxicações provocadas pelo consumo de alimentos são pouco frequentes [33].

As principais fontes de Mn são os vegetais. O conteúdo de Mn nos vegetais depende do solo onde as plantas cresceram. Este metal está presente em quantidades muito reduzidas nas carnes vermelhas, galinhas, peixes, leites e seus derivados, mas é abundante nos legumes, vegetais verdes, cereais, especialmente nos rebentos de trigo, pães integrais e nozes. O conteúdo de Mn nos ossos é considerado um bom indicador na estimação das proporções de vegetais consumidos por um indivíduo [35]. No entanto, ao contrário do Sr, o Mn é um elemento muito sensível à diagénese, pelo que a sua presença em ossadas humanas pode ser o resultado de contaminações provenientes do solo [9].

O Mn acumula-se substancialmente nos ossos de um indivíduo. Em concentrações fisiológicas, este metal tem um efeito significativo na proteção óssea [31]. Por outro lado, a deficiência prolongada deste elemento é associada à osteoporose no homem, e baixos níveis de séricos de Mn foram

descobertos em indivíduos osteoporóticos [36]. A exposição de longa duração ao Mn, com consequente aumento dos níveis deste metal no sangue, pode levar à disfunção dopaminérgica, que se manifesta como doença de Parkinson [31].

O consumo médio diário de Mn para a maioria das dietas ocidentais é entre 2,3 e 8,8 mg, enquanto a quantidade diária recomendada é de 1,8 a 2,3 mg [31, 33].

4.2 Ferro

O ferro (Fe) é o elemento traço essencial mais abundante no corpo humano. O conteúdo total deste metal no corpo é de 3 a 5 g [37]. A maior parte deste metal faz parte da constituição da hemoglobina e da mioglobina, existindo também em algumas enzimas. Este tem assim um papel importante no transporte, armazenamento e utilização do oxigénio [32].

A alimentação é a principal fonte de exposição ao Fe. O Fe disponível nos alimentos pode ser de dois tipos: Fe heme e Fe não heme. As fontes primárias de Fe heme são as hemoglobinas e as mioglobinas, obtidas a partir do consumo de carnes vermelhas, aves e peixe. O Fe não heme é obtido a partir do consumo de cereais, legumes, frutas, e vegetais [38]. A presença de Fe em ossadas humanas pré-históricas pode ser considerada um indicador de uma dieta rica em proteína. No entanto, este metal é muito sensível aos efeitos da diagénese, pelo que uma possível contaminação *post-mortem* não pode ser ignorada [4, 9].

Algumas patologias ósseas causadas pelo excesso de Fe já foram reportadas. A intoxicação por Fe é causada por consumo excessivo ou por doenças sistémicas que desencadeiam a acumulação de Fe no corpo, como é o caso da hemocromatose e da talassemia. Estudos *in vitro* demonstram que o Fe promove a diferenciação dos osteoclastos, inibe a diferenciação e a atividade dos osteoblastos, e pode levar à sua apoptose. O excesso deste metal inibe o crescimento de cristais de hidroxiapatite, alterando sua cristalinidade [23]. O efeito prejudicial do excesso de Fe na homeostasia óssea pode se manifestar de diferentes modos, incluindo baixa densidade mineral óssea, osteoporose ou osteopenia, assim como alteração da microarquitetura e biomecânica. O efeito da deficiência de Fe na saúde óssea é menos evidente, mas alguns estudos sugerem que essa condição também está associada a ossos enfraquecidos. Assim sendo, a homeostasia óssea requer níveis ótimos, ou seja, não muito baixos, nem muito altos, de Fe [39].

A intoxicação crónica do Fe é normalmente associada a doenças genéticas e metabólicas, transfusões de sangue seguidas ou ingestão excessiva. Por outro lado, a forma mais grave de deficiência de Fe é a anemia [27]. Os requisitos diários deste elemento dependem do género e idade do indivíduo. Devido às perdas de Fe durante a menstruação, as mulheres nos seus anos reprodutivos necessitam de

quantidades superiores deste elemento. Deste modo, a ingestão diária recomendada (IDR) para mulheres entre os 11 e os 50 anos é de 18 mg por dia, enquanto nos homens com idades superiores a 19 anos é de 10 mg por dia [29].

4.3 Níquel

O níquel (Ni) é um elemento ubíquo e tem uma concentração média de 75 mg/Kg na crosta terrestre. Este metal é relativamente tóxico e está muito difundido no meio ambiente. O Ni entra no ambiente através de 2 vias principais: naturais, através do desgaste dos minerais e das rochas e das emissões geoquímicas, e através de atividades antropogénicas, como as emissões industriais e automóveis [40]. Este elemento metálico é atualmente utilizado em mais de 3000 ligas metálicas [23]. As ligas metálicas de Ni são conhecidas e usadas desde há milhares de anos, mesmo antes da identificação do Ni como elemento metálico [9].

As principais vias de exposição a este elemento ocorrem através da inalação, ingestão, e da absorção dérmica [41]. As crianças, e em menor grau os adultos, podem ser expostos através da ingestão da terra. As plantas são a principal fonte alimentar de Ni, enquanto os animais são uma fonte pobre deste metal [9]. O Ni está presente em muitos alimentos como, feijões, chocolates, soja, lentilhas, ervilhas verdes, aveia, trigo sarraceno, cevada e milho. As nozes, como as amêndoas e as avelãs, são das melhores fontes deste elemento metálico [42]. O consumo de água também contribui consideravelmente para a exposição a este metal.

O Ni, no corpo humano, tem tendência a acumular-se nos rins, ossos e na glândula da tireoide [9]. Relativamente ao impacto deste metal na saúde óssea, estudos *in vitro* demonstraram que elevadas concentrações de Ni inibem a atividade da fosfatase alcalina e, consequentemente, inibem a mineralização óssea. Não existem relatos na literatura sobre os efeitos do envenenamento por Ni no osso humano ou em modelos experimentais *in vivo* [23].

Os efeitos da intoxicação e exposição ao Ni incluem, dermatite, alergias de pele, fibrose pulmonar, e doenças cardiovasculares e dos rins [23]. Apesar de seu potencial de envenenamento, o Ni desempenha um papel fundamental nos organismos vivos, revelando sua natureza de dupla face, como elemento essencial e tóxico. Experiências realizadas em modelos de animais demonstraram que o Ni pode ser benéfico, senão mesmo essencial, para a função reprodutiva ideal, composição e rigidez óssea, metabolismo energético e função sensorial [41]. O requisito diário de ingestão deste metal em humanos, baseado em estudos com animais, deverá ser inferior a 100 µg/dia [43].

4.4 Cobre

O cobre (Cu) está amplamente distribuído nos tecidos biológicos, onde ocorre principalmente sob a forma de complexos orgânicos, muitos dos quais são metaloproteínas e funcionam como enzimas. As enzimas de Cu estão envolvidas em várias reações metabólicas, como a utilização do oxigênio durante a respiração celular, e também na síntese de compostos essenciais para os tecidos conjuntivos do esqueleto e dos vasos sanguíneos [44].

O Cu era facilmente encontrado em seu estado metálico em muitas áreas do mundo antigo, nomeadamente na península Ibérica. Este metal era utilizado em joias, utensílios de cozinha, esculturas, sinos, vasos, amuletos e armas. O Cu tornava-se ainda mais útil misturando-o com outros materiais para criar uma liga de resistência superior e, portanto, mais capaz de resistir à corrosão [45].

As principais fontes alimentares deste metal são, o fígado e os rins dos animais ruminantes, marisco, peixe, carnes vermelhas, legumes e nozes [35, 44]. A quantidade de Cu ingerida em alimentos e água é relativamente baixa, pelo que a intoxicação aguda e crónica deste metal é rara. No entanto, é possível ocorrer intoxicação resultante da exposição ao excesso deste metal causada por acidente, risco ocupacional, contaminação ambiental ou, erros inatos do seu metabolismo [46]. A presença de Cu em ossadas humanas da antiguidade pode ser associada a uma dieta rica em proteína [9, 35] ou devido à exposição, *in vivo*, a este metal resultante da exploração mineira [47]. No entanto, é um metal muito sensível aos efeitos da diagenese, pelo que é possível ocorrer uma possível contaminação *post-mortem* devido à presença deste elemento no solo [4, 9].

O Cu desempenha uma função importante na regulação do crescimento ósseo e no desenvolvimento do esqueleto. Este metal aumenta a rigidez óssea e auxilia a manter o estado ótimo de qualidade óssea [31]. Este elemento está intrinsecamente ligado ao metabolismo ósseo, tanto em condições deficientes como tóxicas. A deficiência de Cu inibe o crescimento ósseo e promove mudanças patológicas características da osteoporose. Em condições tóxicas, o excesso de Cu também pode interferir no metabolismo ósseo, como mostrado, por exemplo, pela perda generalizada de densidade óssea, raquitismo e osteófitos anómalos em pacientes com doença de Wilson [36].

Apesar de o Cu ser um elemento essencial, a desregulação deste metal, para além do impacto na saúde óssea, pode levar ao desenvolvimento de muitos efeitos adversos à saúde, nomeadamente, dano nos rins e ao fígado, anemia, imunotoxicidade e toxicidade no desenvolvimento [48]. A dose diária recomendada deste elemento é de 0,9 mg/dia [49].

4.5 Zinco

O zinco (Zn) é um elemento traço ubíquo. É um dos elementos traço mais importantes do corpo, e é indispensável para o crescimento e desenvolvimento de microrganismos, plantas e animais. Este metal está presente em elevadas concentrações em todos os tecidos e secreções do corpo humano, com 85% localizado nos músculos e ossos, 11% na pele e no fígado, e o restante em todos os outros tecidos, verificando-se as concentrações mais elevadas na próstata e em certas regiões do olho [50]. O Zn é um constituinte de mais de 200 enzimas, e desempenha um papel importante no metabolismo dos ácidos nucleicos, replicação celular, e na reparação de tecidos, através da sua função nas polimerases de ácidos nucleicos. Este elemento também possui muitas interações importantes com as hormonas, e desempenha um papel na produção, armazenamento, e secreção de hormonas individuais [29].

As fontes mais ricas de Zn são o marisco (ostras, lagostas e caranguejos), bifes, e outras carnes vermelhas. As aves, ovos, queijos duros, legumes, nozes, e os cereais integrais, são também boas fontes [29, 51, 52]. A presença de Zn em ossadas humanas é assim considerada um indicador de uma dieta rica em proteína animal, apesar de existirem quantidades significativas deste elemento nas nozes e cereais, e quantidades reduzidas nos peixes marinhos [51, 52]. Estudos comparativos demonstram concentrações superiores deste elemento em ossos de animais carnívoros em relação aos herbívoros [35]. Assim sendo, a concentração de Zn em ossos humanos, ao contrário do Sr, aumenta com o consumo de proteína animal e diminui com o aumento do consumo de vegetais [53]. O Zn também aparenta ser um elemento pouco sensível aos efeitos da diagenese [9].

O Zn é necessário para o crescimento, desenvolvimento, e manutenção de ossos saudáveis. O atraso no crescimento ósseo é frequentemente observado em várias condições associadas à deficiência de Zn na dieta alimentar. O Zn aparenta possuir um papel importante na regulação da homeostase óssea, uma vez que foi demonstrado que possui um efeito estimulador na formação óssea osteoblástica e inibe a reabsorção óssea osteoclástica. Este metal contribui assim para o aumento da massa óssea [54].

As principais características clínicas da deficiência severa de Zn em humanos são, atraso no crescimento, atraso na maturação sexual e esquelética, o desenvolvimento de dermatite, diarreia, alopecia, diminuição do apetite e o surgimento de alterações no comportamento. Por outro lado, a intoxicação aguda por Zn é pouco comum, mas os sintomas incluem náuseas, vômitos, diarreia, febre e letargia. A exposição crónica a elevadas doses de Zn, substancialmente acima dos requisitos, resulta em interferência no metabolismo de outros elementos traço [44]. O requisito mínimo diário de ingestão deste elemento essencial é de 12 mg, no entanto, são necessários 15 mg para aumentar a densidade óssea [31].

4.6 Arsénio

O arsénio (As) é um elemento ubíquo que é detetado em baixas concentrações em praticamente todas as matrizes ambientais. A poluição ambiental causada pelo As ocorre como resultado de fenómenos naturais como erupções vulcânicas, erosão do solo e atividades antropogénicas [18]. Este metaloide é uma substância que, ao longo da história, era bem conhecida pelos “curadores” e pelos “envenenadores”. Uma vez que, em certas culturas da antiguidade, este elemento era utilizado na medicina, e também como um potente veneno para matar reis e imperadores, daí também ser conhecido como o “Veneno dos Reis” [55].

A exposição ao As ocorre por via oral (ingestão), inalação, contacto dérmico, e por via parenteral, em certa extensão. A dieta, para a maioria dos indivíduos, é a maior fonte de exposição deste elemento, com uma ingestão média de 50 µg por dia [18]. Embora o marisco seja uma das principais fontes alimentares de exposição devido aos altos níveis de arsenobetaina (forma orgânica não-tóxica de As), as frutas, e grãos, principalmente o arroz, estão entre as principais fontes alimentares de exposição a As inorgânico [56]. A exposição através do ar, água e do solo é normalmente de menor dimensão, no entanto, a exposição a esses meios pode se tornar significativa em áreas contaminadas por este elemento. Trabalhadores que produzam ou usem compostos de As podem estar sujeitos a níveis substancialmente mais elevados deste elemento [18].

A presença de As em ossadas humanas de períodos pré-históricos pode ter assim diversas causas. A incorporação desse elemento pode ocorrer predominantemente *in vivo*, através de uma dieta rica em alimentos marinhos, consumo de água contaminada, ou como resultado da poluição ambiental causada pelas atividades antropogénicas. A ocorrência de contaminação *post-mortem*, devido à ocorrência da diagénese, também é possível [57].

Os sintomas de intoxicação por As podem depender da dose total. A intoxicação aguda causa doenças gastrointestinais, renais e hepáticas, além de toxicidade do miocárdio e, nos casos mais extremos, falência do tronco cerebral. A intoxicação crónica geralmente induz neuropatia periférica, lesões cutâneas, doenças respiratórias, doenças cardiovasculares e também pode causar bócio, diabetes mellitus e cancro de pele, pulmões, rins, bexiga e fígado [57].

O As tem a habilidade de se acumular nos tecidos moles (fígado, baço e trato gastrointestinal) e nos tecidos duros (ossos). Durante a acumulação óssea, o As compete com o grupo fosfato dos cristais de hidroxiapatite, formando arseniato de apatita ($\text{Ca}_5(\text{AsO}_4)_3\text{OH}$) e provavelmente outros cristais de arseniato de cálcio. Os ensaios clínicos epidemiológicos têm demonstrado associação entre o envenenamento por As e a doença de Paget, o qual é causada por um desequilíbrio na remodelação óssea. Esse desequilíbrio é gerado devido a um aumento inicial da reabsorção seguida de uma formação óssea excessiva, o que origina dor, aumento da taxa de fraturas, e deformações ósseas [23].

O As é considerado um elemento não essencial [32]. Atualmente não está estabelecido nenhum requisito diário de ingestão deste metal no entanto, se esse valor existir, alguns estudos sugerem que provavelmente deverá ser de 20 µg por dia. Esse valor é facilmente obtido na maioria das dietas [44].

4.7 Bromo

O bromo (Br) é um elemento que à temperatura ambiente se encontra no estado líquido. Este líquido tem uma cor avermelhada e é instável, volátil, denso e altamente reativo [32]. Está amplamente disponível no meio ambiente, nomeadamente na água do mar, onde se encontram 99% das reservas deste elemento. O conteúdo em Br nos rios e na crosta terrestre é consideravelmente inferior. Assim sendo, diversos investigadores explicam a variação de Br nos tecidos humanos como um indicador da proporção relativa de alimentos marinhos consumidos. Tanto o consumo de alimentos marinhos ou de plantas e/ou animais que habitem em proximidade de uma fonte marítima de Br, podem ser assim responsáveis pelos elevados conteúdos deste elemento nos tecidos humanos, nomeadamente nos ossos. Os alimentos de origem marítima como os peixes, algas e, marisco, aparentam ser fontes ricas de Br [58]. As nozes e os grãos também demonstram ser uma fonte rica deste halógeno [59].

Atualmente, não existe consenso sobre se o Br é necessário para manter uma boa nutrição ou função humana saudável [43]. O Br é altamente tóxico e em pequenas quantidades (10 µg/g), tanto por via dérmica como inalado, pode causar problemas imediatos de saúde ou morte. É muito irritante tanto para os olhos como para a garganta, e em contacto com a pele ocasiona inflamações dolorosas [32]. O consumo médio diário deste elemento é de 2 a 8 mg, no entanto, não está definido nenhum requisito diário [59].

4.8 Estrôncio

O estrôncio (Sr) é um elemento onipresente no meio ambiente. Embora o Sr não seja considerado um elemento essencial e não possua nenhum papel biológico conhecido, está presente em todos os organismos vivos [60]. As maiores fontes de exposição a este elemento, são a comida e a bebida, e estima-se que sejam ingeridos 1,9 mg deste elemento diariamente [27].

O conteúdo de Sr nos ossos é considerado um indicador de uma dieta rica em vegetais. As plantas obtêm este elemento a partir do solo, e é assim que o Sr entra na cadeia alimentar. As plantas, ao crescerem em solos ricos em carbonato, são especialmente ricas em Sr [35]. Os animais, incluindo o ser humano, obtêm este elemento através do consumo de plantas e outros animais, no entanto, a

presença deste elemento vai-se reduzindo ao longo dos níveis tróficos. As plantas contêm quantidades superiores de Sr comparativamente com os animais e, dentro dos mamíferos, os herbívoros apresentam os níveis mais elevados. Assim sendo, no ser humano, a quantidade de Sr nos ossos aumenta com o consumo de vegetais, e diminui com o aumento do consumo de proteína animal [53]. O Sr é muito abundante nas especiarias, nos vegetais verdes, nas raízes, nos cereais, nos feijões, nos grãos, nas ervilhas, e nas lentilhas. O consumo de alimentos do mar também poderá contribuir para o aumento das concentrações de Sr nos ossos, visto que este elemento é abundante nos oceanos [35]. No entanto, existem autores que refutam essa premissa [61].

O Sr é provavelmente um elemento traço não essencial, no entanto, alguns estudos demonstram que este elemento é capaz de influenciar a remodelação óssea, e tem sido aplicado sob a forma de ranelato de estrôncio no tratamento terapêutico da osteoporose [62]. Estima-se que 99% do Sr em organismos vertebrados se acumule na componente inorgânica dos ossos. Como a estrutura do Sr é similar à do cálcio, os iões Sr^{2+} são incorporados *ante-mortem* nos tecidos duros e substituem os iões Ca^{2+} na hidroxiapatite. Atualmente o papel do Sr no metabolismo ósseo normal ainda não é muito conhecido, assim como nas doenças ósseas [4, 35, 62].

4.9 Cádmio

O cádmio (Cd) é um metal pesado que origina preocupações ambientais e ocupacionais consideráveis. Está amplamente distribuído na crosta terrestre com uma concentração média de 0,1 mg/Kg [18]. Ao contrário de outros metais pesados, como o Pb e Hg, utilizados desde os tempos antigos, o Cd foi refinado e usado apenas a partir do século XIX. Deste modo, estudos com este metal revelam que a exposição a Cd em populações da antiguidade era, em geral, muito inferior às populações contemporâneas [63].

Atualmente, a exposição ao Cd ocorre através de diversas fontes nomeadamente, no uso deste metal nas indústrias metalúrgicas primárias, na ingestão de comida contaminada, no fumo de cigarros, e trabalhando em locais contaminados com este elemento. A absorção através da pele é rara [18]. A exposição crónica por inalação a partículas de Cd está geralmente associada a alterações na função pulmonar e nas radiografias do tórax, que são consistentes com a ocorrência de enfisema. A exposição no local de trabalho a partículas deste metal no ar é associada a reduções na função olfativa [18]. O Cd está presente em quantidades traço em certos alimentos, como os vegetais com folha, batatas, grãos, sementes, fígados, rins, crustáceos e moluscos [64].

O Cd é o metal pesado mais conhecido pelos seus efeitos tóxicos nos ossos. A doença de Itai-Itai, por exemplo, é uma doença músculo-esquelética causada pela acumulação de Cd nos ossos. Esta

doença foi pela primeira vez descoberta no Japão, em residentes que habitavam perto de um rio poluído com este metal [22]. Indivíduos com nefropatia (lesão renal) por Cd severa podem ter cálculo renal, popularmente conhecido como pedra no rim, e exibir uma perda excessiva de cálcio na urina. Com exposição crónica, o cálcio urinário pode eventualmente diminuir até atingir níveis inferiores aos normais. Esta perda de cálcio vai provocar alterações no esqueleto, nomeadamente osteomalacia e osteoporose [44].

O mecanismo do efeito prejudicial do Cd no esqueleto não é totalmente compreendido. Um estudo *in vitro* demonstrou que uma maior exposição de células humanas, semelhantes a osteoblastos, a este metal, induz disrupção cito esquelética e apoptose celular acelerada [65]. *In vivo*, o Cd inibe a formação de osso e estimula a reabsorção óssea, mesmo em concentrações moderadas. Em concentrações tóxicas, este elemento quebra a matriz de colagénio e inibe a sua mineralização [30].

O Cd é considerado um elemento não essencial. Atualmente não está estabelecido nenhum requisito diário de ingestão deste metal no entanto, se esse valor existir, alguns autores sugerem que provavelmente não será superior a 5 µg/dia. O consumo típico diário deste elemento é de 10 a 20 µg/dia [66].

4.10 Mercúrio

O mercúrio (Hg) é um metal pesado que pertence aos elementos de transição da tabela periódica. Este metal é um poluente e uma substância altamente tóxica muito difundida no meio ambiente, que induz graves alterações nos tecidos do corpo e causa uma vasta gama de efeitos adversos à saúde. É um elemento único no sentido de que é encontrado na natureza em 3 formas químicas diferentes (elementar, inorgânico e orgânico), cada uma com o seu perfil próprio de toxicidade. Essas formas incluem vapor de Hg metálico (Hg^0), Hg inorgânico (Hg^{1+}), mercúrico (Hg^{2+}), e compostos orgânicos de Hg [18]. Nem todas as formas de Hg podem entrar facilmente no corpo humano, mesmo que estejam em contacto com a pele. As formas mais perigosas, do ponto de vista toxicológico, são a forma metálica, as forma inorgânicas bivalentes, e os compostos de metilmercúrio [3].

Como este metal é ubíquo no meio ambiente, o ser humano, as plantas, e os animais, não conseguem evitar exposição às diferentes formas de Hg. As principais formas de exposição na população geral são o metilmercúrio presente no peixe, o Hg inorgânico dos alimentos, e os vapores de Hg metálico das restaurações de amálgamas dentárias [67]. O metilmercúrio derivado do consumo de peixe, após ser absorvido pelo organismo, tem uma reduzida taxa de excreção. A maioria é absorvida e acumulada nos rins, no tecido neurológico, e no fígado [18].

O Hg foi deliberadamente explorado pelo homem, inconsciente da sua natureza perigosa, desde os tempos pré-industriais [68]. A presença de elevados níveis deste elemento em ossadas humanas pré-históricas, pode dever-se à exposição de Hg *in vivo*, através da exploração mineira, processamento e/ou uso de cinábrio. O cinábrio é um mineral que foi utilizado em culturas pré-históricas, nomeadamente na Península Ibérica durante a idade do Cobre e do Bronze, como pigmento, para decoração corporal, arte rupestre, ou em cerâmicas. Este minério também seria utilizado como oferta ou conservante em práticas de sepultamento, e para fins medicinais [69].

Uma vez absorvido pelo corpo, o Hg é incorporado nos tecidos moles e nos ossos através da circulação sanguínea. Nos ossos, este metal provavelmente é incorporado nos grupos tiol do aminoácido cisteína do colagénio [68]. No entanto, atualmente existe uma falta de conhecimento sobre os efeitos do Hg no metabolismo ósseo [70].

Todas as formas de Hg são tóxicas, e os seus efeitos incluem toxicidade gastrointestinal, neurotoxicidade, e nefrotoxicidade [18]. Os sintomas de envenenamento por Hg incluem a cegueira, surdez, danos cerebrais, problemas digestivos, danos renais, falta de coordenação e distúrbios mentais [40]. Deste modo, os especialistas da OMS recomendam que a ingestão total de Hg semanal não deve ser superior a 5 µg/Kg de peso corporal, e não mais que 3,3 µg/Kg por semana de metilmercúrio [44].

4.11 Chumbo

O chumbo (Pb) é um metal que está presente em reduzidas quantidades na crosta terrestre [18]. Desde a pré-história que o Pb é dos metais cujos ciclos naturais são mais afetados pelas atividades humanas, aumentando dramaticamente as suas emissões para atmosfera, solos e corpos de água. O Pb foi amplamente e deliberadamente explorado pelo homem em tempos pré-industriais, sem conhecer sua natureza perigosa, como ferramentas, utensílios de cozinha e medicamentos. Na península Ibérica, este metal terá sido extraído pelos fenícios, no II Milénio A.N.E., e, posteriormente, pelos romanos [63, 68].

A exposição ao Pb ocorre principalmente, através de inalação de partículas de poeiras contaminadas por este metal ou aerossóis, e ingestão de alimentos, água e tintas contaminadas também por este elemento [18]. O pão, os cereais, e as bebidas, são os alimentos responsáveis, tipicamente, por cerca de 35% do consumo diário de Pb, sendo o restante derivado de uma variedade de outros alimentos [44]. A presença deste metal em ossadas humanas pré-históricas pode refletir as condições ambientais e a poluição *in vivo* a que uma população esteve sujeita [9]. No entanto, a contaminação *post-mortem* deste elemento também é possível ocorrer, devido à ocorrência da diagénese [4].

A maior parte do Pb é acumulada nas estruturas ósseas. Num indivíduo, o processo de acumulação de Pb inicia-se ainda durante a gestação, uma vez que este metal consegue atravessar a

placenta materna e acumular-se no esqueleto do feto. A acumulação de Pb no esqueleto continua até o indivíduo possuir idade avançada. Estima-se que, num indivíduo com 80 anos, 96% do Pb esteja armazenado no esqueleto. Assim sendo, o Pb presente nos ossos é um bom marcador da exposição crónica a este elemento [36].

Estudos clínicos demonstram que a acumulação de Pb no corpo tem efeitos negativos nos ossos nomeadamente, através da diminuição da largura dos ossos corticais e da densidade óssea, e do aumento do risco de fratura [71]. Estudos *in vivo* demonstram que o envenenamento por Pb diminui o conteúdo mineral do osso e as propriedades mecânicas dos ossos longos [72] e mandibulares [73].

O Pb é considerado um elemento não essencial [44]. É um metal que causa grandes preocupações de saúde pública devido aos seus efeitos tóxicos em reduzidas concentrações. A intoxicação por este metal resulta em anemia, danos nos rins, e anormalidades no sistema nervoso central. O requisito diário de consumo deste elemento não deverá ser superior a 30 µg/dia. O consumo diário típico deste elemento é de 15 a 100 µg [43].

Técnica Analítica de Fluorescência de raios-X

A espectrometria por fluorescência de raios-X (XRF) é uma técnica que permite identificar e quantificar a composição elementar de vários materiais sólidos com o uso de raios-X, permitindo uma caracterização química do material analisado e correlação com outras propriedades [74]. Esta técnica permite quantificar elementos traço presentes numa amostra com quantidades na ordem das $\mu\text{g/g}$ [75].

Esta técnica baseia-se na medição das intensidades das emissões de raios-X características de cada elemento químico constituinte da amostra. De modo a que esta emissão ocorra, é necessário que a amostra receba energia suficiente para excitar os eletrões dos elementos que compõem a amostra, ou seja, é necessária uma fonte de excitação. Quando os raios-X atingem a superfície da amostra, os eletrões dos átomos constituintes da amostra são ejetados das camadas internas, como consequência, os eletrões das camadas exteriores preenchem as lacunas nas camadas internas. Esta transição eletrónica, decorre simultaneamente com a libertação de energia sob a forma de fotões de raios-X (figura 5.1). A energia do fotão de raios-X emitido depende da diferença entre as energias de ligação dos níveis envolvidos, que é característica para cada elemento, e a intensidade da radiação emitida para essa energia característica, é proporcional à concentração do respetivo elemento. Como tal, o valor de energia característico permite identificar os elementos presentes (análise qualitativa) e a intensidade da fluorescência permite realizar a quantificação [27, 74].

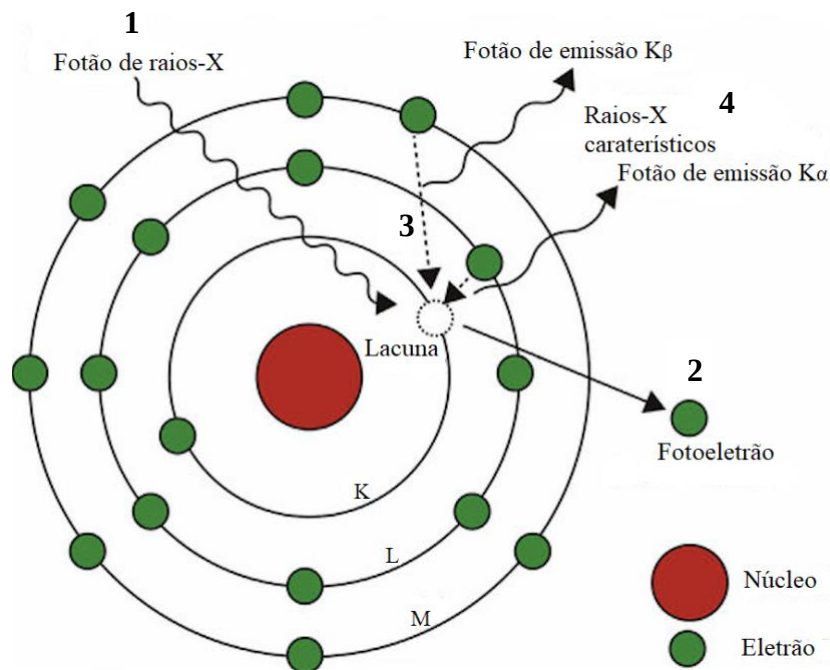


Figura 5.1: O mecanismo da geração de raios-X característicos. 1 – Fóton de raios-X incidente interage com o átomo. 2 – Provoca a ejeção de um elétron da camada K. 3 – Elétrons das camadas externas (L e M) transitam para preencher a lacuna criada na camada K. 4 – Emissão de raios-X característicos associados às transições eletrônicas no átomo. Imagem adaptada da Referência [76].

Desde os anos 60 do século passado, que a XRF tem sido utilizada tanto em contextos arqueológicos como forenses. Em arqueologia, é útil no estudo das concentrações elementares de ossos de diferentes idades e condições, e para avaliar os processos de diagénese e de fossilização [77]. O apelo desta técnica na análise de espécimes arqueológicos deve-se à sua notável combinação de vantagens práticas e económicas [78]:

-Técnica não destrutiva. Na grande maioria dos casos, as amostras analisadas não são destruídas ou alteradas devido à exposição de raios-X.

-Preparação mínima. Muitas amostras podem ser examinadas com pouco ou nenhum pré-tratamento. Embora seja melhor lavar qualquer sedimento de amostras arqueológicas, foi demonstrado que, se o sedimento for mínimo e o artefacto não tiver sido submetido a calor tão elevado que derreta alguma matriz de sedimentos na amostra, a limpeza vigorosa não é necessária. Isto deve-se ao facto de o volume total analisado da amostra ser muito superior à contaminação superficial [78].

-Técnica rápida. A XRF permite determinar as composições químicas em segundos.

- Uso fácil. Os instrumentos modernos são executados sob um software de interface gráfica que lida facilmente com a configuração da medição e o cálculo dos resultados.

-Custo-benefício. Uma vez que não é necessária uma preparação das amostras mais exigente, como ocorre na maioria das análises destrutivas, o custo por amostra é significativamente reduzido [78].

Nesta dissertação foi utilizada uma configuração de XRF, denominada de micro fluorescência de raios-X com geometria convencional (μ -XRF). Esta configuração consiste num equipamento de bancada com micro-feixe e que permite análises sob vácuo, que são fundamentais para a detecção de elementos mais leves [3]. Antes de descrever mais detalhadamente esta geometria, é relevante descrever as principais características dos raios-X, de modo a facilitar a sua compreensão.

5.1 Produção de raios-X

Os raios-X fazem parte do espectro da radiação eletromagnética, com um comprimento de onda mais curto que o da luz visível, na ordem dos 10^{-8} a 10^{-12} m, e com valores de energia tipicamente entre 0,12 a 129 keV [79]. Os raios-X podem ser produzidos por 2 mecanismos:

a) Desaceleração de partículas carregadas. Neste caso, a radiação emitida é denominada de *Bremsstrahlung*, também conhecida por radiação contínua. A palavra *Bremsstrahlung* é de origem alemã, *brems* significa travagem, enquanto *strahlung* significa radiação. A produção destes raios-X ocorre quando elétrons ou outras partículas com carga, como os prótons e as partículas alfa, são acelerados em direção a um núcleo atômico e são defletidos devido ao campo elétrico do núcleo. Esta desaceleração origina uma perda na energia cinética da partícula carregada, que resulta na emissão de energia eletromagnética na forma de raios-X. A mudança na energia é variável e, como tal, múltiplas partículas carregadas produzem um espectro de raios-X com diferentes valores de energia, obtendo-se assim um espectro contínuo de energia, semelhante ao espectro presente na figura 5.2. A radiação *Bremsstrahlung* foi descoberta por Wilhelm Röntgen em 1895, que foi o primeiro a descobrir os raios-X [79, 80, 81].

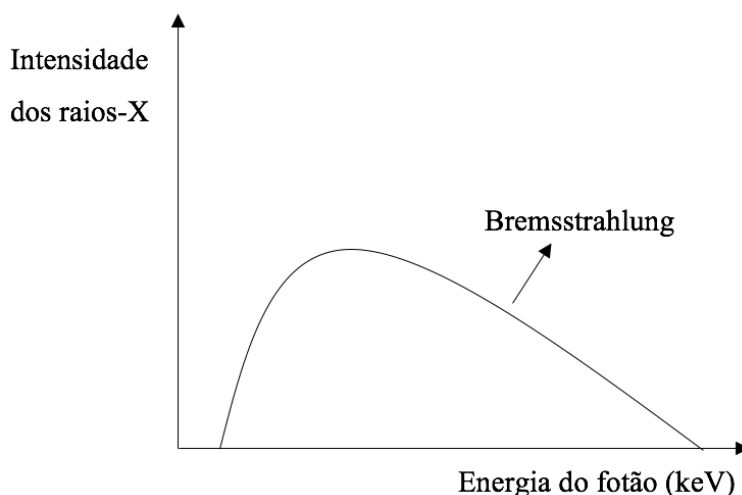


Figura 5.2: Espectro de energia contínua (genérico) resultante da desaceleração de partículas carregadas. Imagem adaptada da Referência [79].

b) Transições eletrônicas nas camadas internas de um átomo. Esta situação ocorre quando um elétron é ejetado do átomo (ou capturado pelo núcleo) e outro elétron de uma camada eletrônica mais externa preenche a lacuna deixada pelo elétron ejetado. Nesta transição eletrônica, a energia perdida é libertada como um raio-X com um valor fixo de energia específico [79, 80]. Esta radiação denomina-se por fluorescência e a energia resultante, E , depende do número atômico do átomo que a emite, segundo a lei de Moseley [27]:

$$E = k_1(Z - k_2)^2 \quad (5.1)$$

em que k_1 e k_2 são constantes específicas de cada uma das linhas espectrais envolvidas, e Z corresponde ao número atômico do átomo.

Geralmente, neste processo ocorre uma cascata de transições eletrônicas das camadas eletrônicas externas, uma vez que o preenchimento de uma lacuna pela transição de um elétron numa camada externa para uma camada mais interna irá dar origem a outra lacuna na camada mais externa. Como tal, a radiação eletromagnética emitida é caracterizada por um conjunto de linhas espectrais de energias discretas (figura 5.3), que resultam de transições eletrônicas entre as diferentes camadas do átomo [80].

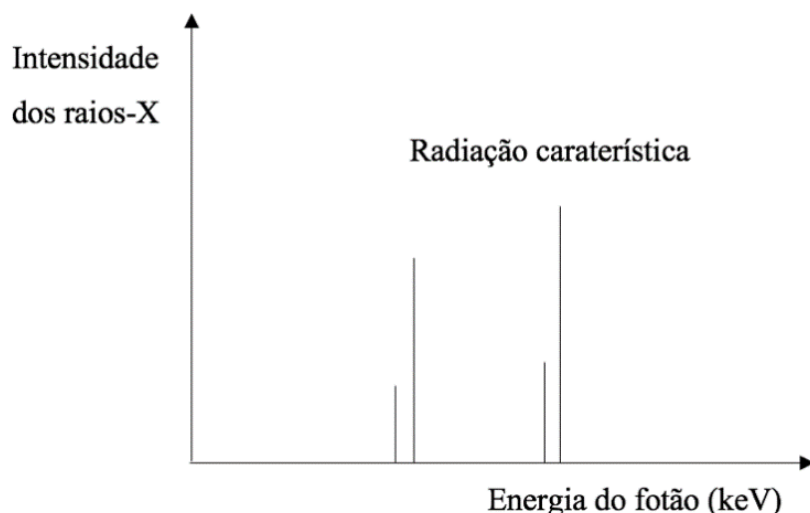


Figura 5.3: Espectro de energia discreta (genérico) resultante das transições eletrônicas num átomo. Imagem adaptada da Referência [79].

As transições eletrônicas são identificadas pela letra correspondente à camada (K , L , M , etc.) na qual está presente, antes da transição, a lacuna, e por um subscrito (α , β , γ , etc.), para identificar as séries de camadas eletrônicas mais externas, a camada a partir da qual o elétron inicia a transição. Na figura 5.4, estão presentes exemplos de transições eletrônicas que ocorrem num átomo. Os espectros

dessas linhas discretas de energia de radiação eletromagnética são característicos dos elementos dos quais se originam [80].

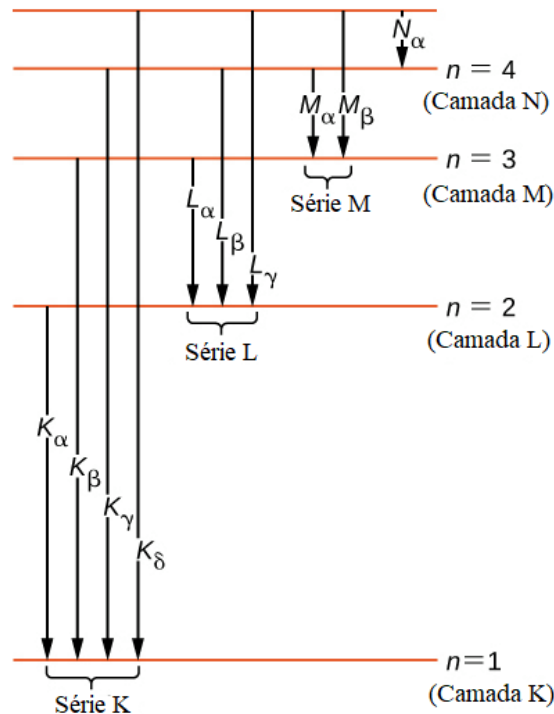


Figura 5.4: Diagrama de níveis eletrônicos e principais transições de raios-X. Imagem adaptada da Referência [82].

5.2 Transições Radiativas e não Radiativas

Foi afirmado na secção anterior, que a energia excessiva que um átomo possui após a remoção de um elétron de uma camada interna, provoca a emissão de radiação característica. Este tipo de transição eletrônica, onde ocorre emissão de um fóton de raios-X, denomina-se transição radiativa. Estas transições continuam a ocorrer até a lacuna se posicionar na camada mais externa do átomo, e eventualmente ser preenchida por um elétron livre do meio, atingindo assim o estado de menor energia [81]. Por outro lado, o átomo pode atingir o estado de menor energia através da emissão de um elétron de um estado menos fortemente ligado. Neste tipo de transição, a libertação de energia, associada à movimentação do elétron proveniente de uma camada mais externa para ocupar a lacuna na camada interna, pode ser absorvida por um elétron de uma camada externa, provocando a sua ejeção, caso a energia transferida seja superior à energia de ligação desse elétron. Este processo é denominado de efeito de Auger ou autoionização. Como neste processo não ocorre emissão de raios-X, não é

diretamente observado no detector [32]. Na figura 5.5 está presente um diagrama esquemático em que estes 2 tipos de transições estão ilustradas.

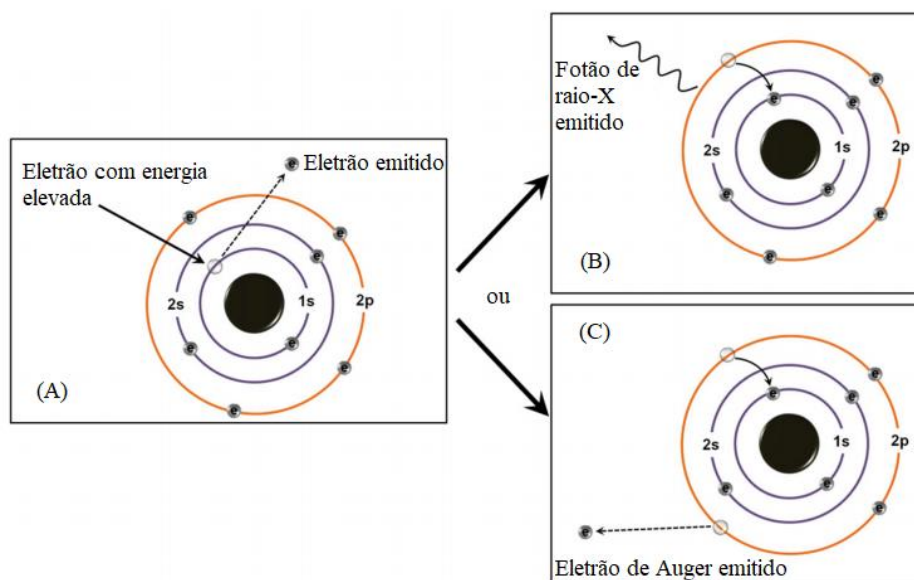


Figura 5.5: Diagrama esquemático que ilustra o processo de emissão de elétrons de Auger e de fluorescência de raios-X. (A) Um elétron incidente de elevada energia provoca a ejeção de um elétron de uma camada interna. (B, C) Um elétron transita de um nível de energia elevado para a camada interna por (B) emissão de um fóton de raio-X ou (C) ejeção de um elétron de Auger. Imagem adaptada da Referência [83].

O rendimento de fluorescência para uma determinada camada é definido como a razão entre o número de fótons emitidos e o número de lacuna criadas nessa mesma camada, enquanto o rendimento do efeito de Auger define-se como a razão entre o número de elétrons de Auger emitidos e o número de lacunas criadas [32]. Estes 2 processos são mutuamente exclusivos, o que implica que a sua soma totalize 100%. A probabilidade de ocorrência destes 2 processos, depende do número atômico do elemento. Na figura 5.6, estão representados graficamente os rendimentos de fluorescência e do efeito de Auger em função do número atômico (Z) do elemento, para lacunas presentes na camada K . Tal como se pode visualizar, o efeito de Auger é mais provável para elementos com menor número atômico, uma vez que, quanto menor a diferença de energia entre os níveis energéticos envolvidos, maior a probabilidade de ocorrência deste processo. Por outro lado, as transições radiativas são mais prováveis de ocorrer para elementos de elevado número atômico. Como o rendimento de fluorescência é muito reduzido para elementos de baixo número atômico, as técnicas de fluorescência de raios-X são pouco sensíveis para esses elementos [81].

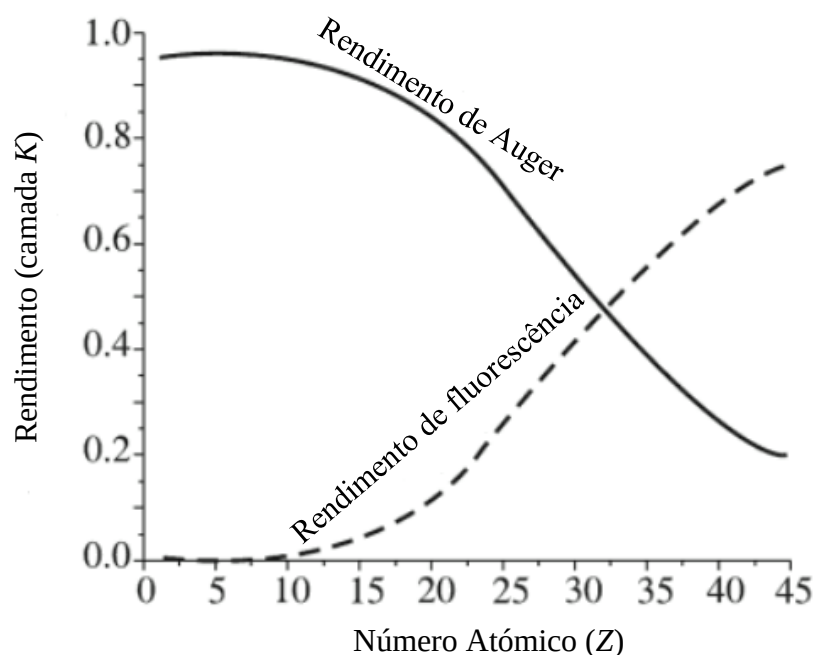


Figura 5.6: Rendimento de fluorescência e de efeito Auger em função do número atômico de um átomo, para lacunas existentes na camada K. Imagem adaptada da referência [84].

5.3 Interação com a matéria

Quando um feixe de raios-X atravessa um meio, é sujeito a atenuação ou perda de intensidade. Por outras palavras, alguns fótons são removidos do feixe. Esta atenuação pode dever-se à absorção ou dispersão de fótons pelo meio. Na absorção, a energia dos fótons é completamente transferida para os átomos, enquanto na dispersão, a direção do feixe de raios-X é alterada, podendo ocorrer também uma alteração na sua energia. Os processos de interação dos fótons com os átomos do meio, dependem da energia do feixe e das características dos átomos do meio [85].

A atenuação da intensidade de um feixe em função da espessura de um material absorvedor, é descrita pela lei de Lambert-Beer:

$$I_x = I_0 e^{-\mu x} \quad (5.2)$$

em que, I_x é a intensidade transmitida pelo material absorvedor, I_0 é a intensidade inicial do feixe incidente, μ corresponde ao coeficiente linear de atenuação total (cm^{-1}), e x é a espessura do material absorvedor (cm). O coeficiente linear de atenuação total, μ , descreve a fração de raios-X incidentes que são absorvidos ou dispersos por unidade de espessura do absorvedor [85]. Pode ser obtido através da seguinte expressão:

$$\mu = \rho \frac{N_{AV}}{A} \sigma_{tot} \quad (\text{cm}^{-1}) \quad (5.3)$$

em que, ρ , representa a densidade do material absorvedor, N_{AV} , o número de Avogadro, A , corresponde ao número de massa, e σ_{tot} , é a secção eficaz total. A secção eficaz total, σ_{tot} , resulta da soma das secções eficazes de todas as interações possíveis, nomeadamente, o efeito fotoelétrico, dispersão de Compton, dispersão de Rayleigh, e a produção de pares. Como a secção eficaz total está relacionada com o número atómico do material absorvedor, o coeficiente de atenuação linear total vai ser influenciado pelo seu valor [85, 86].

Em suma, os fatores do meio que afetam a atenuação do feixe de raios-X, são: a espessura, densidade, e número atómico do material absorvedor [87]. Para além destes fatores, a energia do feixe incidente também está relacionada com a própria atenuação do feixe. De modo a compreender a relação entre a energia do feixe e a atenuação a que este fica sujeito, é importante compreender as interações básicas entre os fótons de raios-X e a matéria, nomeadamente o efeito fotoelétrico, o efeito de Compton, e a dispersão de Rayleigh.

5.3.1 Efeito fotoelétrico

No efeito fotoelétrico, o fóton incidente interage com um átomo e ejeta um dos eletrões ligados. O fóton desaparece ao transferir toda a sua energia para o átomo. Parte dessa energia é usada para superar a energia de ligação do eletrão, e a restante é convertida em energia cinética do eletrão, E_k :

$$E_k = h\nu - E_b \quad (5.4)$$

onde, $h\nu$ é a energia do fóton incidente e E_b é a energia de ligação do eletrão. Para o efeito fotoelétrico ocorrer, a energia do fóton incidente tem de ser superior à energia de ligação do eletrão ligado [85].

A probabilidade de um fóton originar um efeito fotoelétrico depende fortemente da sua energia incidente, $E = h\nu$, e do número atómico, Z , do material absorvedor. A probabilidade de a interação fotoelétrica ocorrer é maior quando a energia do fóton incidente é ligeiramente superior à energia de ligação do eletrão. A probabilidade de ocorrência desta interação varia com a energia do fóton aproximadamente como $1/E^3$, e varia com o número atómico aproximadamente como Z^3 . Como tal, este processo é dominante para baixas energias do fóton incidente [85, 87].

O efeito fotoelétrico está associado à ocorrência de emissão de radiação fluorescente, uma vez que podem ser criadas lacunas nas camadas eletrónicas mais internas (camadas K e L). A ocorrência deste processo é assim do nosso interesse, de modo a ser possível detetar as radiações características dos elementos químicos presentes na amostra.

5.3.2 Dispersão de Compton

Na dispersão de Compton, também conhecida como dispersão inelástica, um fóton incidente, com energia $h\nu$, interage com um elétron fracamente ligado (ou “livre”) de uma camada exterior, e transfere parte da sua energia. O fóton é disperso com uma energia inferior, $h\nu'$, e segundo um ângulo θ , e o elétron é ejetado com um ângulo ϕ , relativo à direção de incidência do fóton, tal como se pode visualizar na figura 5.7. Da conservação da energia e do momento, é possível obter a seguinte expressão [85]:

$$h\nu' = \frac{h\nu}{1 + \frac{h\nu}{m_0 c^2 (1 - \cos \theta)}} \quad (5.5)$$

com $m_0 c^2 = 0,511$ MeV, que corresponde à energia de repouso do elétron.

Com o aumento da energia de incidência do fóton, a probabilidade de ocorrer esta dispersão diminui. No entanto, como a diminuição da probabilidade de ocorrência do efeito fotoelétrico é mais acentuada, a dispersão de Compton torna-se o modo de interação dominante. Esta interação é independente do número atômico do meio [85, 87], e não contribui para a identificação da amostra no XRF, e induz o aumento do fundo do espectro [88].

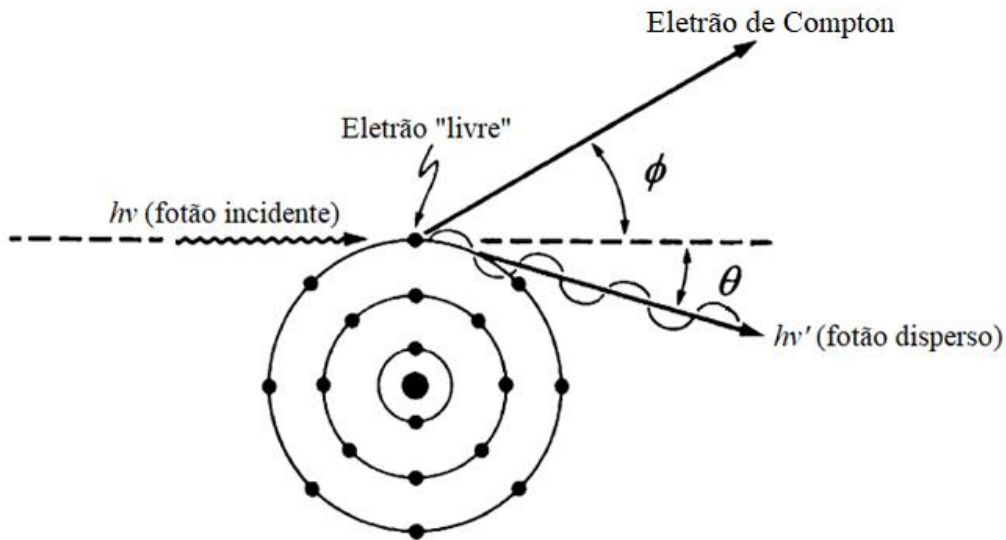


Figura 5.7: Ilustração do efeito de Compton. Imagem adaptada da Referência [85].

5.3.3 Dispersão de Rayleigh

A dispersão de Rayleigh, ilustrada na figura 5.8, refere-se à dispersão elástica de um feixe de fótons pela matéria, não ocorrendo transferência de energia para o meio. O fóton incidente interage com os elétrons ligados do átomo como um todo. Os elétrons ficam temporariamente em movimento (ou oscilação) devido ao campo eletromagnético do fóton, e retornam ao estado original ao emitirem um fóton com a mesma energia do fóton incidente. Neste processo, a energia do fóton incidente é demasiado reduzida para libertar qualquer elétron da sua camada. O fóton disperso é emitido segundo um ângulo reduzido relativamente ao fóton incidente [85].

A probabilidade de ocorrer dispersão elástica é maior quando a energia do fóton é muito reduzida, e quando o número atômico dos elementos presentes no meio é muito elevado [85]. A dispersão de Rayleigh, à semelhança da dispersão de Compton, não contribui para a identificação da amostra e aumenta o fundo do espectro [88].

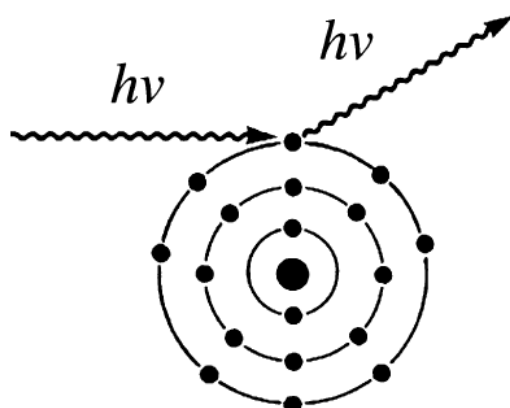


Figura 5.8: Ilustração da dispersão de Rayleigh. Imagem adaptada da Referência [85].

5.3.4 Produção de pares

Nesta interação, o fóton interage com o campo eletromagnético do núcleo e desaparece com a criação de um positrão e de um elétron. Esta reação é um exemplo de conversão de energia em massa. Como a energia de repouso do elétron ou do positrão é $m_0c^2 = 0,511$ MeV, a energia mínima para a produção de pares é de 1,022 MeV [85]. Visto que, a energia máxima do feixe de raios-X produzido no tubo é de 50 keV, esta interação não ocorre nas condições experimentais em que foi realizado este trabalho.

Estamos agora em condições de compreender a relação entre a energia de um feixe de raios-X e a sua atenuação. Na figura 5.9, está presente um gráfico do coeficiente linear de atenuação total em função da energia do fóton, assim como as contribuições das componentes individuais de interação. Tal como foi referido previamente, o coeficiente linear de atenuação total é proporcional à secção eficaz total (expressão 5.3). O valor da secção eficaz total, por sua vez, é dependente das energias dos fótons, uma vez que, a probabilidade de ocorrência dos diferentes processos de interação depende da energia do fóton incidente. Na figura 5.9 é possível verificar que o efeito fotoelétrico domina a região das baixas energias, o efeito de Compton domina as regiões intermédias, e a produção de pares domina a região das energias elevadas. Para energias muito reduzidas, o coeficiente linear de atenuação total regista os valores mais elevados, como tal, um feixe de raios-X com estes valores de energia é mais atenuado (principalmente devido ao efeito fotoelétrico) [85, 86].

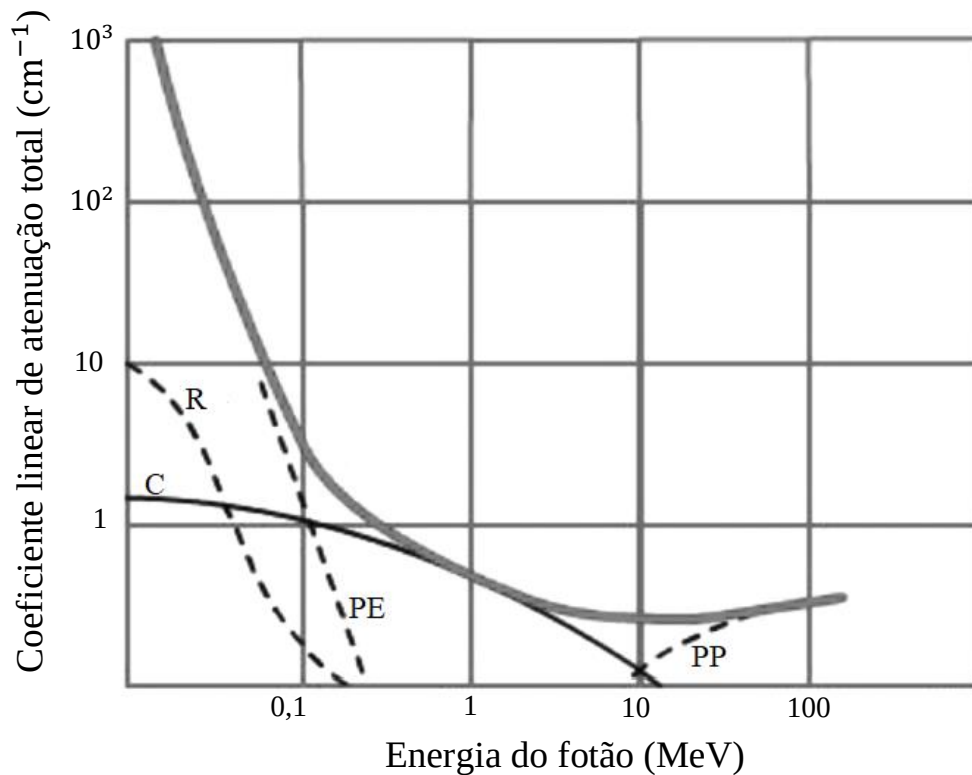


Figura 5.9: Gráfico do coeficiente de atenuação linear total em função da energia do fóton incidente, assim como as contribuições das dispersões de Rayleigh (R), Compton (C), efeito fotoelétrico (PE), e produção de pares (PP). Imagem adaptada da Referência [85].

5.4 Fluorescência de raios-X dispersiva em energia

Os espectrômetros são, geralmente, divididos em 2 grupos principais: Fluorescência de raios-X por dispersão em comprimento de onda (WDXRF) e Fluorescência de raios-X dispersiva em energia (EDXRF). A diferença entre os 2 sistemas deve-se ao sistema de detecção. Nos espectrômetros de WDXRF, após a excitação simultânea de todos os elementos da amostra, as diferentes energias da radiação característica emitida da amostra são difratadas em diferentes direções por um cristal analisador ou monocromador. O detector ao ser colocado segundo um determinado ângulo, é possível medir a intensidade dos raios-X com um determinado comprimento de onda. De modo a ser possível medir a intensidade dos diferentes comprimentos de onda, os espectrômetros recorrem a um detector móvel num goniómetro, ou a um conjunto de detectores em posições fixas. Nos espectrômetros de EDXRF, após a excitação dos elementos de uma amostra, um detector dispersivo em energia em combinação com um analisador multicanal são utilizados para, simultaneamente, detetar a radiação de fluorescência emitida da amostra, e separar as diferentes energias da radiação característica de cada elemento químico presente na amostra [89]. Na figura 5.10 encontra-se esquematizado um espectrômetro de EDXRF. A configuração de XRF utilizada nesta dissertação para análise de amostras, ou seja, a micro fluorescência de raios-X com geometria convencional, é uma técnica de EDXRF.

A configuração de EDXRF utilizada na realização desta dissertação tem sido implementada em estudos arqueológicos, nomeadamente na determinação de concentrações de elementos traço em ossadas humanas, e no mapeamento da distribuição espacial desses elementos nos ossos [2, 3, 4, 27]. De seguida, os 2 componentes fundamentais de um espectrômetro de EDXRF, a fonte de excitação e do sistema de detecção, são explicados em maior detalhe.

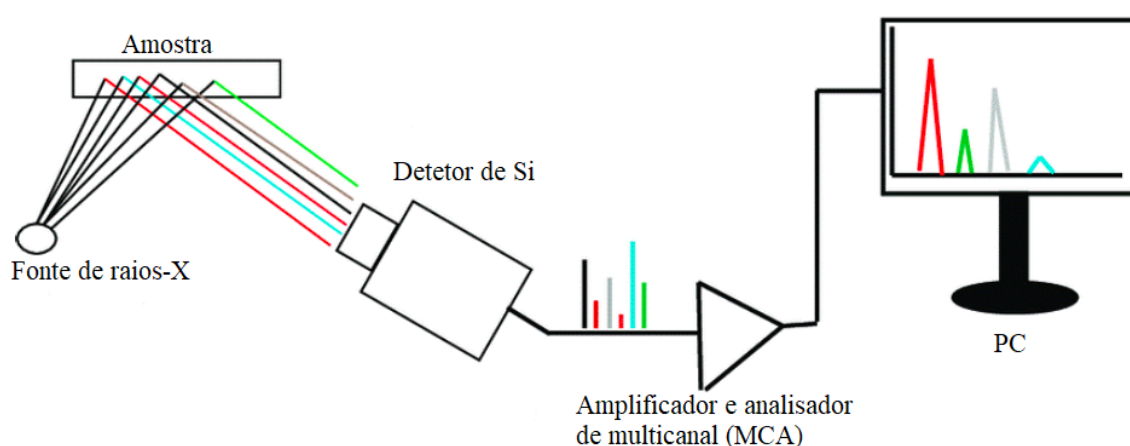


Figura 5.10: Esquema dos principais componentes de um espectrômetro de EDXRF. Imagem adaptada da referência [90].

5.4.1 Fonte de excitação

Diferentes tipos de fontes têm sido empregues para a excitação dos raios-X característicos dos elementos de uma amostra. Nomeadamente fontes baseadas em eletrões, raios-X, radiação γ , prótons, e radiação do sincrotrão. Atualmente, a fonte de excitação mais comum presente nos espectrômetros de EDXRF, é a fonte de fótons de raios-X (figura 5.11). Estas fontes consistem num gerador muito estável de alta tensão, com capacidade de fornecer diferenças de potencial tipicamente de 40-100 kV, e um tubo de raios-X selado. O gerador cede corrente ao filamento do tubo de raios-X, que é tipicamente uma bobina de tungsténio. A corrente aplicada provoca o aquecimento do filamento e emissão de eletrões, num fenómeno designado por efeito termiónico. Devido à aplicação de uma diferença de potencial entre o cátodo (filamento) e o ânodo, uma porção desta nuvem de eletrões é acelerada em direção ao ânodo metálico do tubo de raios-X. O ânodo é tipicamente um bloco de Cu, arrefecido por água, com um determinado material alvo cimentado na sua superfície [89]. Os eletrões acelerados vão interagir com o ânodo e vai ocorrer produção de raios-X através de 2 eventos [91]:

- A desaceleração dos eletrões provocada pelo campo elétrico das orbitais atómicas dos elementos do ânodo. Este evento vai estar na origem da produção de radiação *Bremsstrahlung*.
- A ionização dos elementos constituintes do ânodo, o que vai causar a emissão de radiação característica.

De seguida, o feixe de raios-X é ejetado do tubo através de uma janela fina de berílio [89]. Como o feixe de raios-X é gerado através dos 2 processos acima mencionados, o espectro resultante possui uma componente contínua e uma componente discreta [91], tal como é possível visualizar na figura 5.12.

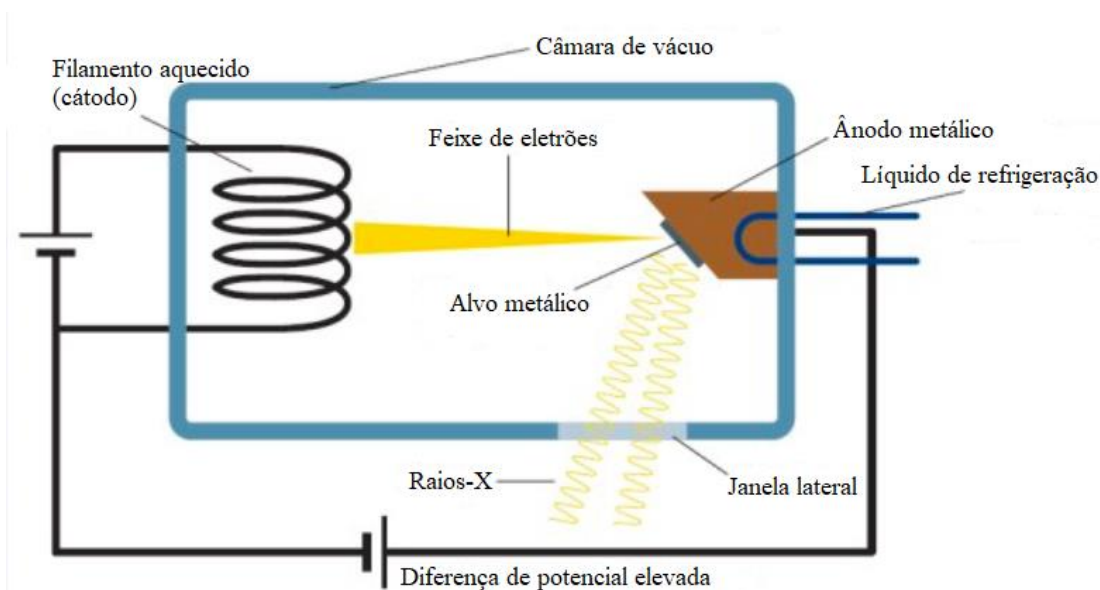


Figura 5.11: Esquema de um tubo de raios-X com janela lateral. Imagem adaptada da referência [92].

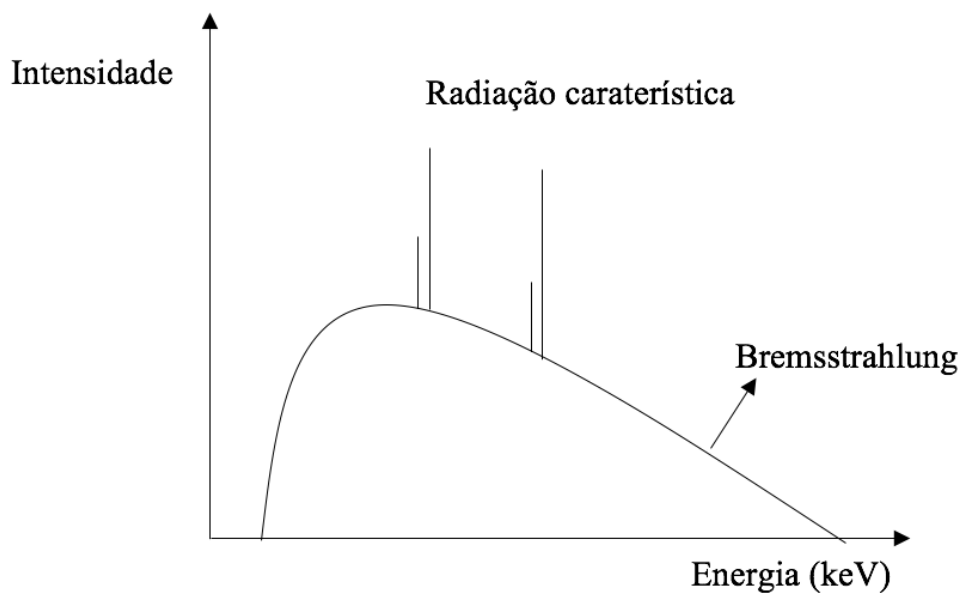


Figura 5.12: Espectro típico de um feixe de raios-X à saída de um tubo de raios-X. Imagem adaptada da referência [79].

5.4.2 Detetor

Nos espectrómetros de EDXRF é utilizado um detetor de elevada resolução. Nestes detetores, a energia transportada pela radiação, proveniente da amostra, é convertida em formas que podem ser reconhecidas eletronicamente.

Um detetor de raios-X é um transdutor para a conversão da energia do fóton de raios-X em impulsos de tensão. O funcionamento destes detetores tem como base o processo de fotoionização. Neste processo, os fótons de raios-X provenientes da amostra interagem com o material do detetor, produzindo um número específico de pares elétron-lacuna. A corrente produzida por esses elétrons é convertida num impulso de tensão, de modo a que um impulso de tensão digital seja produzido por cada fóton de raios-X incidente [89]. Posteriormente, os sinais são transmitidos para o pré-amplificador e amplificador, terminando no analisador multicanal. O analisador multicanal realiza o armazenamento e contagem do número de impulsos de tensão, cuja amplitude se situa dentro de cada intervalo discreto correspondente a um canal. Deste modo, os impulsos são distribuídos pelos canais, e a cada impulso num canal é atribuído um número de contagens que permite a obtenção de um histograma de contagens por número de canais [91].

Um detetor de raios-X é caracterizado por um conjunto de parâmetros, nomeadamente [81]:

- Resolução, que define a capacidade de um detector de distinguir 2 fótons com energias semelhantes. Este parâmetro pode ser medido através da largura a meia altura da linha K_{α} do Mn (*full width at half maximum*).

- Eficiência, que se refere à quantidade de fótons que são detetados por um detector, em relação ao número de fótons emitidos pelo tubo de raios-X.

- Sensibilidade, que corresponde à capacidade de um detector em produzir um impulso de tensão para uma dada energia.

- Taxa de contagens, ou seja, a razão do número de fótons detetados por unidade de tempo.

5.4.3 Micro-Fluorescência de raios-X com geometria convencional (μ -XRF)

O espectrômetro de μ -XRF utilizado nesta dissertação foi o M4 Tornado da Bruker. Este espectrômetro pode ser utilizado para a análise elementar de materiais e do seu revestimento (determinação da espessura e da composição). O M4 Tornado permite realizar uma análise elementar pontual e mapeamentos da distribuição dos elementos ao longo de uma linha (*Line scan*) ou de uma área (*Mapping*) da amostra. Estas tarefas são possíveis devido a uma lente policapilar, que permite focar o feixe de raios-X numa área reduzida da amostra. O M4 Tornado é constituído pelos seguintes componentes do sistema (ilustrados na figura 5.13) [93]:

- Espectrômetro com câmara da amostra, componentes de excitação (gerador de alta tensão, tubo de raios-X, componentes de ótica), componentes de deteção (detector, processamento de sinal), componentes de visualização e posicionamento da amostra (microscópio ótico, plataforma X-Y-Z), eletrónicos de controle e circuitos de segurança.

- Computador com componentes periféricos como monitor, teclado e rato. No computador é possível controlar os componentes do espectrômetro, nomeadamente, as condições de excitação (parâmetros do tubo de raios-X, filtros, tempo de exposição), o detector, o posicionamento da plataforma X-Y-Z, e a câmara (magnificação, iluminação da câmara da amostra), através de uma interface gráfica do utilizador.

- Bomba de vácuo, de modo a ser possível realizar medições em condições de vácuo, o que possibilita a deteção de elementos de baixo número atómico.



Figura 5.13: Componentes do sistema M4 Tornado. Imagem adaptada da referência [93].

No espectrômetro M4 Tornado, o feixe é produzido no tubo de raios-X com o auxílio de componentes de ótica ou colimadores. O tubo é alimentado por um gerador de alta tensão (até 50 kV) e baixa potência (potência máxima de 30 W) e é arrefecido por ar. O material do ânodo do tubo de raios-X é o ródio (Rh). Após a interação dos elétrons com o material do ânodo, o feixe de raios-X gerado é ejetado do tubo através de uma fina janela de berílio. Posteriormente, o feixe de raios-X pode interagir com um filtro, uma vez que neste espectrômetro existe a possibilidade de selecionar um filtro dentro de cinco possíveis: três filtros de alumínio com diferentes espessuras (12,5, 100 e 630 μm), um filtro de alumínio e titânio (Al/Ti – 100/25 μm), e um filtro de alumínio, titânio e cobre (Al/Ti/Cu – 100/50/25 μm) [93]. Os filtros permitem reduzir a radiação de fundo na região de interesse e eliminar a radiação característica do Rh nas baixas energias. O grau de atenuação depende do tipo de filtro e da sua espessura [94].

Tal como foi referido no início desta secção, o espectrômetro M4 Tornado possui uma lente policapilar [93]. Estas lentes são um conjunto de diversos tubos de vidro oco com diâmetro reduzido (inferior a 2 μm), que permitem a obtenção de um feixe focalizado com cerca de 25 μm de diâmetro para a energia do Mo, através de sucessivas reflexões totais do feixe nos tubos. De modo a que o feixe, proveniente do tubo de raios-X, se propague ao longo dos capilares por reflexões totais externas, é necessário que o ângulo de incidência dos fotões do feixe na superfície dos capilares (ângulo entre a direção de propagação do fotão e o plano da interface) seja inferior a um determinado ângulo crítico. Caso o ângulo de incidência dos fotões do raios-X seja superior ao ângulo crítico, ocorre refração desta radiação através da superfície dos capilares [95].

A detecção da radiação de fluorescência é realizada por um detetor dispersivo em energia. O M4 Tornado possui um *silicon drift detetor* (SSD) com 30 mm² de área ativa. Este detetor oferece uma excelente taxa de contagem (superior a 200 000 contagens por segundo) juntamente com uma resolução em energia muito estável (inferior a 145 eV para a linha K_{α} do Mn) [93].

Na figura 5.14, está presente o posicionamento de cada um dos principais componentes internos do espectrómetro M4 Tornado (tubo de raios-X, lente policapilar, detetor, etc) durante a obtenção de um espectro.

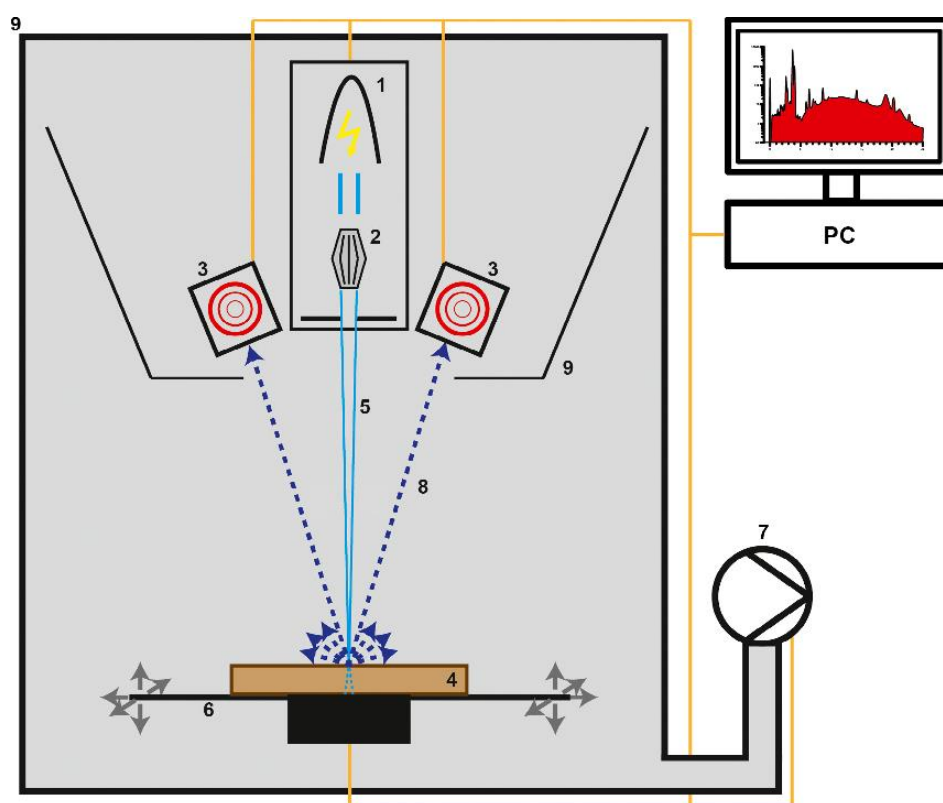


Figura 5.14: Visão geral esquemática do espectrómetro M4 Tornado. Legenda: (1) -Tubo de raios-X, (2) - lentes policapilares, (3) - detetor (SSD), (4) - amostra, (5) - feixe de raios-X incidente focado, (6) - plataforma X-Y-Z, (7) - bomba de vácuo, (8) - radiação de fluorescência incidente no detetor, (9) - câmara de vácuo. Imagem adaptada da referência [96].

5.4.4 Espectro de raios-X

Um espectro de raios-X de uma determinada amostra é caracterizado pela presença de picos gaussianos, que são correspondentes às linhas espectrais dos elementos presentes nessa amostra, sobrepostos num fundo contínuo. No entanto, também existem interferências espectrais adicionais que podem originar picos no espectro que não estão associados com a composição elementar da amostra

analisada. Estes artefactos contribuem para uma interpretação incorreta do espectro, e podem ser atribuídos à fonte de radiação primária, mais concretamente ao ânodo do tubo de raios-X, ou ao detetor [97]. Antes de descrever mais detalhadamente cada um destes artefactos, é relevante descrever as principais características de um espectro típico de μ -XRF.

Na figura 5.15 está presente um espectro típico obtido na análise de estruturas ósseas recorrendo ao espectrómetro M4 Tornado. Este espectro pode ser dividido em 3 regiões, a região I, II e III. Na região I, ou seja, na gama das baixas energias, é essencialmente o ruído eletrónico que contribui para a radiação presente. Na região II estão presentes os picos dos raios-X característicos dos elementos presentes na amostra. Esta região corresponde assim à zona do espectro de maior importância para a identificação dos elementos presentes na amostra. Por fim, na região III, estão presentes 4 picos intensos correspondentes à dispersão de Rayleigh e de Compton da radiação característica do ânodo (no nosso caso, o ródio) na amostra. Na dispersão de Rayleigh, os raios-X produzidos no ânodo interagem elasticamente com os átomos da amostra, ou seja, sem ocorrer perdas de energias, e são posteriormente registados pelo detetor. Como resultado, no espectro são visíveis 2 picos correspondentes às linhas espectrais K_α e K_β do ródio. Na dispersão de Compton, os raios-X produzidos pelo ânodo perdem energia na sua interação com os átomos da amostra. Como tal, são produzidos 2 picos no espectro ligeiramente mais largos que os picos de Rayleigh, e com energias ligeiramente inferiores [97].

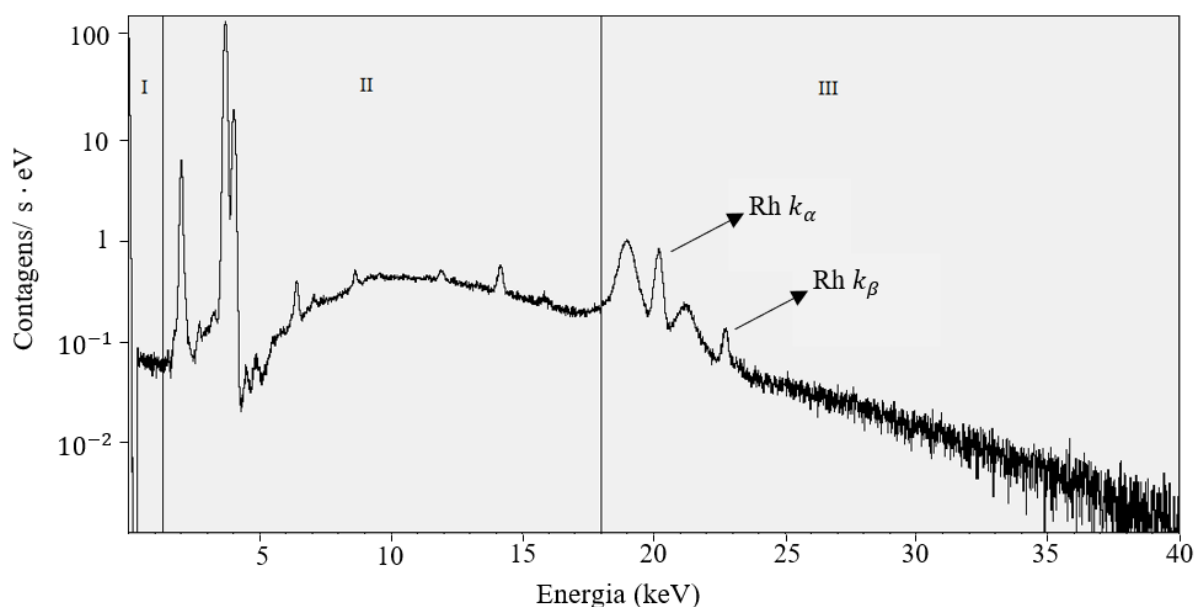


Figura 5.15: Espectro de raios-X de uma amostra óssea analisada por μ -XRF no M4-Tornado da Bruker (FCT-UNL), nas condições 50 kV, 300 μ A com um filtro de Al-12,5 μ m.

No espectro da figura 5.15 também é possível observar a presença de radiação de fundo. Quando o feixe de raios-X incide na amostra, para além de ser absorvido, causando ejeção de eletrões e

subsequente emissão de fótons característicos, pode também ser disperso. Esta radiação dispersa não é utilizada para fluorescência, mas é registrada pelo detetor, sobrepondo-se aos picos característicos dos elementos da amostra, o que limita a sensibilidade do espectrómetro. O uso de filtros à saída do tubo de raios-X permite reduzir radiação de fundo em porções específicas do espectro, tal como é possível visualizar na figura 5.16, onde estão presentes 2 espectros que foram obtidos sob a mesmas condições à exceção do filtro. O uso de um filtro adequado permite assim melhor a sensibilidade do espectrómetro [94].

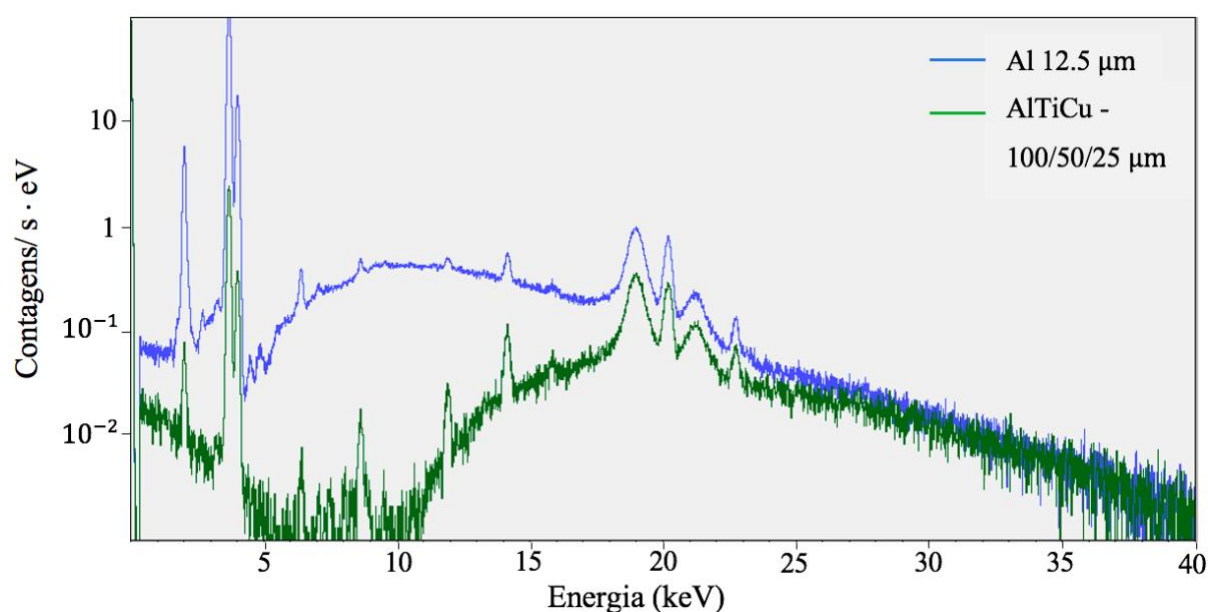


Figura 5.16: Espectros de raios-X de uma amostra óssea analisada por μ -XRF no M4-Tornado da Bruker (FCT-UNL), nas condições 50 kV, 300 μ A com um filtro de Al-12,5 μ m (espectro azul) e com um filtro de AlTiCu – 100/50/25 μ m (espectro verde).

Relativamente aos artefactos, tal como foi mencionado na introdução desta secção, podem ser atribuídos ao ânodo da fonte de raios-X (picos de Rayleigh e de Compton) ou ao detetor (picos de soma e de escape).

Os picos de soma são o resultado de dois fótons de raios-X característicos atingirem o detetor simultaneamente. O detetor regista este evento como se tratando de um único fóton com uma energia resultante da soma das energias dos dois fótons incidentes. Como consequência, no espectro surge um pico com essa mesma energia [97].

Os picos de escape resultam da interação dos fótons dos raios-X provenientes da amostra com os átomos do material semiconductor que constitui o detetor. No caso do M4 Tornado, o material semiconductor é o silício. Devido a esta interação, os átomos que constituem o silício podem ficar excitados e emitir raios-X característicos. No entanto, quando este fenómeno ocorre na periferia do

detetor existe uma grande probabilidade dos raios-X característicos escaparem e não depositarem a sua energia no detetor. Como resultado, surgem picos no espectro com menos 1,74 keV (energia de um fóton de raios-X da linha k_α do silício) que os picos correspondentes às linhas K e L dos elementos maioritários da amostra. Os picos de escape são pequenos e geralmente correspondem a somente 1% da altura dos picos originais [97].

Por outro lado, os picos presentes na região III da figura 5.15, cuja origem já foi explicada previamente, são exemplos de artefactos com origem no ânodo do tubo de raios-X [97].

Metodologia

6.1 Descrição das amostras

Neste trabalho foram analisados os ossos dos corpos de 8 indivíduos inumados na necrópole externa no Túmulo Megalítico de Santa Rita (mais detalhes na secção 1.2). No total foram analisados 23 ossos de diferentes estruturas do corpo humano recorrendo ao espectrómetro M4 Tornado da Bruker. Para além das amostras ósseas, também foi analisado o solo que envolvia o local de inumação de cada um dos 8 indivíduos, de modo a avaliar possíveis contaminações *post-mortem* do local de sepultamento. As informações relativas aos 8 indivíduos nomeadamente, as características da inumação, o estado do esqueleto, o sexo, a idade dentária ou classe etária, e os ossos analisados, estão organizadas na tabela 6.1.

Indivíduo	Inumação	Estado do esqueleto	Sexo	Idade/Classe etária	Ossos
1	Dupla (Área 1)	Incompleto e danificado	Indeterminado	12 anos ($\pm$ 36 meses)	- Fêmur - Omoplata
2		Incompleto e danificado	Indeterminado	9 anos ($\pm$ 24 meses)	- Fíbula - Costelas - Úmero
3	Individual (Área 2)	Bem conservado	Masculino	30-50 anos	-Vértebra lombar - Pélvis - Fêmur
4	Individual (Área 3)	Incompleto e mal conservado	Feminino	Adulto	- Escápula - Fêmur - Calcâneo
5	Individual (Área 4)	Incompleto e danificado	Feminino	>50 anos	- Sacro - Úmero - Fêmur
6	Individual	Incompleto e bastante danificado	Feminino	Adulto	- Úmero - Crânio
7	Dupla (Área 5)	Incompleto e bastante danificado	Feminino	Adulto	- Ulna - Omoplata - Crânio - Costela
8		Incompleto e bastante danificado	Masculino	Adulto	- Fêmur - Crânio - Fíbula

Tabela 6.1: Informações relativas aos 8 indivíduos inumados na necrópole externa. Informação obtida na referência [7].

6.2 Preparação das amostras

6.2.1 Preparação de pastilhas

A primeira etapa na preparação das amostras para serem analisadas no espectrômetro M4 Tornado, consistiu na remoção do sedimento do solo que envolvia os ossos. Os ossos foram escovados, e o sedimento do solo foi armazenado em recipientes de plástico. Relativamente aos ossos, após a remoção do sedimento de solo da sua superfície, foram todos lavados em água corrente e cuidadosamente escovados de modo a remover qualquer possível contaminação do solo (figura 6.1). Posteriormente, os ossos foram secos à temperatura ambiente e armazenados sob condições de humidade adequadas, durante pelo menos 48 horas. Após esse período, foram removidas porções de

tamanho reduzido dos ossos utilizando um x-ato. Recorrendo a um almofariz e a um pilão essas porções foram convertidas em pó, e foram armazenadas em recipientes de plástico com a devida identificação (número do indivíduo, nome da estrutura óssea, e tipo de osso) como se exemplifica na figura 6.2. Posteriormente, o sedimento do solo previamente recolhido e o pó dos ossos foram comprimidos em pastilhas (2 cm de diâmetro e 1 mm de espessura) com uma prensa hidráulica manual de 13 toneladas da *Specac* (figura 6.3). Cada pastilha foi colada a uma película de *Mylar* que, por sua vez, foi colocada num suporte de 50x50 mm (figura 6.4). Para cada osso analisado foram obtidas 2 pastilhas. O sedimento do solo recolhido dos ossos foi importante para determinar os elementos químicos presentes no solo que rodeava o local de inumação de cada um dos indivíduos, o que tornou possível avaliar a ocorrência de contaminações *post-mortem*.

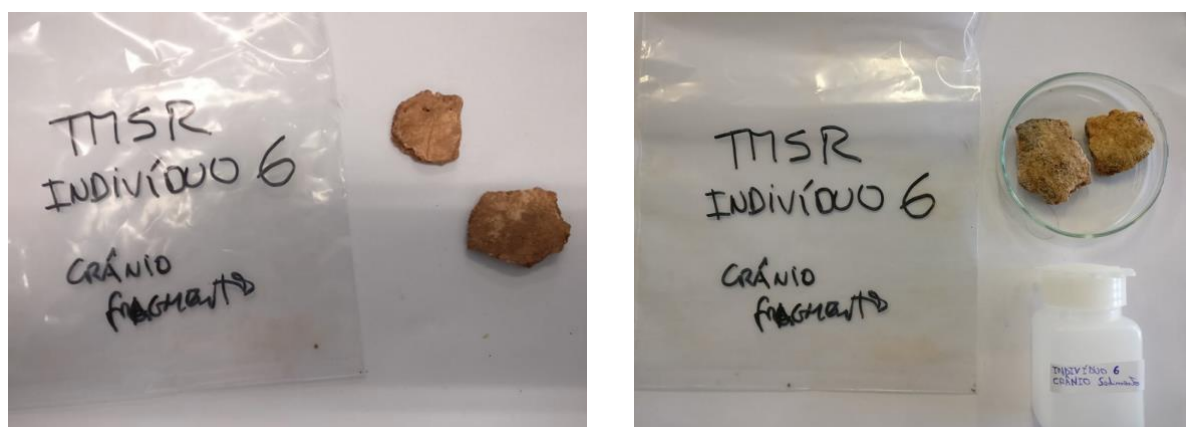


Figura 6.1: Amostras ósseas antes (imagem da esquerda) e depois (imagem da direita) do processo de limpeza em água corrente. O sedimento do solo presente na sua superfície foi previamente recolhido e identificado nos devidos recipientes.



Figura 6.2: Material utilizado para obter e armazenar o pó dos ossos.



Figura 6.3: Prensa hidráulica manual de 13 toneladas da *Specac* e equipamento acessório utilizados para comprimir o pó dos ossos e o sedimento do solo em pastilhas.



Figura 6.4: Pastilhas das amostras ósseas coladas numa película de *Mylar* num suporte de 50x50 mm.

6.2.2 Preparação de osso para mapeamento

O osso destinado a mapeamento (ulna do indivíduo 7) também foi sujeito a um processo de limpeza e secagem idêntico ao das outras amostras ósseas. Posteriormente, foi cortada uma secção transversal do osso recorrendo a um micrótopo com serra de diamante, para evitar contaminação na superfície de corte, com uma espessura aproximada de 2 mm. O corte foi realizado sob refrigeração com água destilada para evitar o aquecimento da amostra e dano nas estruturas biológicas. Por fim, e à semelhança das pastilhas, a fatia obtida foi colada numa película de *Mylar* e colocada num suporte de 50x50 mm, de modo a garantir que a amostra permanecesse imóvel durante a remoção do ar de dentro da câmara.

6.3 Análise das amostras

6.3.1 Pastilhas

As pastilhas obtidas a partir das amostras ósseas e do sedimento do solo foram analisadas recorrendo ao espectrómetro M4 Tornado da Bruker, cujas características estão descritas na secção 5.4.3. As pastilhas foram colocadas na plataforma X-Y-Z do espectrómetro (figura 6.5) e, através de uma interface gráfica no computador, foi possível controlar os elementos do espectrómetro para a obtenção de um espectro adequado às nossas necessidades. Foi seleccionada uma diferença de potencial de 50 kV para o gerador de alta tensão e, para a detecção de elementos de menor número atómico, foi aplicada uma corrente de 300 μA e utilizado um filtro de Al-12.5 (filtro de Al com 12,5 μm de espessura). Para facilitar a detecção de elementos com maior número atómico no espectro, foi aplicada uma corrente de 600 μA , de modo a aumentar o sinal correspondente aos elementos pesados, e um filtro de Al/Ti/Cu, para atenuar a radiação de fundo na zona de energia onde esses picos estão presentes. Para exemplificar, nas figuras 6.6 e 6.7 são apresentados 2 espectros obtidos nas condições acima descritas na análise de uma amostra óssea. No espectro obtido com o filtro de AlTiCu – 100/50/25 μm e com uma corrente de 600 μA (figura 6.7), os sinais dos elementos de maior número atómico estão mais visíveis, o que facilita a sua identificação. Relativamente ao modo de aquisição seleccionado, em todas as pastilhas foi realizada uma análise elementar pontual em vários pontos. Neste método foram seleccionados 4 pontos em cada pastilha, e em cada ponto foi obtido um espectro com um tempo de aquisição de 120 s. Para cada ponto foram realizadas 2 medições, uma utilizando o filtro de Al-12,5 μm e corrente de 300 μA , e outra com um filtro de Al/Ti/Cu – 100/50/25 μm e corrente de 600 μA . As medições foram efetuadas em condições de vácuo, a 20 mbar.



Figura 6.5: Colocação das pastilhas na plataforma X-Y-Z do espectrômetro M4 Tornado previamente à análise de micro fluorescência.

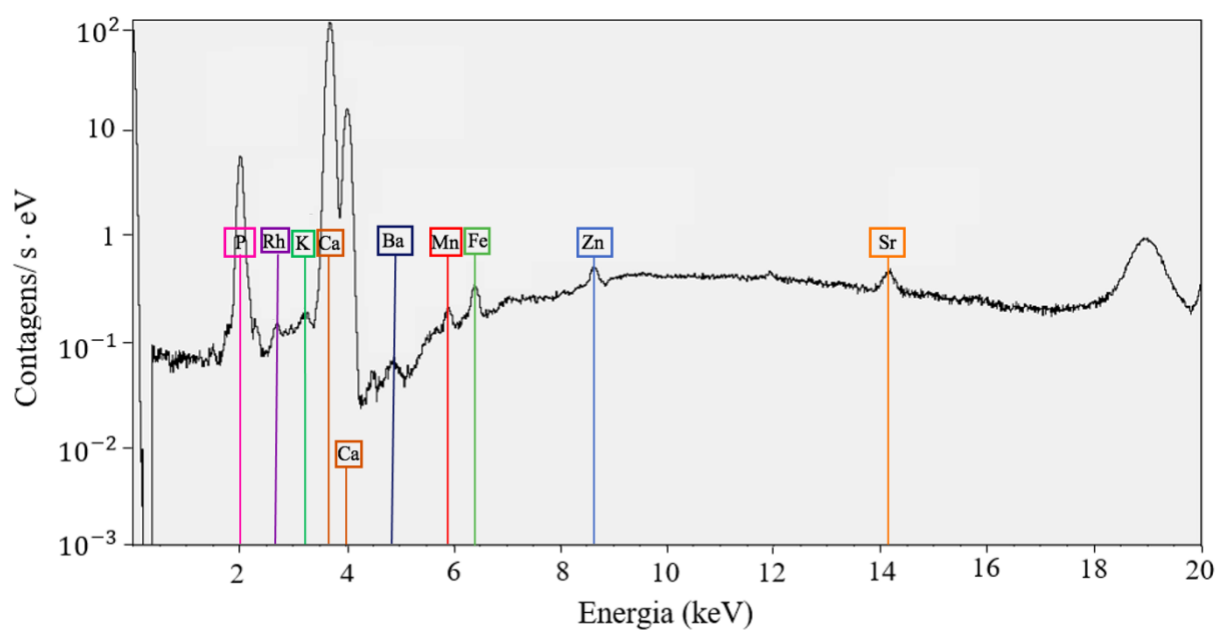


Figura 6.6: Espectro de raios-X de uma amostra óssea analisada por μ -XRF no M4-Tornado da Bruker (FCT-UNL), nas condições 50 kV, 300 μ A com um filtro de Al-12,5 μ m.

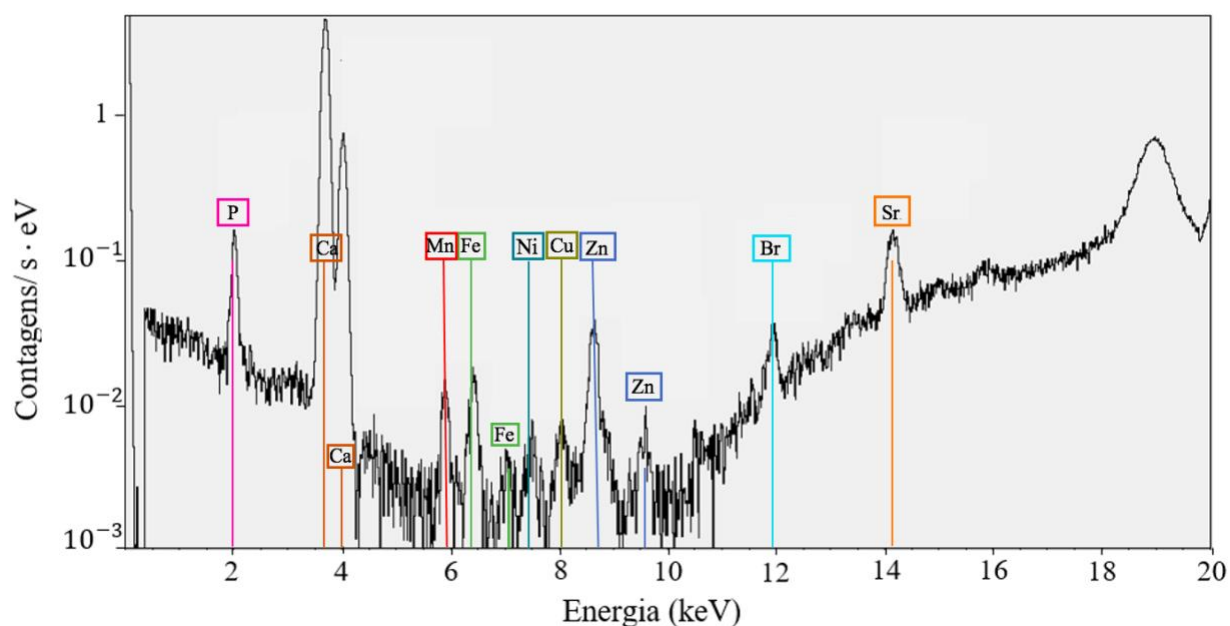


Figura 6.7: Espectro de raios-X de uma amostra óssea analisada por μ -XRF no M4-Tornado da Bruker (FCT-UNL), nas condições 50 kV, 600 μ A com um filtro de AlTiCu – 100/50/25 μ m.

6.3.2 Fatia

A fatia da ulna do indivíduo 7 também foi analisada no espectrômetro M4 Tornado. Foi realizado um mapeamento dos elementos químicos presentes na sua área superficial de modo a ser possível compreender como os elementos traço se distribuem ao longo da secção transversal dos ossos longos. Recorrendo novamente à interface gráfica no computador, foi selecionada uma diferença de potencial de 50 kV e foi removido o ar de dentro da câmara até ser atingida uma pressão de 20 mbar. Relativamente às condições de aquisição, foi selecionada uma resolução espacial de 25 μ m, e foram realizados 3 ciclos de varrimento em serpentina, com uma taxa de aquisição de 4,2 mm/s, numa área de 195 mm², de modo a que abrangesse toda a superfície da fatia. Foram realizadas 2 medições, uma usando o filtro de Al-12,5 μ m e 300 μ A de corrente, e outra com um filtro de Al/Ti/Cu – 100/50/25 μ m e 600 μ A de corrente. Cada medição teve uma duração aproximada de 2 horas.

6.4 Quantificação

A quantificação dos elementos presentes nas pastilhas foi realizada no software próprio do M4 Tornado. O método de quantificação executado pelo software foi o método dos parâmetros fundamentais *standardless*. Este método vai ser descrito, de seguida, em maior detalhe.

Os métodos quantitativos de XRF permitem converter as intensidades de fluorescência medidas em concentrações dos elementos presentes (analitos). Esta tarefa é de grande complexidade, pois as intensidades medidas dependem não apenas da concentração do analito, mas também dos outros elementos da amostra (matriz), tipo de amostra (sólida, líquida, pó), forma e espessura da amostra analisada e das condições de medição [98]. O método dos parâmetros fundamentais, que é um dos métodos quantitativos mais populares, é um método iterativo de determinação da composição de uma amostra desconhecida. Inicialmente é atribuída uma determinada composição (matriz) para a amostra analisada; as intensidades teóricas correspondentes a essa composição são comparadas com o espectro experimental. A composição vai sendo ajustada até o espectro teórico coincidir com o experimental [81].

O método dos parâmetros fundamentais é baseado na equação de Sherman (expressão 6.1), onde são consideradas as emissões por fluorescência primárias e secundárias. Nesta equação, Sherman propôs uma fórmula matemática para calcular a intensidade da radiação do analito numa amostra de composição conhecida. Mais tarde, esta equação foi melhorada por Shiraiwa e Fujino. A equação geral para calcular a intensidade da fluorescência de raios-X, I_i , emitida por um analito numa amostra de espessura x , quando é irradiado por um feixe de raios-X policromático é a seguinte [98]:

$$I_i = \frac{d\Omega}{4\pi \sin \phi_1} Q_i q_i W_i \int_{\lambda_{min}}^{\lambda_{edge}} \tau_i(\lambda) I_0(\lambda) \frac{1 - e^{[-\chi(\lambda, \lambda_i) \rho x]}}{\chi(\lambda, \lambda_i)} (1 + \sum_j W_j S_{ij}) d\lambda \quad (6.1)$$

Onde $d\Omega$ é o ângulo sólido diferencial para a radiação característica; i e j são os subscritos para o analito e o elemento da matriz, respetivamente; Q_i é a sensibilidade do espectrómetro para a radiação característica do analito i ; W_i e W_j são frações mássicas do analito i e do elemento da matriz j , respetivamente; λ_{min} e λ_{edge} são o comprimento de onda mínimo correspondente à energia máxima do espectro, e o comprimento de onda da descontinuidade de absorção do analito, respetivamente; $\tau_i(\lambda)$ é o coeficiente de absorção fotoelétrico do analito i para a radiação primária de comprimento de onda λ ; $I_0(\lambda)$ é a intensidade da radiação primária; p é a densidade da amostra; x é a espessura da amostra; q_i é a sensibilidade do método para o analito i ; $\chi(\lambda, \lambda_i)$ é o coeficiente de atenuação mássico total da

amostra para a radiação primária λ e radiação fluorescente λ_i ; ϕ_1 é o ângulo de incidência da radiação primária e S_{ij} representa o termo de reforço para o elemento j da matriz.

Na expressão 6.1 é possível observar que a intensidade da radiação característica de um analito é uma função complexa que envolve a composição elementar da amostra e a sua espessura. Os átomos do analito e os átomos dos outros elementos da amostra vão absorver e atenuar a radiação primária (absorção primária) e a radiação de fluorescência (absorção secundária). Se os elementos da amostra emitirem radiação característica com energia suficiente para excitar o analito, este elemento é excitado emitindo radiação característica para além da energia proveniente do tubo de raios-X (fluorescência secundária). Estes fenómenos de atenuação e aprimoramento da radiação característica na amostra são denominados de efeitos de matriz. A expressão 6.1 permite calcular a intensidade da radiação de fluorescência de um analito se for conhecida a matriz da amostra e os parâmetros físicos, nomeadamente, os coeficientes de absorção fotoelétrica, os coeficientes de atenuação mássica, as probabilidades de transição, rendimentos de fluorescência, entre outros; valores estes que estão disponíveis em bases de dados científicas [98].

O método dos parâmetros fundamentais permite realizar uma análise com padrões ou *standardless* ou seja, sem recurso a padrões. A análise com padrões pode ser alcançada através de uma etapa de calibração, em que uma função resposta de XRF para cada elemento é obtida usando um padrão de composição conhecida (idealmente semelhante em matriz e morfologia à amostra cuja composição se pretende determinar). Na análise *standardless* são fornecidos resultados com base em valores teóricos dos parâmetros fundamentais, eficiências, e sensibilidades, determinadas em fábrica e inseridas na programação do próprio espectrómetro [98].

De modo a realizar a análise quantitativa nas pastilhas no software M4 Tornado, foi necessário identificar os elementos presentes na amostra, através da identificação dos picos característicos presentes nos espectros, e posteriormente construir uma matriz. Para as pastilhas obtidas a partir do pó ósseo, foi utilizada uma matriz de hidroxiapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), e nas pastilhas constituídas por sedimento do solo, foi construída uma matriz constituída por vários óxidos (Na_2O , MgO , Al_2O_3 , SiO_2 , P_2O_5 , SO_3 , K_2O , CaO , TiO_2 , Cr_2O_3 , MnO , Fe_2O_3 , NiO , ZnO , SrO , Y_2O_3 , BaO), dióxido de carbono e água. Posteriormente, o software obtém as concentrações dos elementos selecionados previamente em cada um dos 4 pontos selecionados da pastilha. Nesta análise quantitativa não foi necessário recorrer a padrões certificados, uma vez que foi realizada uma análise *standardless*. No entanto, a validação do método foi feita com recurso a amostras padrão.

6.4 Limites de detecção e exatidão

Os padrões utilizados para cálculo dos limites de detecção e para validação do método quantitativo foram o “Bone Ash SRM NIST-1400” e “SRM IAEA-soil 7”, uma vez que as suas matrizes são semelhantes às das amostras ósseas e do solo analisadas.

O limite de detecção (LD) é a quantidade mínima de concentração de um determinado elemento que permite a sua detecção numa determinada amostra. Estes podem ser calculados através de padrões cujas concentrações dos elementos em estudo são conhecidas. A expressão para o cálculo dos LD é a seguinte [27]:

$$LD = \frac{3C_i\sqrt{N_B}}{N_P} \quad (6.2)$$

Em que C_i é a concentração certificada do elemento i no padrão, N_B é a taxa de contagem para o fundo, e N_P é a taxa de contagem para o pico correspondente ao elemento i .

A exatidão pode ser medida por comparação do resultado experimental com o valor certificado. A equivalência estatística entre os valores certificados e observados pode ser utilizada para confirmar a qualidade da medição. A exatidão é assim uma forma de validação do método quantitativo utilizado [27].

Nas tabelas 6.2 e 6.3 estão presentes, os valores das concentrações (valor médio e desvio padrão) obtidas na análise do padrão “Bone Ash SRM NIST-1400” utilizando o nosso método experimental, os valores certificados desse padrão, a diferença em percentagem dos valores das concentrações obtidas com o valor das concentrações certificadas ($\Delta\%$), e os limites de detecção obtidos, para os 2 modos de aquisição (Al-12,5 $\mu\text{m}/300 \mu\text{A}$ e AlTiCu/600 μA). Nas tabelas 6.4 e 6.5 estão presentes os mesmos resultados só que para a análise do padrão “SRM IAEA-soil 7”.

Elemento	Quantificação	Valor certificado	$\Delta\%$	Limite de detecção
P	159000 $\pm$ 8000	179100 $\pm$ 1900	11	123
K	20 $\pm$ 40	186 $\pm$ 8	89	5
Ca	340000 $\pm$ 20000	381800 $\pm$ 1300	11	16
Fe	400 $\pm$ 100	660 $\pm$ 27	39	14
Zn	150 $\pm$ 30	181 $\pm$ 3	17	5
Sr	222 $\pm$ 8	249 $\pm$ 7	11	8
Pb	50 $\pm$ 5	9,07 $\pm$ 0,12	455	1

Tabela 6.2: Limites de detecção e exatidão ($\mu\text{g/g}$) no M4 Tornado para o padrão “Bone Ash SRM NIST-1400” utilizando um filtro Al-12,5 μm e 300 μA de corrente.

Elemento	Quantificação	Valor certificado	$\Delta\%$	Limite de detecção
P	159000 $\pm$ 8000	179100 $\pm$ 1900	11	1929
K	200 $\pm$ 100	186 $\pm$ 8	8	30
Ca	340000 $\pm$ 20000	381800 $\pm$ 1300	11	173
Fe	400 $\pm$ 60	660 $\pm$ 27	39	3
Zn	170 $\pm$ 40	181 $\pm$ 3	6	1
Sr	160 $\pm$ 10	249 $\pm$ 7	36	6
Pb	12 $\pm$ 3	9,07 $\pm$ 0,12	33	1

Tabela 6.3: Limites de detecção e exatidão ($\mu\text{g/g}$) no M4 Tornado para o padrão “Bone Ash SEM NIST-1400” utilizando um filtro AlTiCu e 600 μA de corrente.

Elemento	Quantificação	Valor certificado	$\Delta\%$	Limite de detecção
Si	90 000 $\pm$ 10 000	180000 $\pm$ 1100	50	328
K	9 000 $\pm$ 3000	12100 $\pm$ 800	26	25
Ca	100 000 $\pm$ 20 000	163000 $\pm$ 60000	39	17
Ti	1 800 $\pm$ 900	3000 $\pm$ 400	40	15
Mn	360 $\pm$ 70	631 $\pm$ 27	43	8
Fe	14 000 $\pm$ 2 000	25700 $\pm$ 500	46	8
Ni	14 $\pm$ 4	26 $\pm$ 5	46	2
Cu	8 $\pm$ 5	11 $\pm$ 2	27	1
Zn	57 $\pm$ 8	104 $\pm$ 3	45	3
Rb	29 $\pm$ 3	51 $\pm$ 4	43	3
Sr	63 $\pm$ 6	108 $\pm$ 5	42	5
Pb	41 $\pm$ 6	60 $\pm$ 5	32	3

Tabela 6.4: Limites de detecção e exatidão ($\mu\text{g/g}$) no M4 Tornado para o padrão “SRM IAEA-soil 7” utilizando um filtro Al-12,5 μm e 300 μA de corrente.

Elemento	Quantificação	Valor certificado	$\Delta\%$	Limite de detecção
Si	90 000 $\pm$ 10 000	180000 $\pm$ 1100	50	4700
K	11 000 $\pm$ 2 000	12100 $\pm$ 800	9	260
Ca	140 000 $\pm$ 30 000	163000 $\pm$ 60000	14	154
Ti	3 000 $\pm$ 1 000	3000 $\pm$ 400	0	74
Mn	600 $\pm$ 100	631 $\pm$ 27	5	13
Fe	23 000 $\pm$ 2 000	25700 $\pm$ 500	11	10
Ni	38 $\pm$ 6	26 $\pm$ 5	46	2
Cu	23 $\pm$ 4	11 $\pm$ 2	109	1
Zn	88 $\pm$ 5	104 $\pm$ 3	15	2
Rb	37 $\pm$ 6	51 $\pm$ 4	27	3
Sr	80 $\pm$ 10	108 $\pm$ 5	26	4
Pb	47 $\pm$ 5	60 $\pm$ 5	22	2

Tabela 6.5: Limites de detecção e exatidão ($\mu\text{g/g}$) no M4 Tornado para o padrão “SRM IAEA-soil 7” utilizando um filtro AlTiCu e 600 μA de corrente.

Tendo em conta os resultados presentes nas tabelas 6.2 e 6.3, verificamos que o modo de aquisição AlTiCu/600 μA é o mais adequado para quantificar os elementos K, Zn, e Pb, presentes nos ossos, visto que a diferença em percentagem dos valores das concentrações obtidas com o valor das concentrações certificadas foi mais reduzida para esses elementos utilizando uma corrente superior a uma filtro com maior número atômico. O Sr foi o único elemento que apresentou resultados mais precisos utilizando o modo de aquisição Al-12,5 μm /300 μA . Relativamente aos restantes elementos presentes nos ossos (P, Ca, e Fe), os resultados das 2 tabelas demonstram que os 2 modos de aquisição são igualmente adequados para a sua quantificação. Os resultados obtidos nas tabelas 6.4 e 6.5 demonstram que o modo de aquisição AlTiCu/600 μA é o mais adequado para quantificar a grande maioria dos elementos presentes nos solos (o Cu é a exceção).

Comparando os valores das concentrações obtidas com os valores certificados dos padrões, verificamos que praticamente todos os valores correspondem à mesma ordem de grandeza. Deste modo, podemos considerar o método quantitativo válido para quantificar as amostras ósseas e as amostras de sedimento do solo.

Apresentação e discussão de resultados

Neste capítulo estão presentes os resultados obtidos na análise das pastilhas (secção 7.1) e da fatia de osso (secção 7.2) utilizando o espectrómetro M4 Tornado, e a discussão desses mesmos resultados. Nas secções seguintes, é realizada uma discussão mais aprofundada sobre a exposição *in vivo* a metais pesados nos 8 indivíduos (secção 7.3), e sobre a sua dieta (secção 7.4). Uma das maiores dificuldades na interpretação dos resultados obtidos consistiu na determinação da origem de incorporação dos elementos traço nos ossos (*ante* ou *post-mortem*). Os ossos analisados estiveram pelo menos 2 Milénios em contacto com o solo, o que poderá ter contribuído para a alteração da sua composição *ante-mortem* devido aos efeitos da diagénese. Tendo em conta que os 8 indivíduos foram inumados ao longo de um largo período temporal (II e I Milénios A.N.E.) e que estavam sepultados em diferentes áreas da necrópole externa, o solo correspondente a cada área pode apresentar propriedades químicas diferentes. Assim sendo, o solo recolhido dos ossos foi utilizado para representar o solo de cada uma das áreas de sepultamento dos indivíduos 1 e 2 (Área 1), indivíduo 3 (Área 2), indivíduo 4 (Área 3), indivíduo 5 (Área 4), e indivíduos 7 e 8 (Área 5). Não foi possível obter sedimento do solo nos ossos do indivíduo 6.

7.1 Quantificação das pastilhas

Nesta secção são discutidos os resultados obtidos na quantificação dos elementos traço presentes nas pastilhas das amostras ósseas. Os resultados são referentes somente aos ossos compactos (14 ossos), visto que os ossos esponjosos analisados possuíam quantidades superiores da grande maioria dos elementos traço, nomeadamente os que também estavam presentes em elevadas quantidades solo, tendo sido assim muito provavelmente afetados pelos efeitos da diagénese. Na tabela 7.1 estes

resultados estão representados para os ossos do indivíduo 5 em que se verifica que os elementos mais abundantes no solo, o Fe e o Mn, são mais abundantes no osso esponjoso (sacro). Os restantes elementos, como surgem em menores quantidades no solo, surgem ligeiramente enriquecidos no osso esponjoso ou em quantidades semelhantes. Esta situação foi similar à observada nos outros indivíduos.

Amostra	Mn	Fe	Ni	Cu	Zn	Br	Sr
Úmero	70±20	900±200	35±6	35±9	130±20	70±10	160±20
Fémur	50±20	400±200	27±6	28±4	110±20	80±20	160±20
Sacro	300±200	2300±600	34±4	39±6	150±20	70±10	170±30
Solo (Área 4)	800±200	30000±10000	30±10	30±10	60±10	16±4	91±8

Tabela 7.1: Concentração ($\mu\text{g/g}$) de alguns elementos traço nos ossos do indivíduo 5 e no solo da sua área de inumação.

Nos resultados presentes nesta secção os elementos mais destacados foram o Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Br, e o Sr, uma vez que foram os elementos traço mais abundantes nas estruturas ósseas e são frequentemente associados à dieta alimentar de um indivíduo. Os resultados dos metais pesados, nomeadamente o As e Hg, também estão presentes, visto estes elementos terem sido detetados nos ossos compactos de alguns indivíduos. Para comparação com os nossos resultados, foi construída uma tabela (Tabela 7.2), que contém as concentrações de elementos traço obtidas em estudos de estruturas ósseas de indivíduos do século XX [99, 100], do período Calcolítico (Idade do Cobre) [101], do Neolítico [99], da Idade de Bronze Média [102], e em indivíduos adultos do Período Helenístico [9].

Referências	Mn	Fe	Ni	Cu	Zn	As	Br	Sr
Século XX [99]	≤ 11	165±114	≤ 8	7±1	205±32	-	2,7±0,4	195±75
Século XX [100]	20±1,6	153±265	-	4,9±0,6	172±26	4,5±1,7	-	147±55
Calcolítico [101]	30-80	110-350	-	38-62	45-135	-	62-75	125-180
Neolítico [99]	90±11	-	≤ 7	35±7	320±10	-	50±10	95±10
Idade do Bronze Média [102]	12-369	-	-	12-27	61-333	-	-	146-364
Período Helenístico [9]	56±51	248±125	3,2±0,7	1,1±1,5	99±35	-	-	-

Tabela 7.2: Concentrações de alguns elementos traço ($\mu\text{g/g}$) obtidas no estudo de estruturas ósseas de indivíduo modernos e de diferentes períodos históricos.

Os resultados obtidos estão representados sob a forma de diagramas de caixa (figura 7.1), que foram construídos recorrendo à linguagem de programação R. Estes diagramas permitem dividir os dados em secções, em que cada uma contém aproximadamente 25% dos resultados, e avaliar a dispersão das medidas obtidas e a sua assimetria. Tal como é possível visualizar na figura 7.1, nestes diagramas é possível identificar a mediana, o quartil inferior Q_1 (medida abaixo da qual estão presentes 25% dos resultados obtidos), o quartil superior Q_3 (medida acima da qual estão presentes 25% dos resultados obtidos), o máximo e o mínimo, que representam as medidas mais altas e mais baixas obtidas, respetivamente, excluindo os *outliers*. Os *outliers* são o conjunto de medidas que são inferiores a $Q_1 - 1,5 * IQR$ ou superiores a $Q_3 + 1,5 * IQR$, em que IQR é o intervalo interquartil ($IQR = Q_3 - Q_1$). Os *outliers* são assim valores que se desviam significativamente das outras medidas, normalmente surgem devido a contaminações da amostra analisada com elementos exteriores, ou simplesmente surgem naturalmente devido à variabilidade da população estudada. No nosso caso, para as amostras ósseas, os *outliers* surgem provavelmente devido à contaminação dos ossos com sedimentos do solo, por isso estes valores foram removidos dos resultados. Nos resultados das amostras do solo, a presença de *outliers* deve-se provavelmente a variações naturais da composição do solo, uma vez que o solo é constituído por diversos tipos de óxidos. Como tal, neste caso, os *outliers* não foram removidos dos resultados.

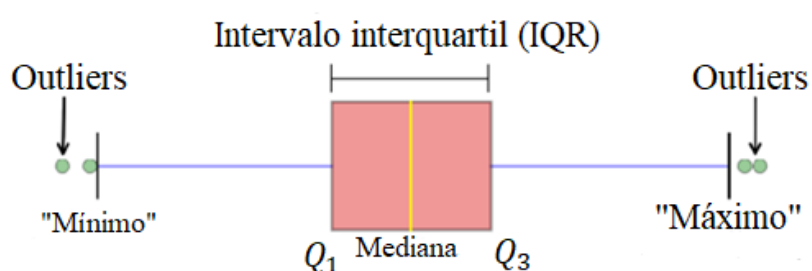


Figura 7.1: Diferentes componentes de um diagrama de caixa. Imagem adaptada da referência [103].

7.1.1 Manganês

Nas figuras 7.2 e 7.3 estão visíveis as concentrações de Mn, em $\mu\text{g/g}$, obtidas na análise dos ossos compactos pertencentes aos 8 indivíduos e das amostras de solo das 5 áreas de inumação, respetivamente.

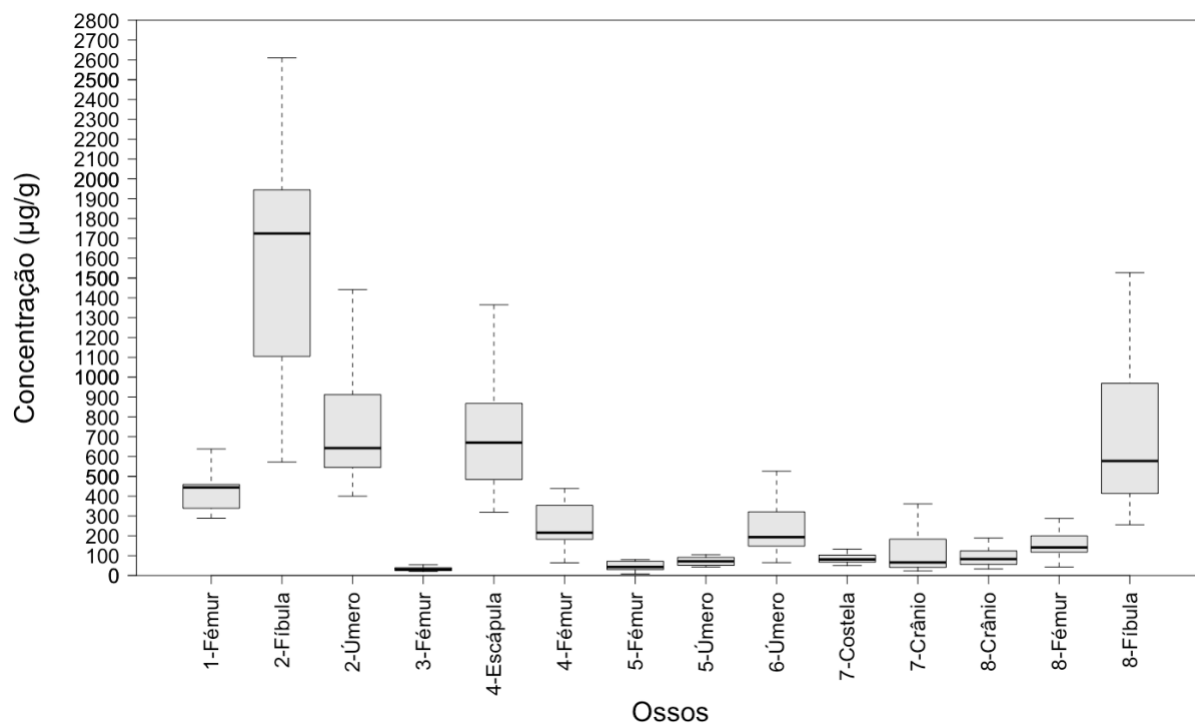


Figura 7.2: Concentrações de Mn ($\mu\text{g/g}$) nos ossos compactos dos 8 indivíduos inumados na Necrópole externa. O número que precede o nome do osso indica-nos o indivíduo a quem esse osso pertence.

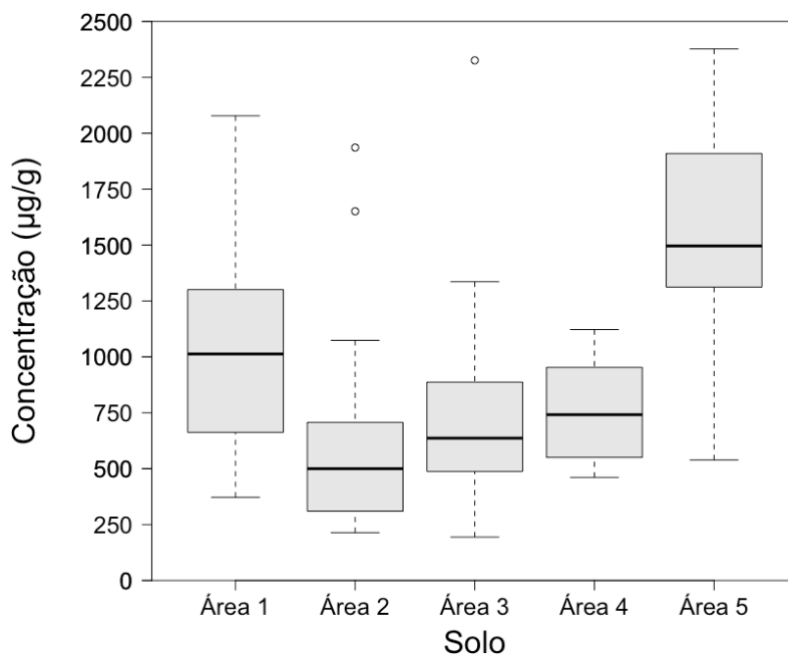


Figura 7.3: Concentrações de Mn ($\mu\text{g/g}$) nos solos das 5 áreas de inumação.

Pela análise das figuras 7.2 e 7.3 é possível observar que os solos das áreas de inumação possuem, maioritariamente, concentrações de Mn superiores às observadas nas estruturas ósseas inumadas nas respetivas áreas. Deste modo, é provável que os ossos tenham sido sujeitos a

contaminações *post-mortem* deste metal. No entanto, os ossos dos indivíduos 3 e 5 (figura 7.4) e dos indivíduos 7 e 8 (figura 7.5), possuem concentrações de Mn semelhantes às presentes na tabela 7.2 para indivíduos dos períodos pré-históricos e do período Helenístico. É assim possível que para as estruturas ósseas destes 4 indivíduos a incorporação deste metal tenha ocorrido predominantemente *in vivo*, através do consumo de vegetais. A fíbula do indivíduo 8 e os ossos dos restantes indivíduos aparentam ter sido afetados pelos efeitos da diagénese, particularmente a fíbula do indivíduo 2.

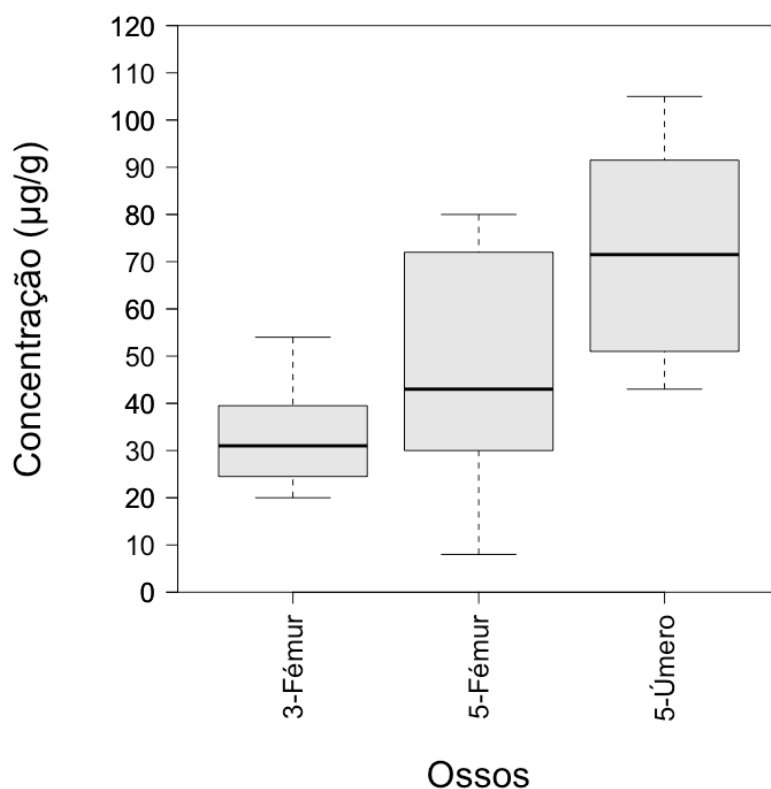


Figura 7.4: Concentrações de Mn (μg/g) no fémur do indivíduo 3 e no fémur e úmero do indivíduo 5.

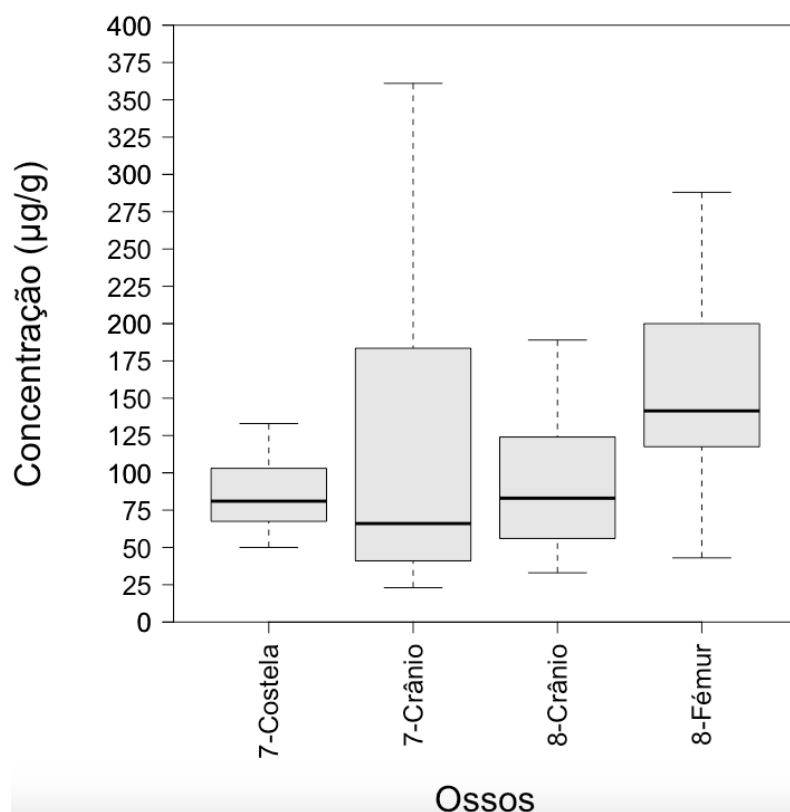


Figura 7.5: Concentrações de Mn ($\mu\text{g/g}$) na costela e crânio do indivíduo 7 e no crânio e fêmur do indivíduo 8.

7.1.2 Ferro

Nas figuras 7.6 e 7.7 estão presentes as concentrações de Fe, em $\mu\text{g/g}$, obtidas na análise dos ossos compactos dos 8 indivíduos e dos solos das 5 áreas de inumação, respetivamente.

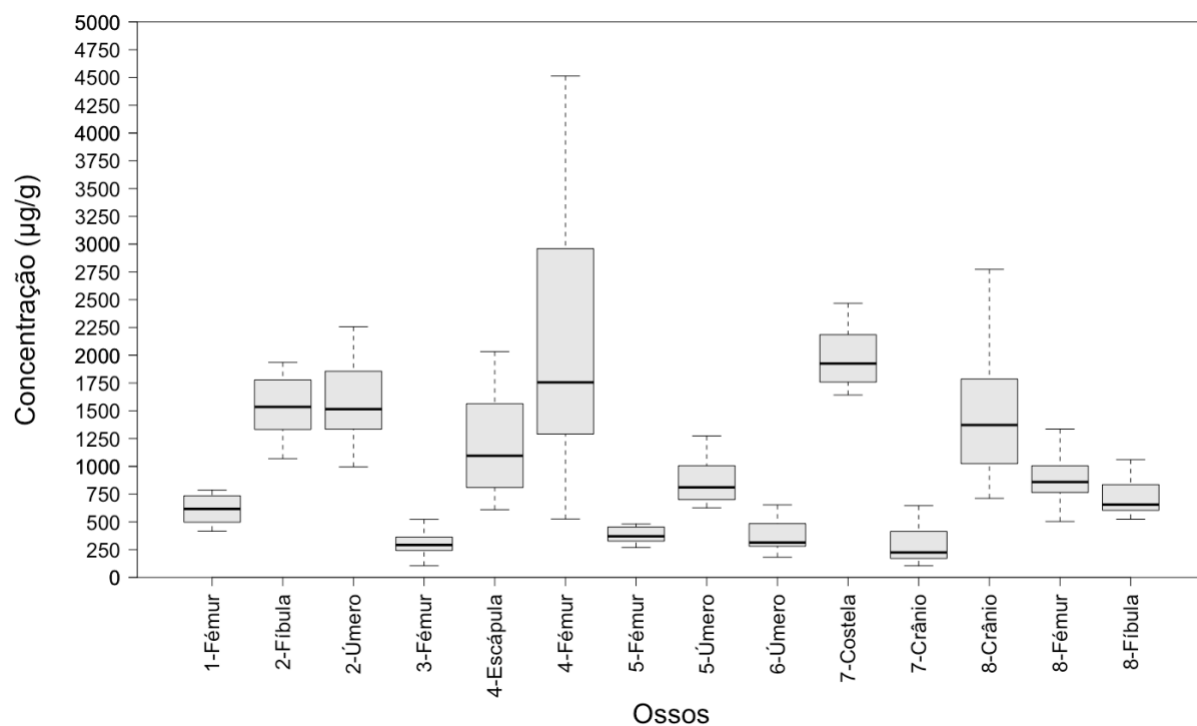


Figura 7.6: Concentrações de Fe ($\mu\text{g/g}$) nos ossos compactos dos 8 indivíduos inumados na Necrópole externa. O número que precede o nome do osso indica-nos o indivíduo a quem esse osso pertence.

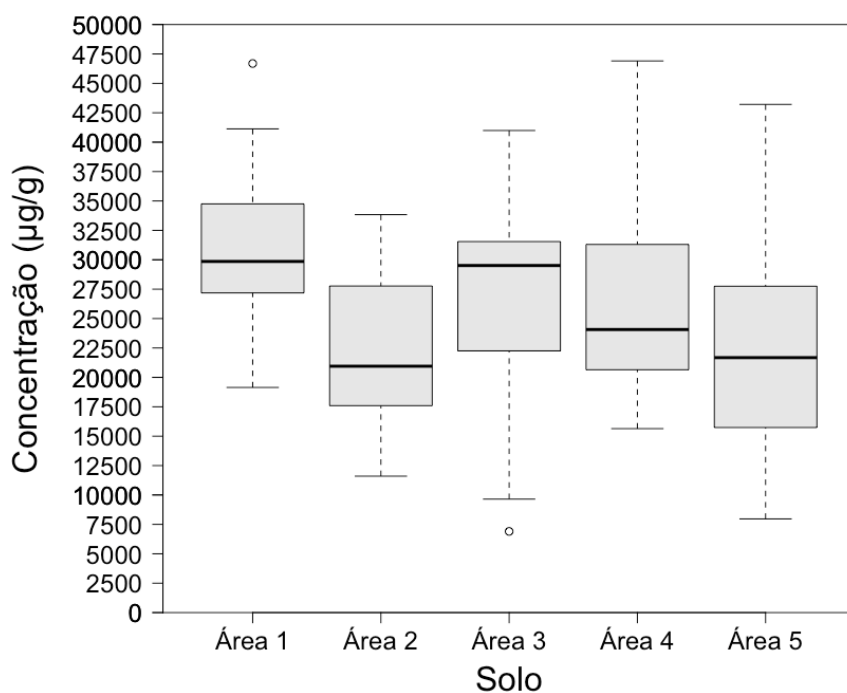


Figura 7.7: Concentrações de Fe ($\mu\text{g/g}$) nos solos das 5 áreas de inumação.

Novamente, à semelhança da situação do Mn, é possível observar nas figuras 7.6 e 7.7. que as concentrações de Fe nos solos são superiores (1 a 3 ordens de grandeza) às observadas nas estruturas

ósseas dos 8 indivíduos. Assim sendo, é provável que estas estruturas tenham sido contaminadas com este metal. Alguns ossos dos indivíduos 3, 5, 6 e 7 (figura 7.8), aparentam não terem sido contaminados, visto possuírem valores semelhantes aos observados em indivíduos modernos e dos períodos históricos. Para essas estruturas destes 4 indivíduos, este metal poderá ter sido predominantemente incorporado *ante-mortem*, através do consumo de proteína animal. Os restantes ossos terão sido sujeitos a alterações *post-mortem*, não refletindo assim as condições *in vivo* dos indivíduos.

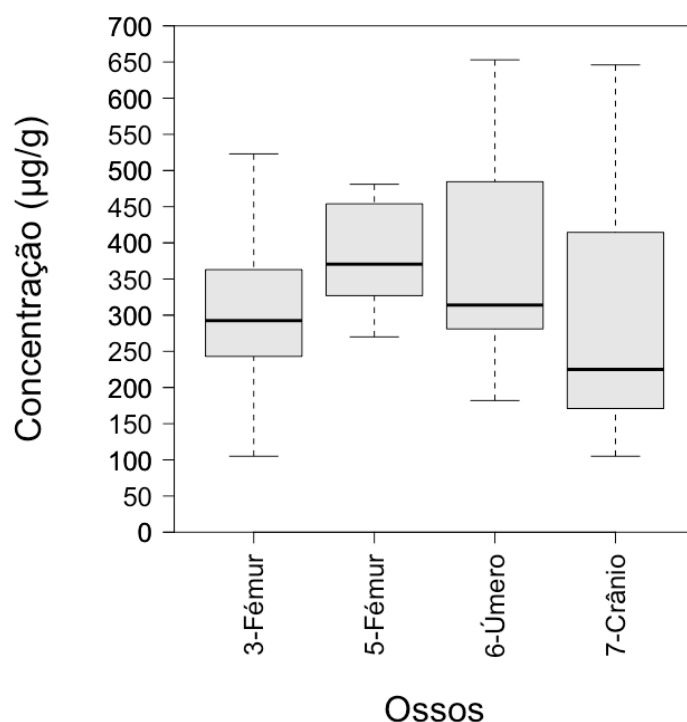


Figura 7.8: Concentrações de Fe ($\mu\text{g/g}$) nos fêmures dos indivíduos 3 e 5, no úmero do indivíduo 6 e crânio do indivíduo 7.

7.1.3 Níquel

Relativamente ao Ni, os resultados presentes na figura 7.9 demonstram que as concentrações deste metal obtidas nos ossos dos 8 indivíduos são semelhantes entre si, situando-se aproximadamente entre as 20 e 60 $\mu\text{g/g}$. Estes valores são superiores aos valores de referência presentes na tabela 7.2. Como estas concentrações de Ni são semelhantes às concentrações medidas nos solos das 5 áreas de inumação (figura 7.10), as estruturas ósseas provavelmente foram alvo de contaminação *post-mortem*. Assim sendo, este metal não é representativo das condições *ante-mortem* dos 8 indivíduos.

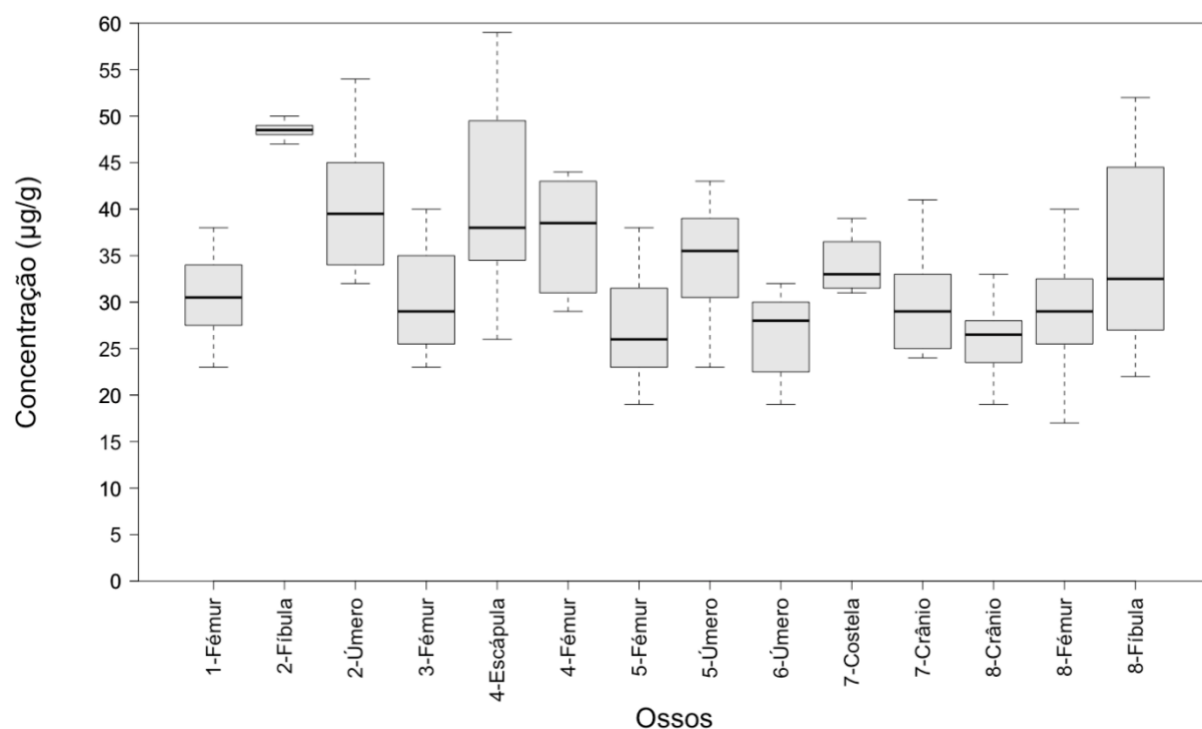


Figura 7.9: Concentrações de Ni (µg/g) nos ossos compactos dos 8 indivíduos inumados na Necrópole externa. O número que precede o nome do osso indica-nos o indivíduo a quem esse osso pertence.

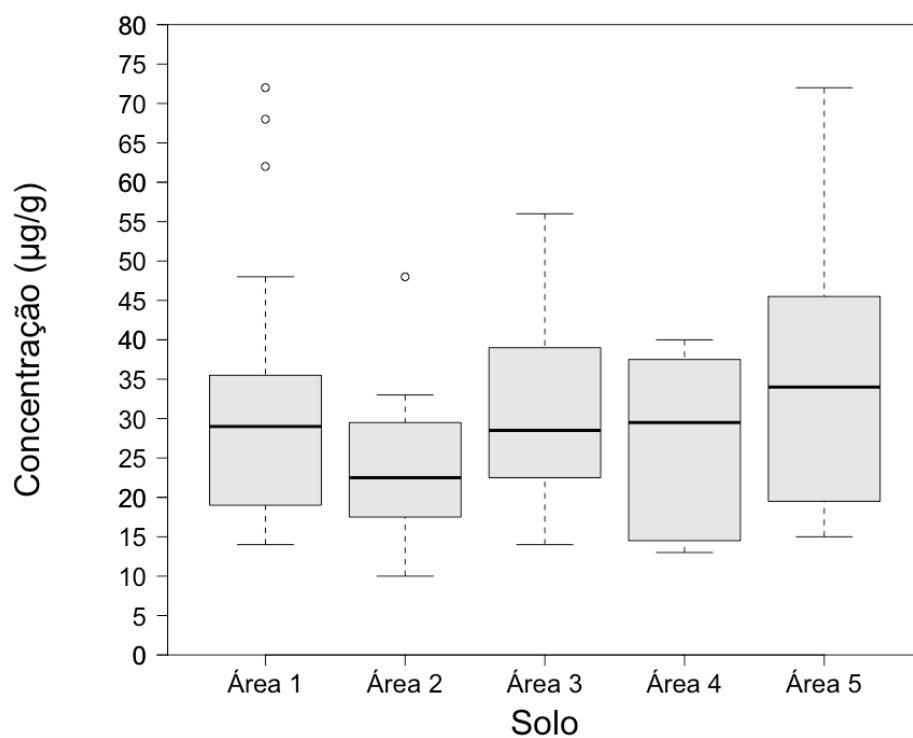


Figura 7.10: Concentrações de Ni (µg/g) nos solos das 5 áreas de inumação.

7.1.4 Cobre

Tal como é possível visualizar na figura 7.11, o perfil de concentração de Cu nos ossos dos 8 indivíduos é semelhante. Comparando com os valores de referência da tabela 7.2, verificamos que os ossos analisados nesta dissertação contêm concentrações deste metal semelhantes às observadas em indivíduos do Calcolítico, Neolítico e da Idade do Bronze Média, e superiores às presentes em indivíduos modernos e do período Helenístico. Visto que as concentrações de Cu obtidas nos solos das 5 áreas (figura 7.12) são semelhantes às medidas nas estruturas ósseas dos indivíduos, possivelmente ocorreu contaminação *post-mortem* destas estruturas. No entanto, também é possível que este metal tenha sido incorporado *in vivo* através do manuseamento de ferramentas de cozinha compostos por Cu.

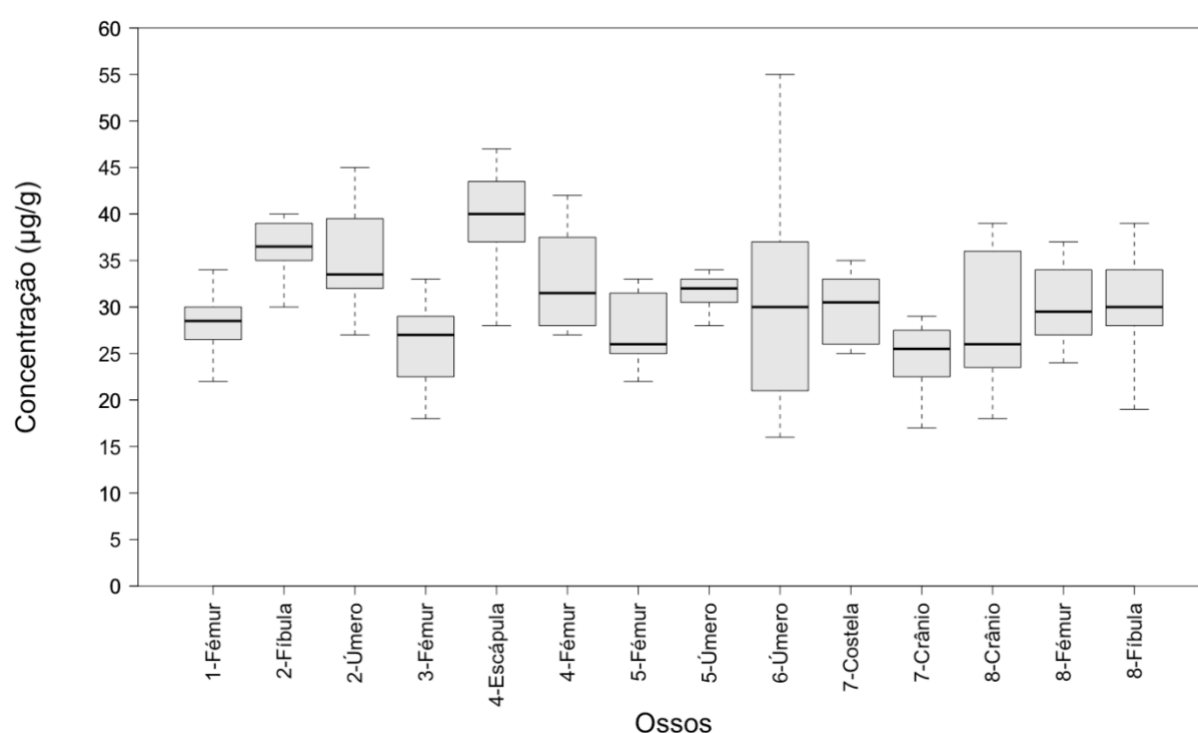


Figura 7.11: Concentrações de Cu (µg/g) nos ossos compactos dos 8 indivíduos inumados na Necrópole externa. O número que precede o nome do osso indica-nos o indivíduo a quem esse osso pertence.

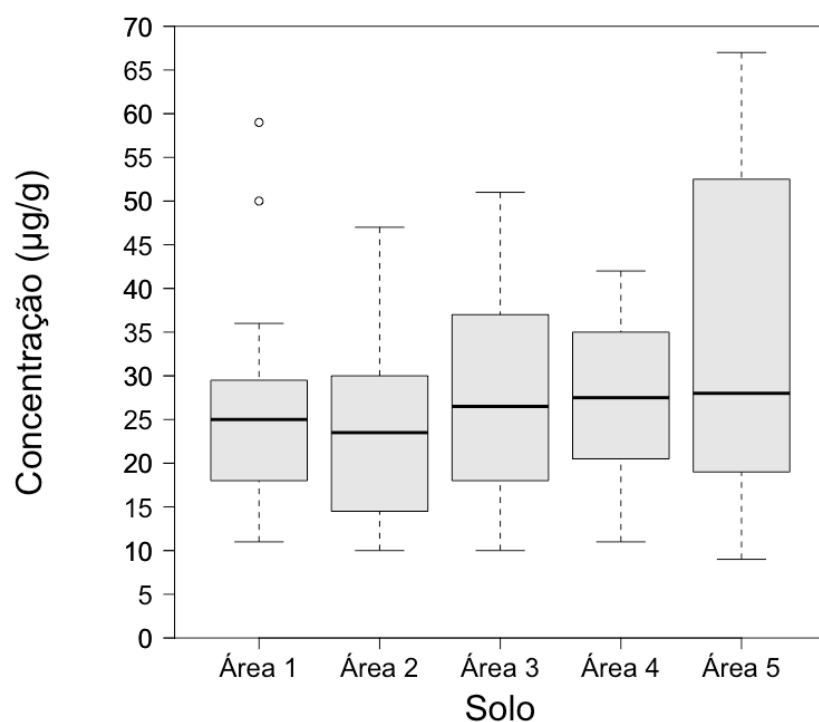


Figura 7.12: Concentrações de Cu ($\mu\text{g/g}$) nos solos das 5 áreas de inumação.

7.1.5 Zinco

No que diz respeito ao Zn, os resultados presentes na figura 7.13 demonstram que o perfil de concentrações deste elemento nos ossos dos 8 indivíduos é semelhante. Tendo em conta os valores de literatura de Zn presentes na tabela 7.2, verificamos que a gama de valores obtidos para cada osso foi, maioritariamente, inferior aos valores observados em indivíduos do século XX. Verificamos também que as concentrações de Zn nos solos analisados (figura 7.14) são inferiores aos valores observados nas estruturas ósseas dos indivíduos. Deste modo, é pouco provável que os ossos tenham sido contaminados com este elemento devido aos efeitos da diagénese. O Zn pode ser assim considerado um elemento representativo das condições *ante-mortem* dos 8 indivíduos. Os valores deste elemento nos ossos podem ser associados à dieta, nomeadamente ao consumo de proteína animal e de certos vegetais.

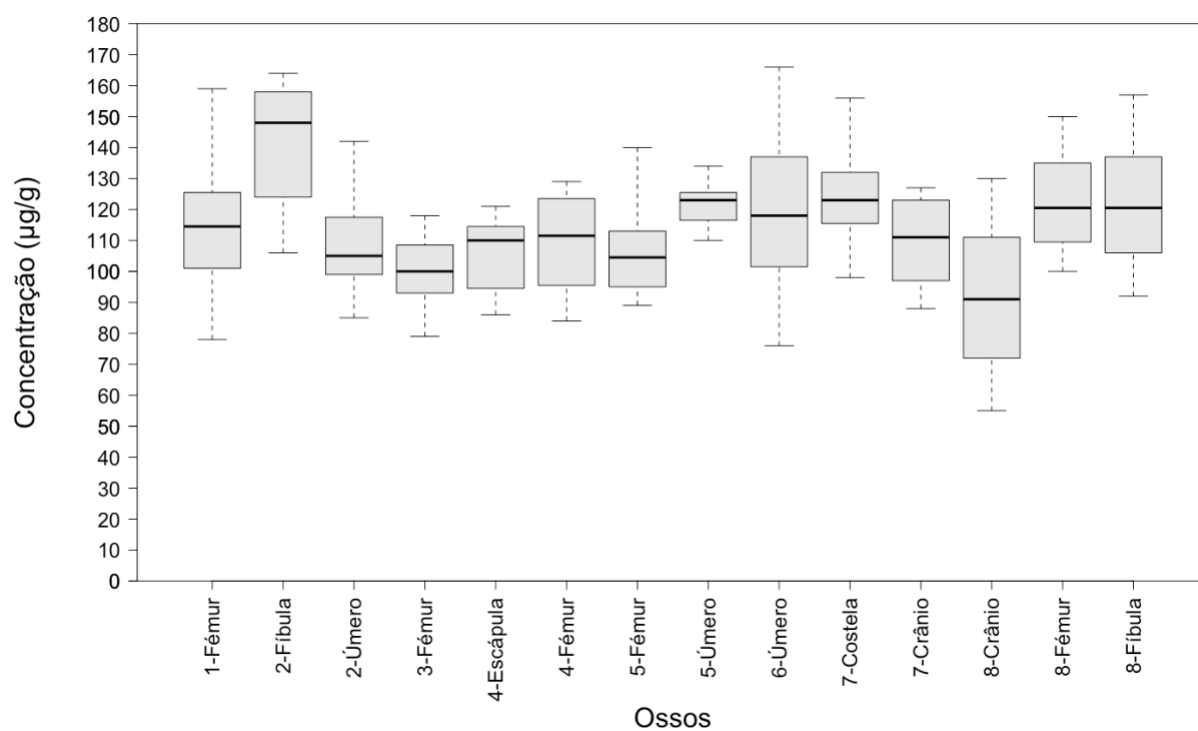


Figura 7.13: Concentrações de Zn (µg/g) nos ossos compactos dos 8 indivíduos inumados na Necrópole externa. O número que precede o nome do osso indica-nos o indivíduo a quem esse osso pertence.

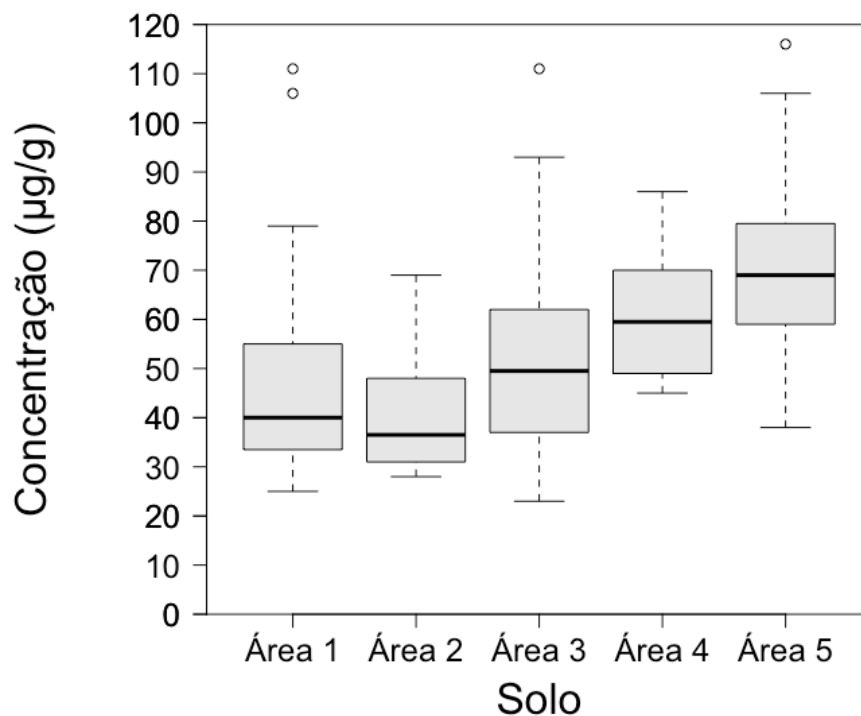


Figura 7.14: Concentrações de Zn (µg/g) nos solos das 5 áreas de inumação.

Estudos realizados sobre os elementos traço, nomeadamente o Zn e o Sr, em ossos de grupos humanos antigos e populações modernas, permitiram o estabelecimento de valores padrão. Esses valores, que consistem no rácio entre a concentração média do elemento estudado (em $\mu\text{g/g}$) e o cálcio (em mg/g), são reconhecidos como válidos por muitos autores [102, 104, 105], e permitem determinar a dieta dominante de um indivíduo ou população. Nestes estudos é assumido que, se ocorreu diagénese, esta afetou de igual forma a matriz de cálcio e os elementos traço [102]. Os parâmetros de referência para o rácio Zn/Ca estão presentes na tabela 7.3. Os resultados obtidos para os 8 indivíduos presentes na tabela 7.4, demonstram que a maioria dos indivíduos possuía uma dieta pobre em alimentos ricos em Zn, como as carnes vermelhas, nozes, ostras e alguns crustáceos.

Valores em $\mu\text{g/mg}$	Dieta
> 0,60	Rica em proteína
0,60 – 0,35	Moderada em proteína
< 0,35	Pobre em proteína

Tabela 7.3: Parâmetros de referência para o rácio Zn/Ca. Tabela adaptada da referência [104].

Indivíduo	Rácio	Dieta
1	0,34	Pobre em proteína
2	0,37	Moderada em proteína
3	0,29	Pobre em proteína
4	0,32	Pobre em proteína
5	0,33	Pobre em proteína
6	0,34	Pobre em proteína
7	0,34	Pobre em proteína
8	0,33	Pobre em proteína

Tabela 7.4: Resultados do rácio Zn/Ca para as 8 indivíduos e classificação da sua dieta.

7.1.6 Arsénio

Tal como é possível visualizar na figura 7.15, o As só é detetado em algumas estruturas ósseas dos 8 indivíduos. Mesmo nestas estruturas, este metal não é detetado em todas as pastilhas analisadas. As concentrações medidas deste metal nos ossos são semelhantes aos valores observados em indivíduos do século XX na tabela 7.2. Visto que os solos das 5 áreas de inumação contêm concentrações superiores de As relativamente aos ossos analisados (figura 7.16), provavelmente ocorreu contaminação *post-mortem* destas estruturas com este metal.

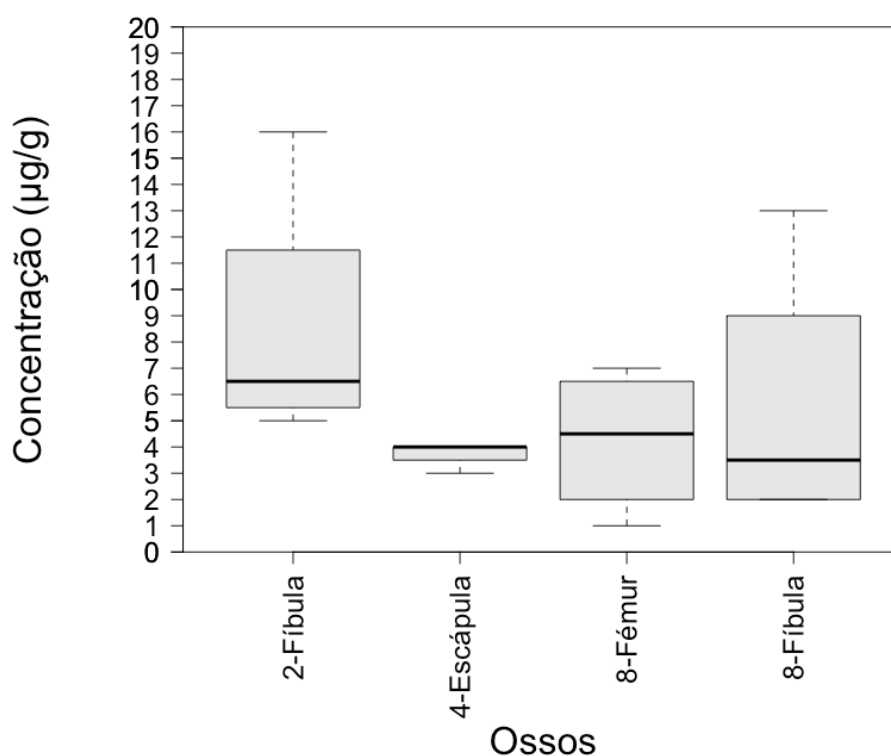


Figura 7.15: Concentrações de As ($\mu\text{g/g}$) nos ossos compactos dos indivíduos inumados na Necrópole externa. O número que precede o nome do osso indica-nos o indivíduo a quem esse osso pertence.

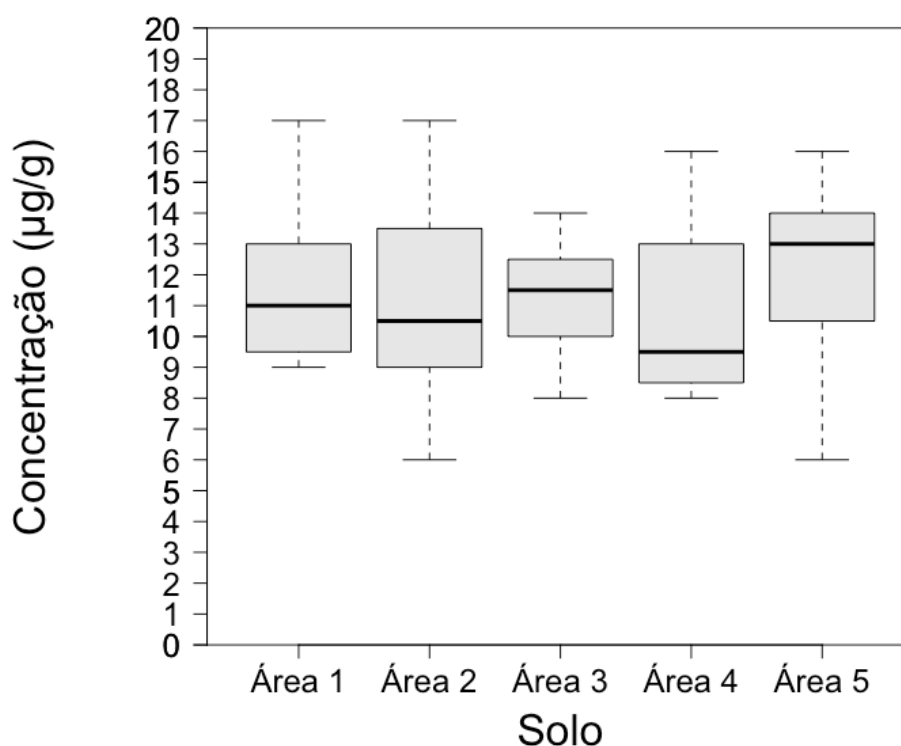


Figura 7.16: Concentrações de As ($\mu\text{g/g}$) nos solos das 5 áreas de inumação.

7.1.7 Bromo

Relativamente ao Br, os resultados presentes na figura 7.17 demonstram que as estruturas ósseas possuem concentrações variáveis deste halogéneo. No entanto, em todos os ossos os níveis deste elemento são superiores aos observados em indivíduos do século XX (tabela 7.2). Como as concentrações de Br nos ossos dos indivíduos são superiores às medidas no respetivo solo do local de sepultamento (figura 7.18), não terá ocorrido contaminação *post-mortem* significativa destas estruturas. Deste modo, este elemento terá sido incorporado *in vivo* nos ossos dos 8 indivíduos, através de uma dieta rica em alimentos marinhos ou em plantas e animais que habitassem em zonas costeiras.

Assim sendo dada a proximidade do Túmulo Megalítico de Santa Rita com o oceano Atlântico (menos de 4 km), é provável que estas populações obtivessem do mar grande parte dos seus recursos necessários à sua subsistência. É relevante realçar o facto de as concentrações obtidas de Br na maioria das amostras ósseas analisadas serem semelhantes aos valores presentes em indivíduos do período Calcolítico e do Neolítico (tabela 7.2), que também habitavam em zonas costeiras.

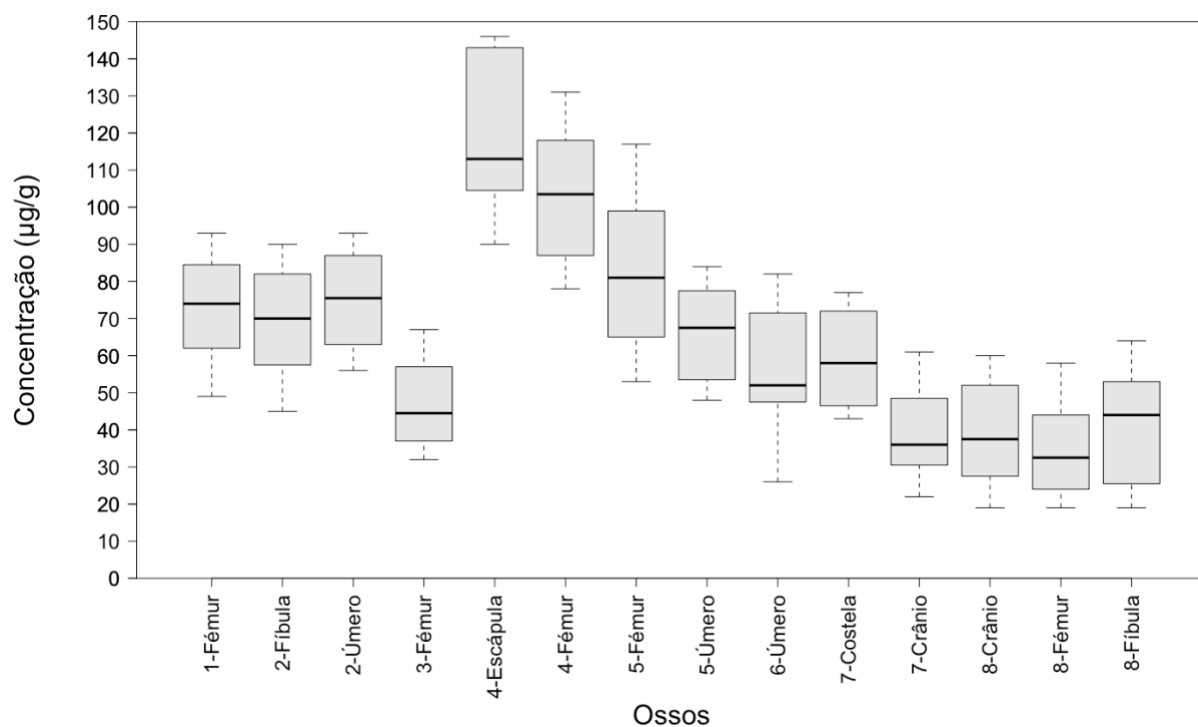


Figura 7.17: Concentrações de Br ($\mu\text{g/g}$) nos ossos compactos dos 8 indivíduos inumados na Necrópole externa. O número que precede o nome do osso indica-nos o indivíduo a quem esse osso pertence.

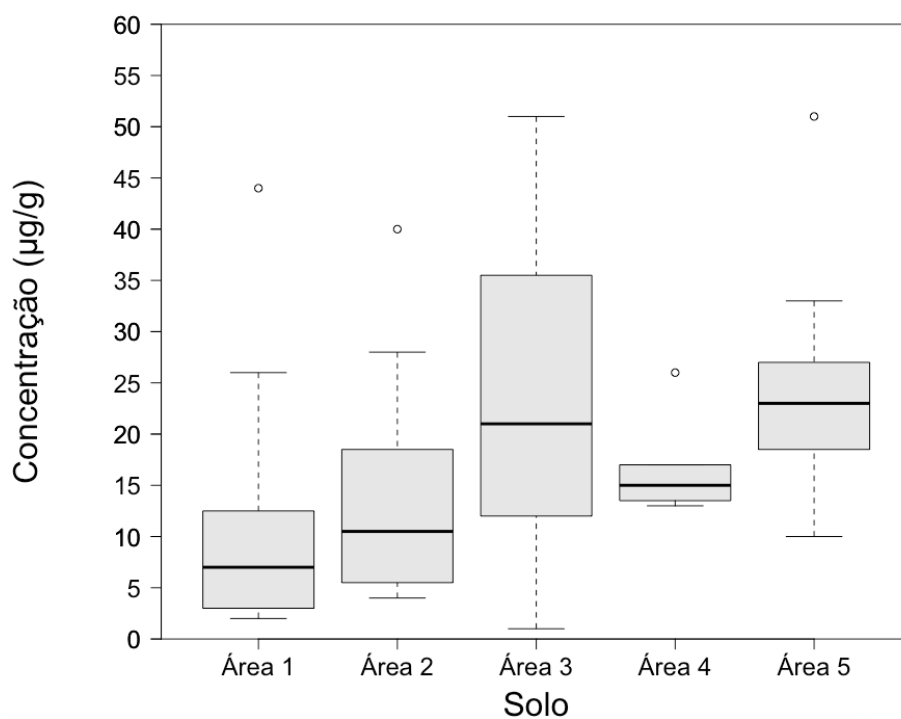


Figura 7.18: Concentrações de Br ($\mu\text{g/g}$) nos solos das 5 áreas de inumação.

7.1.8 Estrôncio

Os resultados presentes na figura 7.19 demonstram que podemos dividir os 8 indivíduos em 2 grupos com base nas concentrações de Sr obtidas nos respectivos ossos: o grupo 1, que é constituído pelos indivíduos 1, 2, 3, 4, 5, e 7, contém concentrações de Sr mais elevadas, sensivelmente entre as 90 e 200 $\mu\text{g/g}$. O grupo 2, que é constituído pelos indivíduos 6 e 8, contém concentrações inferiores deste elemento, maioritariamente entre as 40 e 90 $\mu\text{g/g}$.

Relativamente ao grupo 1, verifica-se que as concentrações de Sr nas estruturas ósseas são similares aos valores de literatura da tabela 7.2 em indivíduos modernos e do período Calcolítico, e superiores às presentes nos solos das áreas de inumação (figura 7.20). Deste modo, este elemento não terá sido afetado pelos efeitos da diagénese, e terá sido incorporado *in vivo*, através do consumo de vegetais.

Os indivíduos do grupo 2, ou seja, os indivíduos 6 e 8, contém concentrações de Sr inferiores às observadas nos valores de literatura (tabela 7.2). Os solos de todas as áreas de inumação também contém concentrações superiores deste elemento relativamente às estruturas ósseas destes 2 indivíduos. No entanto, visto que as concentrações de Sr nos ossos dos indivíduos 6 e 8 apresentam valores particularmente reduzidos, não terá ocorrido contaminação *post-mortem* destas estruturas com este elemento. O Sr é assim representativo das condições *ante-mortem* destes indivíduos.

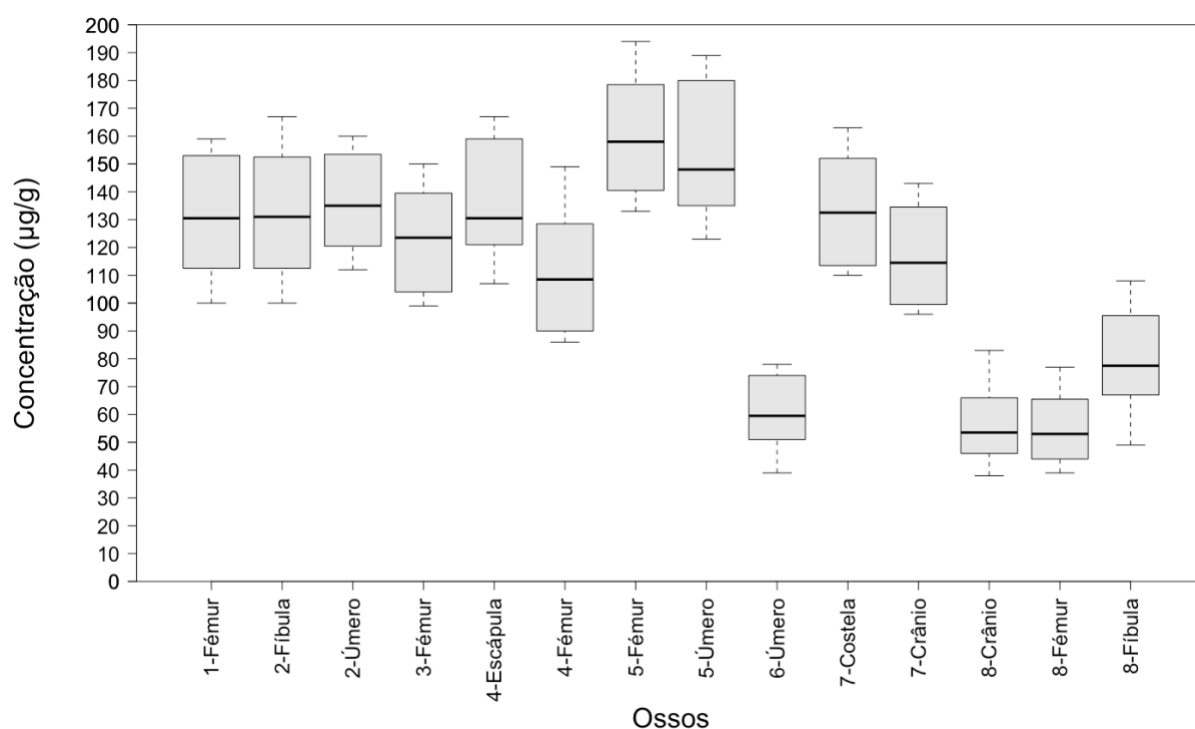


Figura 7.19: Concentrações de Sr ($\mu\text{g/g}$) nos ossos compactos dos 8 indivíduos inumados na Necrópole externa. O número que precede o nome do osso indica-nos o indivíduo a quem esse osso pertence.

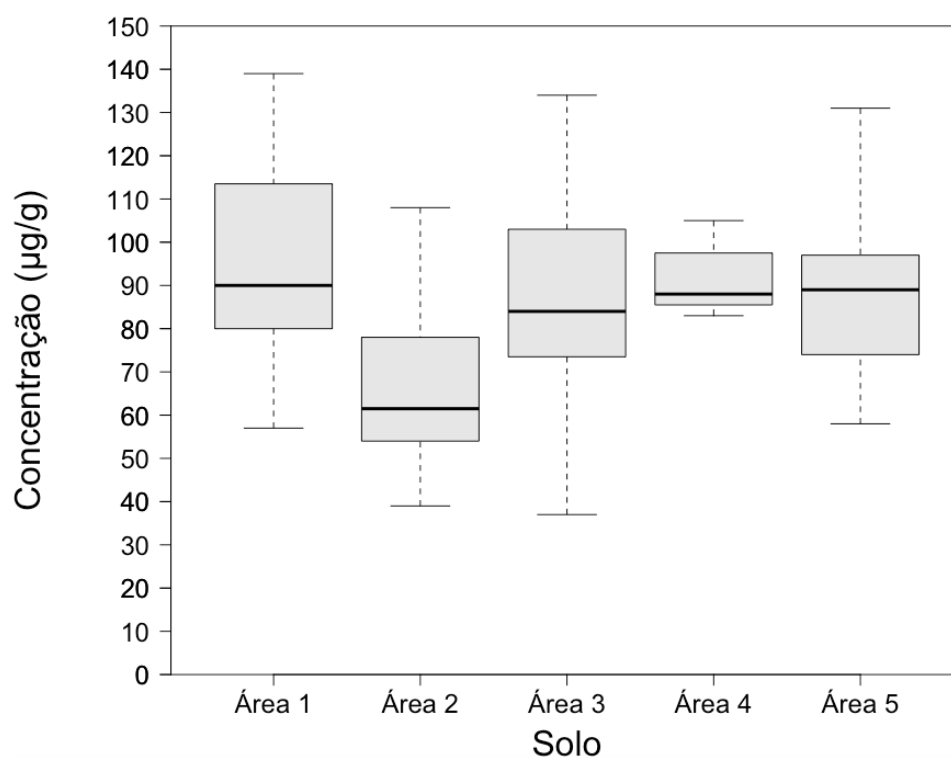


Figura 7.20: Concentrações de Sr ($\mu\text{g/g}$) nos solos das 5 áreas de inumação.

À semelhança do Zn, também estão estabelecidos valores padrão para o rácio Sr/Ca (tabela 7.5), pelo que é assim possível determinar a abundância de vegetais consumidos por estes indivíduos. Os resultados presentes na tabela 7.6 demonstram que a maioria dos 8 indivíduos possuía uma dieta pobre em vegetais, principalmente os indivíduos do grupo 2.

Valores em $\mu\text{g/mg}$	Dieta
$> 0,57$	Rica em vegetais
$0,57 - 0,40$	Moderada em vegetais
$< 0,40$	Pobre em vegetais

Tabela 7.5: Parâmetros de referência para o rácio Sr/Ca. Tabela adaptada da referência [104].

Indivíduo	Rácio	Dieta
1	0,39	Pobre em vegetais
2	0,40	Moderada em vegetais
3	0,36	Pobre em vegetais
4	0,36	Pobre em vegetais
5	0,46	Moderada em vegetais
6	0,18	Pobre em vegetais
7	0,36	Pobre em vegetais
8	0,19	Pobre em vegetais

Tabela 7.6: Resultados do rácio Sr/Ca para as 8 indivíduos e classificação da sua dieta.

7.1.9 Mercúrio

O Hg, nos ossos compactos, só é detetado no indivíduo 8 (figura 7.21). Tendo em conta que o solo em que este indivíduo foi sepultado (Área 5) contém concentrações semelhantes deste metal (figura 7.22), este elemento provavelmente terá sido incorporado *post-mortem*. Foi detetada também a presença deste elemento nas estruturas ósseas mais esponjosas dos indivíduos 4 e 7 (figura 7.23), que estão inumados nas únicas áreas que contêm Hg, o que reforça a premissa de que os indivíduos inumados nestas áreas foram contaminados com este metal. Tendo em conta que a concentração mediana deste elemento em solos de Portugal Continental é de 0,05 µg/g [106], e a mediana medida nos solos das área de inumação 3 e 5 foi entre 10-20 µg/g, é provável que este elemento tenha sido introduzido no solo pela ação do homem. Assim sendo, a contaminação do solo com este elemento tem origem provavelmente no uso de cinábrio durante os rituais funerários dos indivíduos 4, 7 e 8.

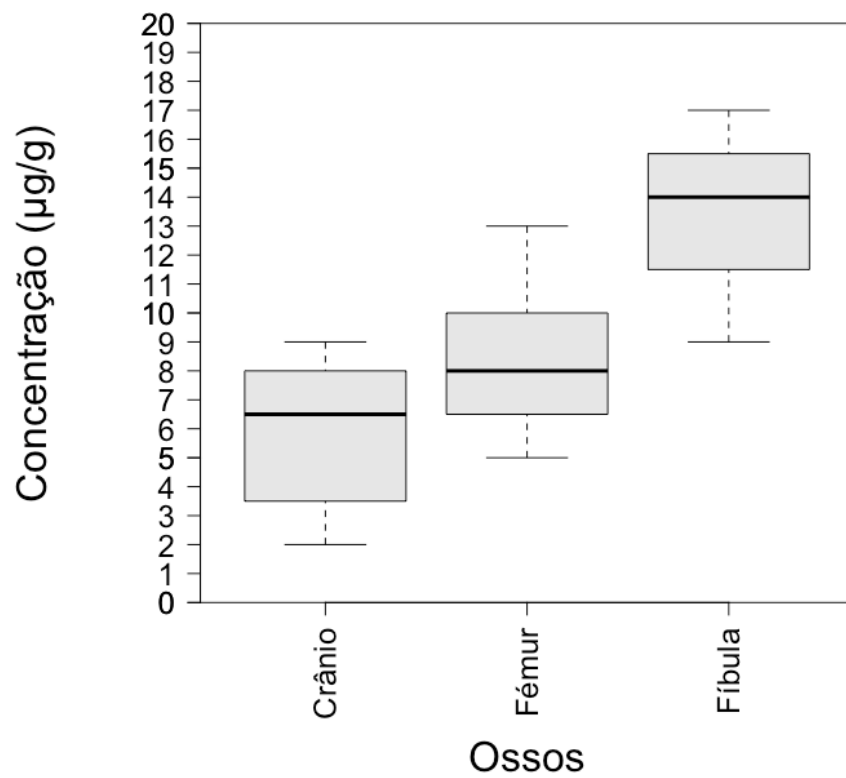


Figura 7.21: Concentrações de Hg (µg/g) nos ossos compactos do indivíduo 8.

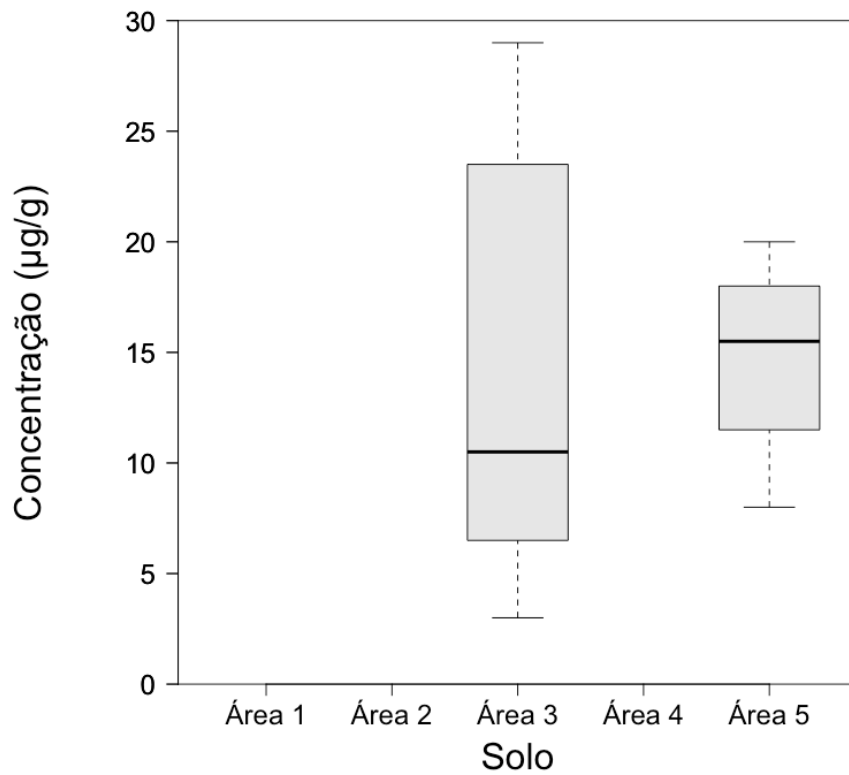


Figura 7.22: Concentrações de Hg (µg/g) nos solos das 5 áreas de inumação.

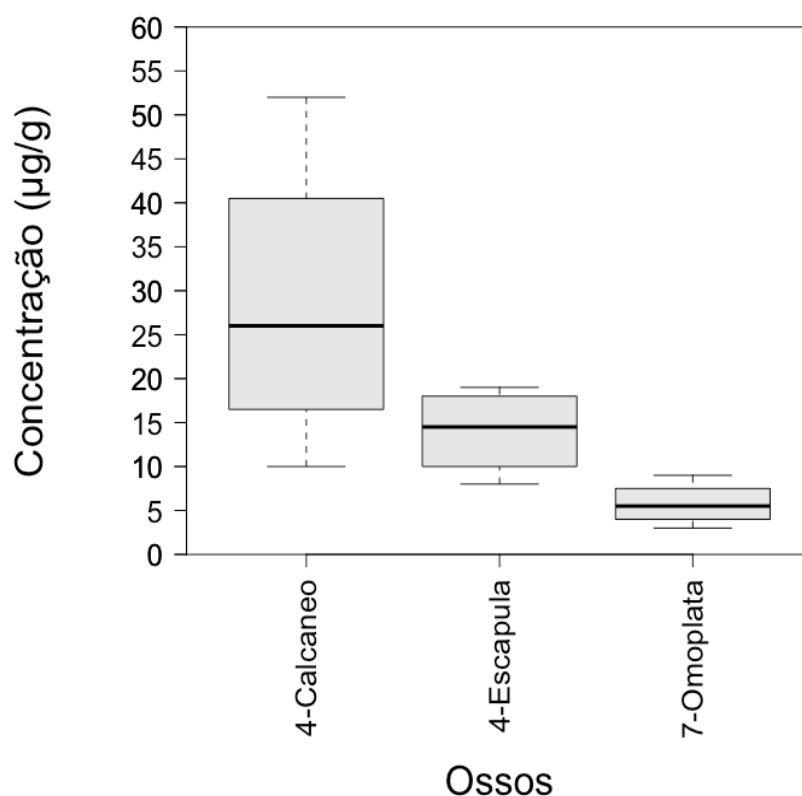


Figura 7.23: Concentrações de Hg (µg/g) nos ossos esponjosos dos indivíduos 4 e 7. O número que precede o nome do osso indica-nos o indivíduo a quem esse osso pertence.

7.2 Mapeamento da fatia

Na figura 7.24 está presente uma fotografia da secção transversal da ulna do indivíduo 7 obtida recorrendo à camara posicionada no interior do espectrómetro M4 Tornado. Nesta figura está delimitada a verde a área que foi analisada. Na figura 7.25 estão presentes as distribuições dos elementos P, Ca, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Br e Sr, ao longo da superfície da mesma amostra.

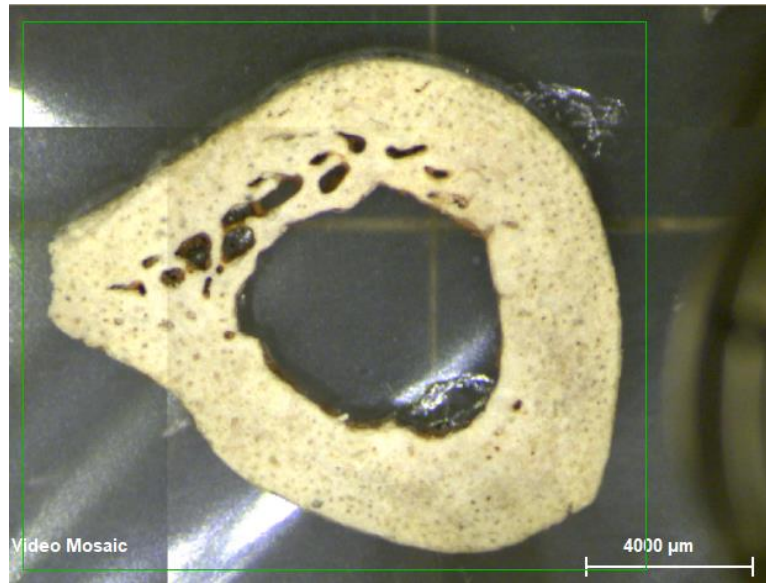
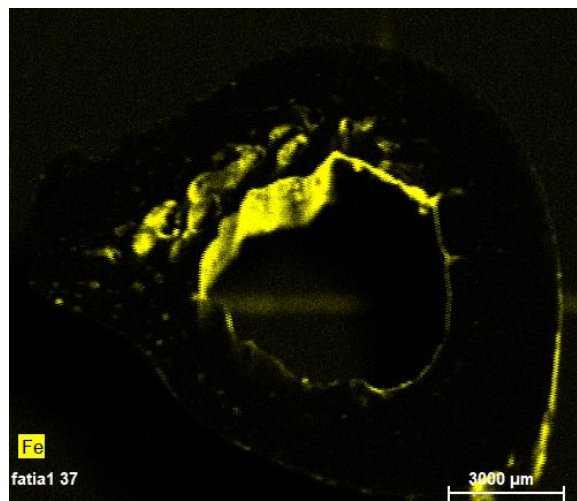
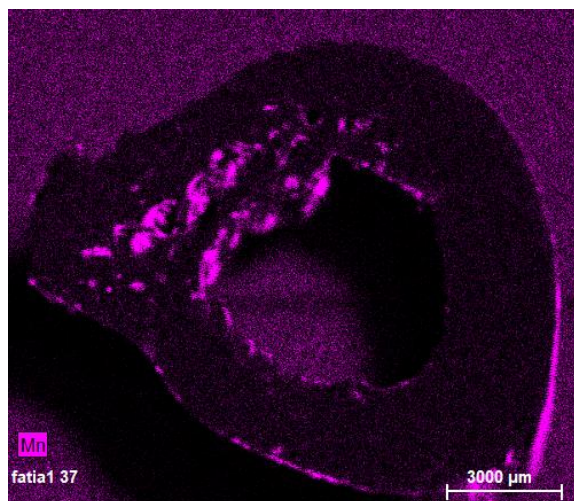
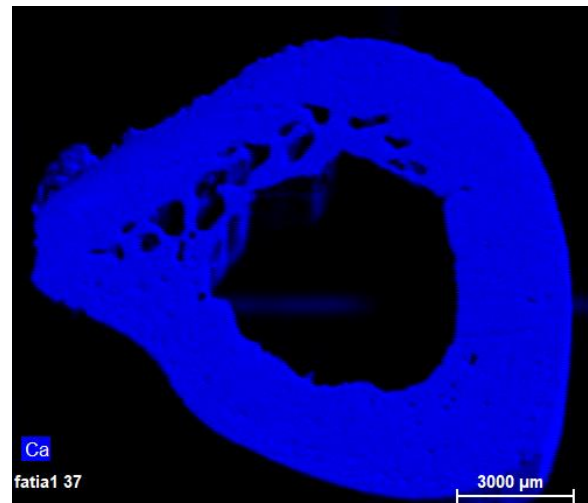
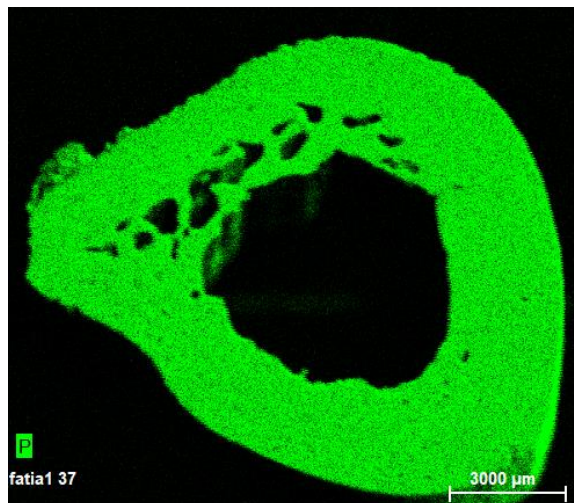


Figura 7.24: Fotografia da secção transversal da ulna do indivíduo 7 obtida no interior do espectrómetro M4 Tornado e delimitação (contorno verde) da área analisada.



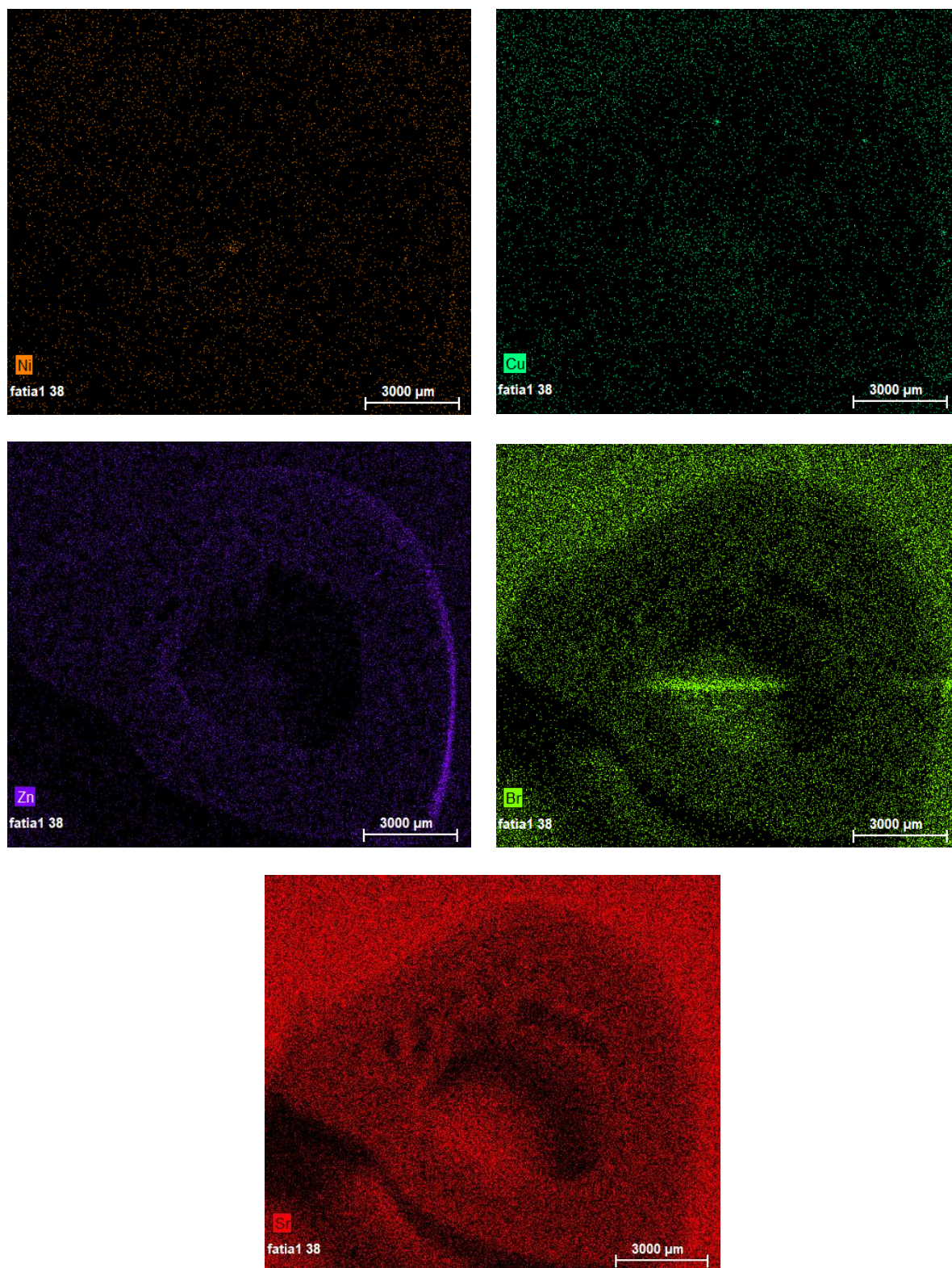


Figura 7.25: Mapeamento do P, Ca, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Br, e Sr, ao longo da secção transversal da ulna do indivíduo 7, recorrendo ao espectrómetro M4 Tornado.

Na figura 7.25 é possível observar que os elementos P e Ca têm uma distribuição uniforme ao longo da secção transversal do osso. Visto que estes elementos são os principais constituintes da

hidroxiapatite, estes resultados já eram expectáveis. Relativamente ao Mn e ao Fe, verifica-se que estes metais estão mais abundantes na região porosa da amostra, e no anel interior (endóstio) e exterior (perióstio). Como estas regiões são mais suscetíveis a contaminações do solo, confirma-se que estes elementos foram incorporados *post-mortem*. Os resultados obtidos para o Ni e o Cu foram inconclusivos, uma vez que a sua reduzida presença na amostra não permite distinguir o sinal emitido pela amostra e pelo *background*. Para o Zn, verifica-se que este elemento está enriquecido no perióstio da amostra, mas não no endóstio ou na região mais porosa. Este resultado sugere que ocorreu contaminação *post-mortem*, mas que não teve origem no solo. É possível que durante a inumação do indivíduo 7, a ulna tenha estado em contacto com algum material rico em zinco. Os outros elementos indicadores de uma dieta alimentar, o Br e o Sr, apresentam uma distribuição uniforme ao longo da superfície da amostra, o que confirma que estes 2 elementos foram predominantemente incorporados *in vivo*.

7.3 Discussão: Metais pesados

Os 8 indivíduos inumados na necrópole externa do Túmulo Megalítico de Santa Rita, apesar de pertencerem a um largo espectro temporal, teriam todos uma exposição *in vivo* reduzida aos metais pesados não essenciais Pb, Cd, As, e Hg. O Pb e o Cd não foram detetados nas estruturas ósseas, pelo que estariam presentes em concentrações inferiores ao limite de deteção do espectrómetro (inferior a 1 µg/g para o Pb). O As foi detetado em algumas estruturas ósseas, no entanto este elemento terá sido incorporado *post-mortem* devido à presença deste metal no solo em quantidades similares. Relativamente ao Hg, este metal foi detetado em concentrações elevadas nos solos das áreas de inumação 3 e 5, o que resultou na contaminação de alguns ossos dos indivíduos inumados nestas áreas (indivíduos 4, 7, e 8). As concentrações elevadas de Hg nestes solos devem-se provavelmente ao uso de cinábrio durante os rituais funerários dos indivíduos 4, 7, e 8. Durante os trabalhos arqueológicos no túmulo Megalítico de Santa Rita, este minério já tinha sido identificado no interior da câmara funerária [107]. Estes resultados demonstram que existe a possibilidade de o uso deste minério em contextos funerários no túmulo Megalítico de Santa Rita se estender para além do III Milénio A.N.E. No sul da península Ibérica existem diversas evidências do uso deste minério em contextos funerários durante os IV e III Milénios A.N.E. Este minério seria utilizado sob a forma de pigmento como oferta ou mesmo conservante em práticas de sepultamento. Visto ser um minério raro e valioso, o seu uso na antiguidade também pode ser associado a uma exibição de riqueza e poder de uma família [107]. É possível que as populações contemporâneas aos indivíduos 4, 7, e 8, também atribuíssem o mesmo simbolismo a este minério.

Relativamente aos metais pesados essenciais ao organismo humano, Fe, Mn, Ni, e Cu, verificou-se que foram, na sua maioria, incorporados nas estruturas ósseas dos 8 indivíduos *post-mortem*. Os resultados obtidos nas pastilhas revelaram que a maioria dos ossos foram contaminados com Fe e Mn, devido à presença de elevadas concentrações destes dois metais nos solos. A análise da secção transversal da ulna do indivíduo 7 também confirmou o solo como fonte de contaminação destes 2 metais, visto que estes acumulavam-se preferencialmente nas zonas mais porosas e expostas dos ossos (endóstee e perióstee). O Ni também terá sido introduzido como contaminante pelo solo do local de sepultamento. Os resultados obtidos para o Cu foram mais inconclusivos. As concentrações deste metal medidas nas estruturas ósseas dos 8 indivíduos foram semelhantes às observadas em estudos com populações de períodos pré-históricos, nomeadamente do Neolítico [99], Calcolítico [101], e Idade do Bronze Média [102], o que sugere que a exposição *in vivo* destes 8 indivíduos a este metal seria semelhante à vivenciada por essas populações. Tendo em conta que os resultados das datações realizadas sobre 5 dos 8 indivíduos delimitaram um largo espectro temporal que vai desde a Idade do Bronze até ao período Romano, é provável que muitos objetos do seu quotidiano fossem constituídos por este metal, como as armas, objetos decorativos e domésticos [45]. É assim possível que a incorporação deste metal nos ossos dos 8 indivíduos tenha ocorrido *in vivo*, através do uso de ferramentas de culinária feitas de Cu. No entanto, como foram medidas concentrações de Cu similares nos solos e nos ossos, é possível que tenha ocorrido contaminação *post-mortem* das estruturas ósseas.

7.4 Discussão: Dieta alimentar

Os elementos indicadores da dieta alimentar de um indivíduo, o Sr e o Zn, não foram afetados pelos efeitos da diagénese nos ossos compactos dos 8 indivíduos. Assim sendo, e à semelhança dos resultados obtidos noutros estudos com estes elementos [15, 102], comprovou-se que o Sr e o Zn são menos suscetíveis a alterações *post-mortem*. Os resultados obtidos para o Br, que é considerado por alguns autores um elemento indicador de uma dieta marítima [58, 101], também demonstraram que este elemento permaneceu inalterado nos ossos destes indivíduos. Visto que existem pouco estudos sobre a presença deste halogéneo nos ossos, este trabalho permitiu fornecer mais dados sobre este elemento. Relativamente à dieta alimentar dos 8 indivíduos, os baixos níveis de Sr nos ossos sugerem que a grande maioria teria uma dieta pobre em vegetais, particularmente os indivíduos 6 e 8. As concentrações reduzidas de Zn na grande maioria dos indivíduos indicam que estes teriam hábitos alimentares pobres em carnes vermelhas, ostras e alguns crustáceos. Os níveis elevados de Br encontrados em todos os indivíduos, particularmente no indivíduo 4, sugerem hábitos alimentares ricos em alimentos marinhos. A proximidade do Túmulo Megalítico com o oceano Atlântico (menos de 4 km) corrobora as elevadas concentrações de Br nos ossos. Tendo em conta que foram medidos baixos níveis de Zn nos ossos, é

provável que a dieta marítima dos 8 indivíduos fosse maioritariamente constituída por peixes de água salgada, que são dos alimentos de origem animal mais pobres neste mineral [51, 52, 108], e por outros alimentos marinhos relativamente pobres em Zn, como os camarões [52]. Apesar de existirem poucos estudos sobre o conteúdo de Sr em alimentos marinhos, os peixes aparentam ser fontes mais pobres deste elemento quando comparados com os moluscos e crustáceos [52], o que reforça a premissa de que os 8 indivíduos consumiriam predominantemente peixe.

De seguida, são comparados os rácios Zn/Ca e Sr/Ca obtidos para os indivíduos analisados neste trabalho, com os resultados obtidos pela M. Carvalho [27], na análise de ossos compactos de indivíduos que viveram nos séculos XVIII e XIX também em zonas costeiras de Portugal, recorrendo ao mesmo espectrómetro (M4 Tornado). Os ossos destes indivíduos (Indivíduos #4, #6, #10, #17, e #31) foram exumados na Ermida do Espírito Santo, localizada na cidade de Almada. Os resultados obtidos para os rácios nos 2 estudos, e a classificação das dietas alimentares dos indivíduos conforme os valores de referência das tabelas 7.3 e 7.5, estão presentes na tabela 7.7, para o rácio Zn/Ca, e na tabela 7.8, para o rácio Sr/Ca.

	Indivíduo	Rácio (Zn/Ca)	Dieta
Túmulo Megalítico de Santa Rita (II e I Milénios A.N.E.)	1	0,34	Pobre em proteína
	2	0,37	Moderada em proteína
	3	0,29	Pobre em proteína
	4	0,32	Pobre em proteína
	5	0,33	Pobre em proteína
	6	0,34	Pobre em proteína
	7	0,34	Pobre em proteína
	8	0,33	Pobre em proteína
Ermida do Espírito Santo (Séculos XVIII e XIX)	#4	0,67	Rica em proteína
	#6	0,8	Rica em proteína
	#10	1,02	Rica em proteína
	#17	3,33	Rica em proteína
	#31	3,79	Rica em proteína

Tabela 7.7: Resultados do rácio Zn/Ca para os 8 indivíduos do Túmulo Megalítico de Santa Rita e para os indivíduos #4, #6, #10, #17, e #31, da Ermida do Espírito Santo, e classificação da sua dieta.

	Indivíduo	Rácio (Sr/Ca)	Dieta
Túmulo Megalítico de Santa Rita (II e I Milénios A.N.E.)	1	0,39	Pobre em vegetais
	2	0,40	Moderada em vegetais
	3	0,36	Pobre em vegetais
	4	0,36	Pobre em vegetais
	5	0,46	Moderada em vegetais
	6	0,18	Pobre em vegetais
	7	0,36	Pobre em vegetais
	8	0,19	Pobre em vegetais
Ermida do Espírito Santo (Séculos XVIII e XIX)	#4	0,72	Rica em vegetais
	#6	0,63	Rica em vegetais
	#10	1,1	Rica em vegetais
	#17	0,7	Rica em vegetais
	#31	0,82	Rica em vegetais

Tabela 7.8: Resultados do rácio Sr/Ca para os 8 indivíduos do Túmulo Megalítico de Santa Rita e para os indivíduos #4, #6, #10, #17, e #31, da Ermida do Espírito Santo, e classificação da sua dieta.

Os resultados presentes nas tabelas 7.7 e 7.8 demonstram que o consumo de vegetais e carnes seria superior nos indivíduos dos séculos XVIII e XIX que viviam na região de Almada. Estes resultados podem ser explicados pelo facto de nos séculos XVIII e XIX terem ocorrido grandes avanços na agricultura, como resultado do crescimento industrial, o que levou a uma maior produção de bens agrícolas, originando uma remodelação alimentar da população portuguesa [109]. Em particular, Almada no século XVIII seria uma vila rodeada por propriedades agrícolas, ao longo do século XIX esta zona foi-se tornando gradualmente mais industrializada. Durante estes 2 séculos a agricultura seria assim uma das principais atividades praticadas pela população local [110]. Deste modo, estas populações tinham acesso a mais vegetais e a produtos de origem animal, o que explicaria os níveis superiores dos rácios de Sr/Ca e Zn/Ca medidos nestes indivíduos.

Para além da agricultura, a pesca também seria uma das principais atividades praticadas na região de Almada durante os séculos XVIII e XIX, dada a proximidade desta zona com o rio Tejo e o Oceano Atlântico [110]. Num estudo realizado por D. Guimarães et al. [2], com as mesmas amostras ósseas obtidas na Ermida do Espírito Santo, foram medidas concentrações elevadas de Br, variando

entre 5 e 40 $\mu\text{g/g}$, que foram associadas ao consumo de alimentos marinhos. Comparando com os resultados obtidos nesta dissertação para o Br (figura 7.17), verifica-se que os 8 indivíduos analisados possuíam quantidades superiores deste elemento (sensivelmente entre 20 e 150 $\mu\text{g/g}$). Esta diferença pode dever-se ao facto de os habitantes da região de Almada também consumirem peixes do rio Tejo, que possuem menores concentrações deste elemento que os peixes obtidos no mar. Por outro lado, também é possível que a diferença entre as duas populações se deva a uma alimentação mais variada dos habitantes de Almada, que para além de alimentos marinhos também consumiam produtos agrícolas em maior quantidade, ao contrário das populações que habitavam os arredores do Túmulo Megalítico de Santa Rita, cuja dieta seria constituída essencialmente por peixes marinhos.

Em suma, estas 2 populações costeiras separadas temporalmente por milénios teriam uma intensa atividade piscatória, no entanto, como resultado dos avanços na agricultura verificados ao longo da história do ser humano, particularmente após a revolução industrial, levaram à inclusão de uma maior variedade de alimentos nos hábitos alimentares das populações costeiras modernas em Portugal continental.

Conclusões e perspectivas futuras

8.1 Conclusões

Este trabalho permitiu compreender melhor as condições de vida das populações que habitavam os arredores do túmulo Megalítico de Santa Rita nos dois últimos Milénios A.N.E. Os 8 indivíduos estudados, apesar de pertencerem a períodos históricos diferentes, teriam estilos de vida similares. O mar providenciava a maior parte dos recursos necessários à sua subsistência, pelo que a pesca seria a principal atividade económica. Os alimentos maioritariamente consumidos seriam os peixes. O consumo de carnes e vegetais seria reduzido. Relativamente ao tipo de ferramentas utilizadas por estas populações, como os utensílios de cozinha, é possível que fossem constituídos maioritariamente por Cu. As populações contemporâneas aos indivíduos 4, 7 e 8, provavelmente usariam o cinábrio durante os rituais fúnebres. A exposição diária destas populações aos metais pesados tóxicos Pb, Cd, e As, seria reduzida.

Tendo em conta que a maioria dos metais pesados foram incorporados *post-mortem* nos ossos dos 8 indivíduos, como resultado da contaminação provocada pelo solo, não foi possível estudar os processos de acumulação *in vivo* destes metais nos ossos. O número reduzido de ossos analisados por indivíduo (23 ossos analisados para um total de 8 indivíduos), não permitiu fazer comparações entre as diferentes estruturas ósseas. De qualquer modo, este trabalho contribuiu para uma melhor compreensão das condições *in vivo* nestas populações da antiguidade. Além disso, este estudo demonstrou a utilidade do uso de técnicas de XRF não destrutivas na análise de amostras arqueológicas. A pequena quantidade de amostra necessária para análise, e o processo de quantificação fácil, são duas grandes vantagens destas técnicas.

8.2 Perspetivas futuras

Relativamente aos resultados obtidos neste trabalho, seria interessante confirmar a causa das elevadas concentrações de Hg nos solos das áreas de inumação dos indivíduos 4 (área 3), 7 e 8 (área 5). Os elevados valores observados no solo tornam improvável a hipótese de serem variações naturais deste elemento, no entanto seria importante medir as concentrações deste metal nas zonas que avizinham as áreas 3 e 5 para comparação. Para além disso, seria relevante estudar a origem da incorporação do Cu nas estruturas ósseas dos 8 indivíduos, de modo a confirmar se este metal foi incorporado *in vivo*, ou se foi introduzido como contaminante do solo. Seria importante também conjugar outros fatores como a idade, o sexo e o tipo de patologias associadas para correlacionar com os perfis elementares encontrados. É possível, por exemplo, que as concentrações muito baixas de Sr nos ossos dos indivíduos 6 e 8, tivessem implicações na sua saúde.

Bibliografia

- [1] A. A. Dias, M. Carvalho, M. L. Carvalho e S. Pessanha, “Quantitative evaluation of ante-mortem lead in human remains of the 18th century by triaxial geometry and bench top micro X-ray fluorescence spectrometry”, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*., vol. 30, pp. 2488-2495, 2015.
- [2] D. Guimarães, A.A. Dias, M. Carvalho, M.L. Carvalho, J.P. Santos, F.R. Henriques, F. Curate e S. Pessanha, “Quantitative determinations and imaging in different structures of buried human bones from the XVIII-XIXth centuries by energy dispersive X-ray fluorescence – Post mortem evaluation”, *Talanta*, vol. 155, pp. 107-115, 2016.
- [3] S. Pessanha, M. Carvalho, M. Carvalho e A. A. Dias, “Quantitative analysis of human remains from 18th–19th centuries using X-ray fluorescence techniques: The mysterious high content of mercury in hair”, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, vol. 33, pp. 26-30, 2016.
- [4] M. L. Carvalho e A. F. Marques, “Diagenesis evaluation in middle ages human bones using EDXRF”, *X-Ray Spectrometry*, vol. 37, pp. 32-36, 2008.
- [5] N. Inácio, F. Nocete, D. Calado, F. Curate, J. Nieto, M. Bayona e C. Oliveira, “O Túmulo Megalítico de Santa Rita (Vila Nova de Cacela). Resultados preliminares de um processo de investigação em curso”, em Actas do 7º Encontro de Arqueologia do Algarve, *XELB: revista de arqueologia, arte, etnologia e história*, no. 10, pp. 73-86, 2010.
- [6] Centro de Investigação e Informação do Património de Cacela / CMVRSA, “Megalitismo em Cacela (Túmulo megalítico de Santa Rita)”. [Online]. Disponível em:

<https://ciipcacela.wordpress.com/investigacao-arqueologica-historica-e-antropologica/megalitismo-em-cacela-tumulo-megalitico-de-santa-rita/>

 [Acedido em: 08/11/2020].
- [7] F. Curate e N. Inácio, “Bioarqueologia de uma amostra esquelética proveniente do túmulo megalítico de Santa Rita - dados preliminares”, em Actas do 7º Encontro de Arqueologia do Algarve, *XELB: revista de arqueologia, arte, etnologia e história*, no. 10, pp. 509-514, 2010.
- [8] B. Clarke, “Normal bone anatomy and physiology”, *Clinical journal of the American Society of Nephrology, CJASN*, 3 Suppl 3(Suppl 3), pp.131–139, 2008
- [9] Y. İzci, O. Erdem, C. Akay, C. Kural, B. Soykut, O. başoğlu, Y. Şenyurt, S. Kilic e C. Temiz, “Paleodietary Analysis of Human Remains from a Hellenistic-Roman Cemetery at Camihöyük, Turkey”, *Journal of Anthropology*, vol. 2013, pp. 1-7, 2013.
- [10] P. A. Downey e M. I. Siegel, “Bone biology and the clinical implications for osteoporosis”, *Physical Therapy*, vol. 86, no. 1, pp. 77–91, 2006.
- [11] R. Florencio-Silva, G. R. Sasso, E. Sasso-Cerri, M. J. Simões e P. S. Cerri, “Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells”, *BioMed Research International*, vol. 2015, pp. 1–17, 2015.

- [12] B. Q. Le, V. Nurcombe, S. M. Cool, C. A. van Blitterswijk, J. de Boer e V. LaPointe, “The Components of Bone and What They Can Teach Us about Regeneration”, *Materials (Basel, Switzerland)*, vol. 11, pp. 14, 2017.
- [13] A. Corte, I. Giorgio, Ivan e D. Scerrato, “A review of recent developments in mathematical modeling of bone remodeling. Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers”, *Part H: Journal of Engineering in Medicine*, vol. 234, no. 3, pp. 273-281, 2019.
- [14] J. A. Buckwalter, M. J. Glimcher, R. R. Cooper, e R. Recker, “Bone biology. I: structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization,” *Instructional Course Lectures*, vol. 45, pp. 371– 386, 1996.
- [15] M. L. Carvalho, A. F. Marques, M. T. Lima e U. Reus, “Trace elements distribution and post-mortem intake in human bones from middle age by total reflection x-ray fluorescence”, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, vol. 59, pp. 1251-1257, 2004.
- [16] S. Standring, *Gray’s Anatomia - A base anatómica da prática clínica*. Elsevier Ltd, no. 40, 2008.
- [17] J. O. Duruibe, M. Ogwuegbu e J. Ekwurugwu, “Heavy metal pollution and human biotoxic effects”, *International journal of physical sciences*, vol. 2, pp.112-118, 2007.
- [18] P. B. Tchounwou, C. G. Yedjou, A. K. Patlolla e D. J. Sutton, “Heavy Metal Toxicity and the Environment”, *Experientia supplementum*, vol. 101, pp. 133–164.
- [19] Z. Jaworowski, F. Barbalat, C. Blain e E. Peyre, “Heavy metals in human and animal bones from ancient and contemporary France”, *Science of The Total Environment*, vol. 43, no. 1-2, pp. 103–126, 1985.
- [20] L. Murr, Capítulo “A Brief History of Metals”, em: *Handbook of Materials Structures, Properties, Processing and Performance*. Cham, Suíça: Springer International Publishing AG, 2015.
- [21] M. J. Martínez-García, J. M. Moreno, J. Moreno-Clavel, N. Vergara, A. García-Sánchez, A. Guillamón, M. Porti e S. Moreno-Grau, “Heavy metals in human bones in different historical epochs”, *Science of The Total Environment*, vol. 348, no. 1-3, pp. 51–72, 2005.
- [22] H. S. Lim, H. H. Lee, T. H. Kim, e B. R. Lee, “Relationship between Heavy Metal Exposure and Bone Mineral Density in Korean Adult”, *Journal of Bone Metabolism*, vol. 23, pp. 223-231, 2016.
- [23] J. Rodríguez e P. M. Mandalunis, “A Review of Metal Exposure and Its Effects on Bone Health” *Journal of Toxicology*, pp. 1–11, 2018.
- [24] F. Miculescu, L. Ciocan, M. Miculescu, A. Ernuteanu, I. Antoniac, E. Matei e I. Pencea, “A Study on Trace Elements Concentration in Bone Particles by XRF Analysis”, *Solid State Phenomena*, vol. 188, pp. 37-40, 2012.
- [25] E. J. Massaro, *Handbook of Human Toxicology*, USA: Library of Congress, 1997.
- [26] G. V. Iyengar e L.Tandon, “Minor and trace elements in human bones and teeth (NAHRES--39)”, *International Atomic Energy Agency (IAEA)*, vol. 31, no. 25, 1999.
- [27] M. Carvalho, “Fluorescência de raios-X aplicada ao estudo de ossadas humanas”, Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologias - Universidade Nova de Lisboa, 2015.
- [28] E. Takeda, H. Yamamoto, H. Yamanaka-Okumura e Y. Taketani, “Dietary phosphorus in bone health and quality of life”, *Nutrition reviews*, vol. 70, pp. 311-321, 2012.

- [29] National Research Council (US) Committee on Diet and Health, *Diet and Health: Implications for Reducing Chronic Disease Risk*, Washington (DC): National Academies Press (US), 1989.
- [30] I. Zofkova, P. Nemcikova e P. Matucha, “Trace elements and bone health”, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, vol. 5, pp. 1555-1561, 2013.
- [31] I. Zofkova, M. Davis e J. Blahos, “Trace Elements Have Beneficial, as Well as Detrimental Effects on Bone Homeostasis”, *Physiological research*, vol. 66, 2017.
- [32] T. Almeida, “Estudo Da Distribuição De Elementos Vestigiais Em Tecidos Humanos Saudáveis E Com Carcinoma Por Espetrometria De Raios – X,” Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências - Universidade de Lisboa, 2007.
- [33] S. L. O'Neal e W. Zheng, “Manganese Toxicity Upon Overexposure: a Decade in Review”, *Current environmental health reports*, vol. 2(3), pp. 315–328, 2015.
- [34] J. Emsley, “Manganese the protector”, *Nature Chemistry*, vol. 5, no. 11, pp. 978, 2013.
- [35] R. Allmäe, J. Limbo, L. Heapost e E. Verš, “The content of chemical elements in archeological human bones as a source of nutrition research”, *Papers On Anthropology*, vol. XXI, pp. 27-50, 2012.
- [36] J. Beattie e A. Avenell, “Trace Element Nutrition and Bone Metabolism”, *Nutrition Research Reviews*, vol. 5, pp. 167-188, 1992.
- [37] P. T. Bhattacharya, S. R. Misra e M. Hussain, “Nutritional Aspects of Essential Trace Elements in Oral Health and Disease: An Extensive Review”, *Scientifica*, vol. 2016, pp. 1-12, 2016.
- [38] N. Abbaspour, R. Hurrell e R. Kelishadi, “Review on iron and its importance for human health”, *Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*, vol. 19, pp. 164–174, 2014.
- [39] E. Balogh, G. Paragh e V. Jeney, “Influence of Iron on Bone Homeostasis”, *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, vol. 11, no. 4, pp. 107, 2018.
- [40] U. Forstner e G. T. W. Wittmann, *Metal pollution in the Aquatic Environment*, Berlin: Springer-Verlag, 1979.
- [41] B. Zambelli e S. Ciurli, “Nickel and Human Health”, *Metal ions in life sciences*, vol. 13, pp. 321-357, 2013.
- [42] F. Al-Fartusie e S. Mohssan, “Essential Trace Elements and Their Vital Roles in Human Body”, *Indian Journal of Advances in Chemical Science*, vol. 5, pp. 127-136, 2017.
- [43] F. H. Nielsen, “Ultratrace elements in nutrition: current knowledge and speculation”, *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*, vol. 11, pp. 251-274, 1998.
- [44] World Health Organization, International Atomic Energy Agency & Food and Agriculture Organization of the United Nations., *Trace elements in human nutrition and health*, Geneva: WHO, 1996.
- [45] S. Hong, J. P. Candelone, M. Soutif, e C. F. Boutron, “A reconstruction of changes in copper production and copper emissions to the atmosphere during the past 7000 years”. *Science of The Total Environment*, vol. 188, no. 2-3, pp. 183–193, 1996.

- [46] J. Uriu-Adams e C. Keen, “Copper, oxidative stress, and human health”, *Molecular aspects of medicine*, vol. 26, pp. 268-98, 2005.
- [47] J. Grattan, L. Karaki, D. Hine, H. Toland, D. Gilbertson, Z. Al saad e B. Pyatt, “Analyses of patterns of copper and lead mineralization in human skeletons excavated from an ancient mining and smelting centre in the Jordanian desert: A reconnaissance study”, *Mineralogical Magazine - MINER MAG*, vol. 69, no. 5, pp. 653-666, 2015.
- [48] M.P. Vetchý, “Biological role of copper as an essential trace element in the human organism”, *Ceska a Slovenska farmacie: casopis Ceske farmaceuticke spolecnosti a Slovenske farmaceuticke spolecnosti*, vol. 67(4), pp. 143-153, 2019.
- [49] C. T. Price, J. R. Langford e F. A. Liporace, “Essential nutrients for bone health and a review of their availability in the average north american diet”, *The Open Orthopaedics Journal*, vol. 6, pp.143-149, 2012.
- [50] C. Chasapis, A. Loutsidou, C. Spiliopoulou e M. Stefanidou, “Zinc and human health: An update”, *Archives of toxicology*, vol. 86, pp. 521-534, 2011.
- [51] H. Scherz e E. Kirchhoff, “Trace elements in foods: Zinc contents of raw foods—A comparison of data originating from different geographical regions of the world”, *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 19, pp. 420-433, 2006.
- [52] M. H. Lourenço, “Essential and toxic elements in fish products consumed in Portugal”, Tese de Doutoramento, Faculdade de Ciências - Universidade de Lisboa, 2011.
- [53] I. János, L. Szathmáry, E. Nádas, A. Béni, Z. Dinya e E. Mathe, “Evaluation of elemental status of ancient human bone samples from Northeastern Hungary dated to the 10th century AD by XRF”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B Beam Interactions with Materials and Atoms*, vol. 269, pp. 2593–2599, 2012.
- [54] M. Yamaguchi, “Role of Nutritional Zinc in the Prevention of Osteoporosis”, *Molecular and cellular biochemistry*, vol. 338, pp. 241-54, 2010.
- [55] J. Frith, “Arsenic - the "poison of kings" and the "saviour of syphilis"”, *Journal of Military and Veterans Health*, vol. 21, no. 4, pp. 11-17, 2013.
- [56] M. A. Davis, A. J. Signes-Pastor, M. Argos, F. Slaughter, C. Pendergrast, T. Punshon, A. Gossai, H. Ahsan e M. R. Karagas, “Assessment of human dietary exposure to arsenic through rice”, *Science of The Total Environment*, vol. 586, pp. 1237–1244, 2017.
- [57] M. Cupper, J. Swift, A. Greig, C. Carter, M. Westaway, G. Jacobsen, R. Wood e C. Santoro, “Arsenic Exposure in Pre-Columbian Populations of Caleta Vitor, Northern Chile”, *Journal of Archaeological Science*, 2013.
- [58] A. Dolphin, S. Naftel, A. Nelson, R. Martin e C. White, “Bromine in teeth and bone as an indicator of marine diet”, *Journal of Archaeological Science*, vol. 40, 2013.
- [59] F. H. Nielsen, Capítulo “Other elements: Sb, Ba, B, Br, Cs, Ge, Rb, Ag, Sr, Sn, Ti, Zr, Be, Bi, Ga, Au, In, Nb, Sc, Te, Tl, W”, em: *Trace Elements in Human and Animal Nutrition*, Orlando: Academic Press, W. Mertz (ed), vol. 2, pp. 415–463, 1986.
- [60] V. Hoellriegl e H. Z. München, “Strontium in the Environment and Possible Human Health Effects”, *Encyclopedia of Environmental Health*, pp. 268-275, 2011.

- [61] J. H. Burton e T. D. Price, “Evaluation of bone strontium as a measure of seafood consumption”, *International Journal of Osteoarchaeology*, vol. 9, pp. 233-236, 1999.
- [62] B. Pemmer, A. Roschger, A. Wastl, J. G. Hofstaetter, P. Wobrauschek, R. Simon, H. W. Thaler, P. Roschger, K. Klaushofer e C. Strel, “Spatial distribution of the trace elements zinc, strontium and lead in human bone tissue”, *Bone*, vol. 57, no. 1, pp. 184–193, 2013.
- [63] A. A. Pastorelli, L. Campanella, A. Coppa, P. Stacchini, “Exposure to Cadmium and Lead in an Agropastoral Iron Age Population”, *International Journal of Osteoarchaeology*, vol. 26, no. 1, pp. 132–140, 2014.
- [64] S. Satarug, J. R. Baker, S. Urbenjapol, M. Haswell-Elkins, P. E. Reilly, D. J. Williams e M. R. Moore, “A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupationally exposed population”, *Toxicology Letters*, vol. 137, pp. 65–83, 2003.
- [65] V. Papa, V. M. Bimonte, F. Wannenes, A.S. D’Abusco, S. Fittipaldi, R. Scandurra, L. Politi, C. Crescioli, A. Lenzi, L. Di Luigi e S. Migliaccio, “The endocrine disruptor cadmium alter human osteoblast-like Saos-2 cells homeostasis in vitro by alteration of Wnt/ β -catenin pathway and activation of caspases”, *Journal of endocrinological investigation*, vol. 38, pp. 1345-1356, 2015.
- [66] K. Kostial, Capítulo “Cadmium”, em: *Trace Elements in Human and Animal Nutrition*, Orlando: Academic Press, W. Mertz (ed), vol. 2, pp. 319–345, 1986.
- [67] J. D. Park, W. Zheng, “Human exposure and health effects of inorganic and elemental mercury”, *Journal of preventive medicine and public health = Yebang Uihakhoe chi*, vol. 45, no. 6, pp. 344–352, 2012.
- [68] O. López-Costas, M. Kylander, N. Mattielli, N. Álvarez-Fernández, M. Pérez-Rodríguez, T. Mighall, R. Bindler e A. Cortizas, “Human bones tell the story of atmospheric mercury and lead exposure at the edge of Roman World”, *Science of The Total Environment*, vol. 710, 2019.
- [69] S. D. Emslie, A. Alderman, A. McKenzie, R. Brasso, A.R. Taylor, M. M. Moreno, et al. , “Mercury in archaeological human bone: biogenic or diagenetic?”, *Journal of Archaeological Science*, vol. 108, 2019.
- [70] J. M. Lavado-García, L. M. Puerto-Parejo, R. Roncero-Martín, J. M. Moran, J. D. Pedrera-Zamorano, I. J. Aliaga, O. Leal-Hernández e M. L. Canal-Macias, “Dietary Intake of Cadmium, Lead and Mercury and Its Association with Bone Health in Healthy Premenopausal Women”, *International journal of environmental research and public health*, vol. 14, 2017.
- [71] A. K. Wong, K. A. Beattie, A. Bhargava, M. Cheung, C. E. Webber, D. R. Chettle, A. Papaioannou e J. D. Adachi, “Bone lead (Pb) content at the tibia is associated with thinner distal tibia cortices and lower volumetric bone density in postmenopausal women”, *Bone*, vol. 79, pp. 58–64, 2015.
- [72] G. Olchowik, J. Widomska, M. Tomaszewski, M. Gospodarek, M. Tomaszewska e E. Jagiełło-Wójtowicz, “The influence of lead on the biomechanical properties of bone tissue in rats”, *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, vol. 21, no. 2, pp. 278–281, 2014.
- [73] M. I. Conti, A. R. Terrizzi, C. M. Lee, P. M. Mandalunis, C. Bozzini, A. E. Piñeiro e M. P. Martínez, “Effects of lead exposure on growth and bone biology in growing rats exposed to simulated high altitude”, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 88, no. 6, pp. 1033–1037, 2012.

- [74] B. Ribeiro, S. Silva, E. Silva e L. Guilherme, “Portable X-ray fluorescence (pXRF) applications in tropical Soil Science”, *Ciência e Agrotecnologia*, vol. 41, pp. 245-254, 2017.
- [75] M. Betancourt, H. Rahier e G. Van Assche. Capítulo “Physicochemical characterization of nanomaterials: Polymorph, composition, wettability, and thermal stability”, em: *Emerging Applications of Nanoparticles and Architecture Nanostructures*. Amesterdão: Academic press, 2018.
- [76] M. Uo, T. Wada e T. Sugiyama, “Applications of X-ray fluorescence analysis (XRF) to dental and medical specimens”, *Japanese Dental Science Review*, vol. 51, no. 1, pp. 2–9, 2015.
- [77] G. Piga, A. Brunetti, B. Lasio, S. Enzo e A. Malgosa, “XRF investigation on skeletal remains from King Peter III of Aragon (1239–1285 A.D.) and Queen Blanche of Anjou (1280–1310 A.D.)”, *Applied Physics A*, vol. 114, pp. 647-653, 2014.
- [78] M. S. Shackley, Capítulo “X-Ray Fluorescence Spectrometry (XRF)”, em: “*The Encyclopedia of Archaeological Sciences*”, S. López Varela (Ed.), J. Thomas (Ed.), Hoboken : John Wiley & Sons Ltd, 2018.
- [79] C. Wilkinson, Capítulo “Principles of X-Ray Production and Radiation Protection”, em: *Imaging and Technology in Urology*, Londres: Springer, Payne S., Eardley I., O'Flynn K. (eds), 2012.
- [80] M. L'Annunziata, Capítulo: “Electromagnetic Radiation: Photons”, em: *Radioactivity: Introduction and History, From the Quantum to Quarks*, Amesterdão: Elsevier, 2016.
- [81] C. P. S. Fonseca, “Aplicação de fluorescência de raios-x para caracterização de elementos tóxicos em exosqueletos de moluscos”, Tese de doutoramento, Faculdade de Ciências e Tecnologias - Universidade Nova de Lisboa, 2017.
- [82] W. Moebs, J. Sanny e S. Ling, Capítulo “Atomic Spectra and X-rays” em: *University Physics Volume 3*, Houston, Texas: OpenStax, 2016.
- [83] H. Wang e P. K. Chu, Capítulo “Surface Characterization of Biomaterials”, em: *Characterization of Biomaterials*, Amesterdão: Elsevier, 2013.
- [84] A. K. Gosh, Capítulo: “Analítical Instrumentation”, em *Introduction to Measurements and Instrumentation*, Nova Deli: PHI Learning Pvt. Ltd., 2012.
- [85] A. Sethi, “X-Rays: Interaction with Matter”, *Encyclopedia of Medical Devices and Instrumentation*, vol. 6, no. 2, pp. 590-599, 2006.
- [86] S. M. Seltzer, D. T. Bartlett, D. T. Burns, G. Dietze, H. G. Menzel, H. G. Paretzke e A. Wambersie, “4. Interaction Coefficients and Related Quantities”, *Journal of the ICRU*, vol. 11, no. 1, pp. 17–21, 2011.
- [87] M. H. McKetty, “The AAPM/RSNA physics tutorial for residents. X-ray attenuation.” *RadioGraphics*, vol. 18, no. 1, pp. 151–163, 1998.
- [88] K. Janssens, Capítulo “X-Ray Fluorescence Analysis”, em: *Handbook of Spectroscopy*, Weinheim: John Wiley & Sons, Ltd, 2003.
- [89] R. Jenkins, Capítulo “X-Ray Fluorescence Spectrometry”, em: *Handbook of Analytical Techniques*, New York: Wiley-VCH, 2001.
- [90] A. Khalid, M. S. Anwar e S. A. Siddiqi, “Energy dispersive X-ray fluorescence (EDXRF) for studying coinage from the Indo-Pak subcontinent”, 2011.

- [91] A. C. Costa, “Otimização da técnica de micro Fluorescência de Raios- X para o estudo de ossos”, Tese de Mestrado, FCT-Universidade Nova de Lisboa, 2015.
- [92] R. Tertian e F. Claisse, *Principles of quantitative X-ray fluorescence analysis*, Heyden, 1982
- [93] Bruker Nano GmbH, *M4 TORNADO High performance Micro-XRF spectrometer*, Berlim, Alemanha: Bruker Nano GmbH, 2015.
- [94] Archaeometry Laboratory University of Missouri Research Reactor, “Overview of X-ray Fluorescence”, 2012. [Online]. Disponível em: https://archaeometry.missouri.edu/xrf_overview.html [Acedido em: 08/11/2020].
- [95] A. Bjeoumikhov, N. Langhoff, S. Bjeoumikhova e R. Wedell, “Capillary optics for micro x-ray fluorescence analysis”, *Review of Scientific Instruments*, vol. 76, no. 6, pp. 063115-063115.7, 2005.
- [96] N. J. Winter e P. Claeys, “Micro X-ray fluorescence (μ XRF) line scanning on Cretaceous rudist bivalves: A new method for reproducible trace element profiles in bivalve calcite”, *Sedimentology*, vol. 64, no. 1, pp. 231–251, 2016.
- [97] A. Shugar, “Peaking Your Interest: an introductory explanation of how to interpret XRF data”, *WAAC Newsletter*, vol. 31, no. 3, pp. 8-10, 2009.
- [98] R. Sitko e B. Zawisza, Capítulo “Quantification in X-ray fluorescence spectrometry”, em: *X-Ray Spectroscopy*, S. K. Sharma, Ed. InTech, 2012.
- [99] M. L. Carvalho, A. F. Marques e J. Brito, “Synchrotron radiation and energy dispersive x-ray fluorescence applications on elemental distribution in human hair and bones”, *AIP Conference Proceedings*, vol. 652, pp. 522–528, 2003.
- [100] M. L. Carvalho, J. Brito e M. A. Barreiros, “Study of Trace Element Concentrations in Human Tissues by EDXRF Spectrometry”, *X-ray Spectrometry*, vol. 27, pp. 198-204, 1998.
- [101] M. L. Carvalho, C. Casaca, T. Pinheiro, J. P. Marques, P. Chevallier e A. S. Cunha, “Analysis of human teeth and bones from the chalcolithic period by X-ray spectrometry”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, vol. 168, no. 4, pp. 559–565, 2000.
- [102] C. Corti, L. Rampazzi, C. Ravedoni e B. Giussani, “On the use of trace elements in ancient necropolis studies: Overview and ICP-MS application to the case study of Valdaro site, Italy”, *Microchemical Journal*, vol. 110, pp. 614-623, 2013.
- [103] M. Galarnyk, “Understanding Boxplots”, 2018. [Online], disponível em: <https://towardsdatascience.com/understanding-boxplots-5e2df7bcbd51>
[Acedido em: 08/11/2020]
- [104] F. Giorgi, F. Bartoli, P. Iacumin e F. Mallegni, “Oligoelements and isotopic geochemistry: a multidisciplinary approach to the reconstruction of the paleodiet”, *Human Evolution*, vol. 20, pp. 55-82, 2005.
- [105] M. Busetto, L. Giordani, A. Brandone, C. Cattaneo e A. Mazzucchi, “Dietary investigation by trace element content in bones of ancient inhabitants of Northern Italy”, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, pp. 355-363, 2008.

- [106] M. Inácio, M. O. Neves, V. Pereira e E. Silva, “Concentração de As, Cu, Hg e Zn em solos e produtos agrícolas (*Brassica oleracea* L., *Lycopersicon esculentum* Mill e *Zea mays* L.) numa área industrial no NW de Portugal”, *Revista de Ciências Agrárias*, vol. 36, pp. 229-237, 2013.
- [107] N. Inácio, F. N. Calvo, J. M. N. Linan, R. S. Ramos, M. R. Bayona e A. P. Corte, “A presença de cinábrio em contextos megalíticos do sul de Portugal”, *6º Encontro de Arqueologia do Sudoeste Peninsular*, pp. 417-430, 2013.
- [108] N. Bilandžić, M. Sedak, M. Đokić, I. Varenina, B. S. Kolanović, D. Božić, M. Brstilo e B. Šimić, “Determination of zinc concentrations in foods of animal origin, fish and shellfish from Croatia and assessment of their contribution to dietary intake”, *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 35, pp. 61-66, 2014.
- [109] P. A. M. Grenha, “Transformações do consumo alimentar na época contemporânea”, Tese de Mestrado, Faculdade de Letras da Universidade de Coimbra, 2011.
- [110] F. M. V. Silva, “Ruralidade em Almada e Seixal nos séculos XVIII e XIX: Imagem, Paisagem e Memória”, Tese de Mestrado, Universidade aberta de Lisboa, 2008.