



BEATRIZ HELENA ALMEIDA MORAIS

Licenciada em Ciências da Engenharia Biomédica

ESTUDO ESPETROSCÓPICO DE ESTRUTURAS ÓSSEAS DO PERÍODO MEDIEVAL PARA AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO POR METAIS PESADOS

MESTRADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

Universidade NOVA de Lisboa
Novembro, 2021



NOVA

NOVA SCHOOL OF
SCIENCE & TECHNOLOGY

DEPARTAMENTO DE FÍSICA

BEATRIZ HELENA ALMEIDA MORAIS

Licenciada em Ciências da Engenharia Biomédica

ESTUDO ESPETROSCÓPICO DE ESTRUTURAS ÓSSEAS DO PERÍODO MEDIEVAL PARA AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO POR METAIS PESADOS

MESTRADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

Universidade NOVA de Lisboa
Novembro, 2021



ESTUDO ESPETROSCÓPICO DE ESTRUTURAS ÓSSEAS DO PERÍODO MEDIEVAL PARA AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO POR METAIS PESADOS

BEATRIZ HELENA ALMEIDA MORAIS

Licenciada em Ciências da Engenharia Biomédica

Orientador: Professor Doutor António Dias,
Professor Auxiliar no Departamento de Física, Universidade NOVA de Lisboa

Coorientador: Professora Doutora Sofia Pessanha,
Investigadora Auxiliar no Departamento de Física, Universidade NOVA de Lisboa

Júri:

Presidente: Professora Doutora Carla Quintão

Arguentes: Doutora Marta Manso

Orientador: Professor Doutor António Dias

Outros membros: Professora Doutora Sofia Pessanha

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

Copyright © Beatriz Helena Almeida Morais, 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 objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Para as minhas avós, Celeste e Isabel.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer aos meus orientadores, Professor Doutor António Dias e Professora Doutora Sofia Pessanha, por terem feito jus ao título e por terem sido verdadeiros mentores. Por me terem ajudado sempre, por terem sido incansáveis e infinitamente pacientes. Pelo bom humor, pelos conselhos, pelas dicas e pelos ensinamentos.

Quero agradecer ainda ao Doutor Francisco Curate, pelo fornecimento das amostras analisadas no presente trabalho, pela sua disponibilidade e pela simpatia. Agradecer também à FMDUL, em particular às professoras Sofia Arantes e Oliveira e Filipa Chasqueira, por tão amavelmente terem facilitado o corte das amostras estudadas.

À Ângela, colega de casa, de laboratório e amiga para a vida. Por me ter trazido um bocadinho de conforto num espaço que me era estranho. Pela companhia às refeições, pela partilha dos desesperos, pelas conversas infundáveis e pelas gargalhadas quase sempre sóbrias.

À Bia e à Inês Ma(r)ia, por estarem sempre lá e partilharem comigo as tormentas dos últimos meses. Pela compreensão, pelos ombros amigos e pelas *pep talks* que nunca ficam aquém. Pelas gargalhadas e pelos choros a qualquer hora do dia.

Ao Luís, por ter chegado à minha vida num momento difícil e por continuar sempre por perto. Pelo carinho, pelos passeios por Lisboa de braço dado e pelas fatias de bolo de chocolate que enchem a alma.

Ao Rafa, pelos dez longos anos. Pelas idas ao cinema, pelas mensagens a meio da noite e pela amizade incondicional. Pelas crises existenciais que tivemos (e que havemos de continuar a ter) juntos.

Ao João, pelas gargalhadas mais genuínas e sempre garantidas. Pelas conversas intermináveis, pelo carinho e pelos meus abraços preferidos.

Gostaria de agradecer às minhas avós, por terem sofrido tanto ou mais do que eu durante todo este percurso. Por terem cuidado de mim desde que me lembro e por me terem mostrado sempre que o amor de avó não tem preço. Pelas rezinhas em que não

acredito, mas que aquecem o coração, pelos mimos e pelos telefonemas cheios de saudade. Por terem sido sempre a parte mais dolorosa de sair de casa para crescer.

Ao meu avô Manel, por estar sempre a olhar por mim como se eu ainda fosse pequenina.

Aos meus pais, a quem devo o mundo. Por me ensinarem o amor incondicional e o respeito. Por me mostrarem desde sempre o valor do trabalho e da honra. Por me porem em primeiro lugar e por ficarem sempre de coração na mão quando é hora de vir. Por terem feito os possíveis e os impossíveis para garantir a minha educação.

À minha tia Pureza, por ser a minha segunda mãe. Por ter estado do meu lado desde que me lembro. Pelo papel fundamental que teve na minha educação, pela amizade e pelo amor incondicional. Aos meus primos, Tito e Burreca, que ainda eram pequeninos quando este caminho começou e que, entretanto, deixaram de ser. Por serem os manos que não tive, mas que amo como tal.

Ao Messi, por ser o melhor patudo do mundo.

Aos bons e aos maus momentos. Às memórias que me hão de acompanhar para sempre. Às pessoas que, de alguma forma, cruzaram o meu caminho e me ajudaram a chegar aqui.

A todos, o meu mais sincero obrigada. Não teria chegado aqui sem vocês.

Resumo

Os seres humanos têm contacto com metais pesados desde há milhares de anos e a exposição aos mesmos continua ainda a ser muito relevante nos dias de hoje. Embora já se conheçam alguns dos efeitos adversos resultantes desse contacto, os mecanismos que originam os efeitos tóxicos do depósito desses metais pesados permanecem ainda desconhecidos. O presente trabalho tem como principal objetivo estudar a forma como se distribuem os elementos acumulados nos ossos, em consequência da eventual contaminação por metais ao longo da vida, além de compreender a sua influência na toxicocinética desses elementos. Para isso, foi analisado um conjunto de ossos de uma Necrópole Cristã dos séculos XIII-XVI, localizada em Cacela Velha (Algarve, Portugal), com recurso às técnicas de Microfluorescência de Raios-X Dispersiva em Energia e de Microscopia Raman.

Não foram detetados valores anormais respeitantes a metais pesados nas amostras de tecido ósseo estudadas, pelo que a exposição *in vivo* aos mesmos seria reduzida. Os resultados obtidos sugerem que, embora esta população vivesse perto do mar e tivesse contacto com animais domésticos, teria uma dieta maioritariamente pobre em proteína de origem animal e bastante rica em vegetais. A contaminação *post-mortem* com bromo detetada na superfície externa dos ossos analisados pode ter sido devida à proximidade do local de sepultura ao mar. Registaram-se ainda contaminações *post-mortem* por parte dos elementos alumínio, potássio, ferro, cobre e zinco, possivelmente ligadas aos materiais exumados juntamente com os remanescentes esqueléticos e ao tipo de rochas que esteve na origem dos sedimentos constituintes do solo do local de exumação.

Palavras-chave: microfluorescência de raios-X dispersiva em energia; microscopia Raman confocal; ossos; metais pesados; elementos traço.

Abstract

Human beings have been exposed to heavy metals for thousands of years and that exposure is still relevant nowadays. Even though some of the adverse effects that come from that contact are well established, the mechanisms behind them remain unknown. The main goal of this thesis is to study the distribution of elements in ancient bones, as a result of possible contamination by metals throughout life, as well as its contribution to the toxicokinetics of said elements. Thereunto, a set of bones exhumed from a Christian Necropolis of the XIII-XVI centuries, located in Cacela Velha (Algarve, Portugal), was analyzed using Energy Dispersive Micro-X-Ray Fluorescence Microscopy and Raman Microscopy.

No abnormal concentrations of heavy metals were found in the bone tissue samples, so the exposure *in vivo* of the studied individuals to them would be reduced. The results suggest that, despite this population's proximity to the sea and its contact with farm animals, its diet would mainly consist of a low animal protein and high vegetable intake diet. The *post-mortem* contamination with bromine detected in the outer surface of the analyzed bones could be due to the closeness of the burial place to the seaside. *Post-mortem* contaminations with aluminum, potassium, iron, copper, and zinc were also found and thought to be justified by the materials exhumed along with the skeletal remains and the type of rocks that originated the sediments that integrate the soil of the exhumation site.

Keywords: energy dispersive X-ray fluorescence microscopy; confocal Raman microscopy; bones; heavy metals; trace elements.

Índice

Resumo	xv
Abstract.....	xvii
Índice de Figuras.....	xxiii
Índice de Tabelas	xxvii
Lista de Siglas.....	xxix
Lista de Símbolos.....	xxxi
Capítulo 1 - Introdução.....	1
1. Contextualização do Tema	1
2. Objetivos.....	2
Capítulo 2 - Os ossos	3
1. Matriz Óssea.....	3
2. Estrutura do Tecido Ósseo	3
2.1. Osso Cortical e Osso Trabecular	4
2.2. Osso Reticular e Osso Lamelar.....	6
3. Principais Características do Tecido Ósseo	6
Capítulo 3 - Elementos Químicos no Organismo.....	9
1. Elementos Essenciais e Não Essenciais	9
2. Elementos Tóxicos.....	15
Capítulo 4 - Estado da Arte	19
1. Fluorescência de Raios-X.....	19
2. Espectroscopia Raman	21
Capítulo 5 - Técnicas Analíticas.....	25
1. Técnica Analítica de Fluorescência de Raios-X.....	25
1.1. Raios-X e a sua interação com a matéria.....	25

1.2.	Produção de Raios-X	27
1.3.	Princípios Físicos da Espectroscopia de Fluorescência de Raios-X.....	29
1.4.	Fluorescência de Raios-X Dispersiva em Energia.....	30
1.5.	Microfluorescência de Raios-X Dispersiva em Energia	30
2.	Técnica Analítica de Espectroscopia Raman	31
2.1.	Princípios Físicos da Espectroscopia Raman	31
2.2.	Efeito Raman.....	32
2.3.	Confocalidade e Espectroscopia Raman	34
2.4.	Microscopia Confocal de Raman	35
Capítulo 6 - Materiais e Métodos.....		37
1.	Amostras.....	37
1.1.	Descrição das Amostras	37
1.2.	Pré-tratamento das Amostras	40
2.	Análise com Microfluorescência de Raios-X Dispersiva em Energia.....	41
2.1.	Escolha da Metodologia.....	41
2.1.1.	Primeira Etapa: Análise Direta vs. Análise em Pastilha	42
2.1.2.	Segunda Etapa: Análise em Fatia vs. Análise em Pastilha	45
2.2.	Metodologia.....	47
2.2.1.	Análise em Profundidade.....	47
2.2.2.	Mapeamento	48
2.3.	Quantificação das Amostras	49
2.4.	Validação do Método.....	51
3.	Análise com Microscopia Raman	53
Capítulo 7 - Resultados e Discussão		55
1.	Análise com Microfluorescência de Raios-X Dispersiva em Energia.....	55
1.1.	Composição Elementar das Amostras	55

1.2.	Relação entre os Elementos Estudados.....	58
1.3.	Hábitos Alimentares da População.....	61
1.3.1.	Comparação dos Resultados com os de Estudos Anteriores	64
1.4.	Variação das Concentrações dos Elementos em Profundidade	65
2.	Análise com Microscopia Raman	71
2.1.	Composição das Amostras.....	71
2.2.	Qualidade do Tecido Ósseo	72
2.3.	Relação entre as Medidas da Qualidade do Tecido Ósseo.....	75
Capítulo 8 - Conclusões e Perspetivas Futuras		77
1.	Conclusões.....	77
2.	Perspetivas Futuras	78
Capítulo 9 - Bibliografia.....		79
Apêndices.....		89

Índice de Figuras

Figura 1 - Hierarquia do tecido ósseo.....	4
Figura 2 - Representação esquemática de um corte sagital parcial de um osso longo.....	5
Figura 3 - Variação do desempenho de uma função biológica, dependente de um elemento essencial, de acordo com a concentração desse mesmo elemento no tecido	16
Figura 4 - Esquema da evolução das técnicas usadas na análise de elementos traço nos ossos e principais características	19
Figura 5 - Esquema ilustrativo do efeito fotoelétrico.....	26
Figura 6 - Esquema ilustrativo da dispersão de Compton	26
Figura 7 -Esquema ilustrativo dos processos de reorganização atômica após ionização: fluorescência de raios-X e efeito de Auger	28
Figura 8 - Rendimento de fluorescência em função do número atômico	29
Figura 9 - Esquema dos principais componentes da μ -EDXRF.....	31
Figura 10 - Representação esquemática das transições vibracionais que ocorrem na dispersão de Stokes e anti-Stokes	33
Figura 11 - Imagem esquemática de um aparelho de microscopia confocal de Raman	36
Figura 12 - Representação esquemática da Necrópole Cristã de Cacela Velha, no Algarve	38
Figura 13 - Sepulturas 53, 55 e 56	38
Figura 14 - Remanescentes esqueléticos do indivíduo da sepultura 53.....	38
Figura 15 - Algumas amostras depois do processo de escovagem e lavagem	40
Figura 16 - Disposição das amostras no forno, para secagem	40
Figura 17 - Comparação dos espectros obtidos para um mesmo ponto em modo "leves" e em modo "pesados"	42
Figura 18 - Exemplo de um dos fragmentos analisados	43
Figura 19 - Fragmento no tabuleiro do M4 Tornado.....	43
Figura 20 - Almofariz, pilão e pó de teste usados para fazer as pastilhas	43
Figura 21 - Pastilha 1 feita a partir do primeiro fragmento do osso A	43

Figura 22 - Evolução da concentração dos elementos Mn, Fe e Zn ao longo da primeira etapa da escolha da metodologia	44
Figura 23 - Fixação das fatias dos ossos O, P e R a uma lâmina de vidro	46
Figura 24 - Evolução da concentração dos elementos Mn, Fe, Cu, Zn, Br e Sr ao longo da segunda etapa da escolha da metodologia	46
Figura 25 - Seleção dos pontos da linha 3 da fatia B_1	48
Figura 26 - Fatia B_1 e respetivo mapeamento	49
Figura 27 - Exemplo de um espectro da Intensidade Raman em função do Deslocamento Raman, obtido para a fatia B	54
Figura 28 - Exemplo de um espectro da Intensidade Raman em função do Deslocamento Raman, obtido para a fatia B, tratado no LabSpec, com indicação dos picos de interesse característicos de um espectro Raman para uma amostra de tecido ósseo	54
Figura 29 - Dendrograma das concentrações de todos os elementos estudados em cada fatia	57
Figura 30 - Valores de referência para o rácio Zn/Ca	62
Figura 31 - Valores de referência para o rácio Sr/Ca	62
Figura 32 - Valores ótimos para o rácio Cu/Ca	62
Figura 33 - Variação da concentração de Ca em profundidade	66
Figura 34 - Distribuição do Ca ao longo da superfície de corte da fatia	66
Figura 35 - Variação da concentração de Al em profundidade	66
Figura 36 - Variação da concentração de K em profundidade	67
Figura 37 - Variação da concentração de Fe em profundidade	67
Figura 38 - Distribuição do K ao longo da superfície de corte da fatia	68
Figura 39 - Distribuição do Fe ao longo da superfície de corte da fatia	68
Figura 40 - Variação da concentração de Br em profundidade	68
Figura 41 - Distribuição do Br ao longo da superfície de corte da fatia	69
Figura 42 - Variação da concentração de Cu em profundidade	69
Figura 43 - Variação da concentração de Zn em profundidade	70
Figura 44 - Distribuição do Cu ao longo da superfície de corte da fatia	70
Figura 45 - Distribuição do Zn ao longo da superfície de corte da fatia	70

Figura 46 - Dendrograma das áreas dos picos estudados em cada fatia	72
Figura 47 - Gráfico dos valores experimentais do rácio Mineral/Matriz para cada uma das amostras analisadas.....	73
Figura 48 - Gráfico dos valores experimentais do rácio Carbonato/Fosfato para cada uma das amostras analisadas.....	74
Figura 49 - Gráfico dos valores experimentais da FWHM da banda correspondente ao ν_1 PO_4^{3-} para cada uma das amostras analisadas	75

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Quadro-resumo das principais características de cada osso	39
Tabela 2 - Comparação das concentrações obtidas experimentalmente para Bone Ash SRM NIST-1400 com os valores certificados e diferença percentual relativa entre os mesmos.....	51
Tabela 3 - Limites de detecção e de quantificação obtidos para Bone Ash SRM NIST-1400	53
Tabela 4 - Concentrações de elementos traço em estudos anteriores para indivíduos modernos e de diferentes períodos históricos	55
Tabela 5 – Comparação das concentrações dos elementos analisados no presente trabalho e no trabalho anterior	56
Tabela 6 - Matriz de correlação de Pearson para associações positivas	59
Tabela 7 - Matriz de correlação de Pearson para associações negativas.....	59
Tabela 8 - Valores experimentais dos rácios Zn/Ca, Sr/Ca e Cu/Ca.....	62
Tabela 9 - Matriz de correlação de Pearson para associações com significância estatística	76

Lista de Siglas

A. N. E.	Antes da Nossa Era
DMO	Densidade Mineral Óssea
XRF	Fluorescência de Raios-X
EDXRF	Fluorescência de Raios-X Dispersiva em Energia
<i>FWHM</i>	<i>Full Width Half Maximum</i>
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
μ-XRF	Microfluorescência de Raios-X
μ-EDXRF	Microfluorescência de Raios-X Dispersiva em Energia
μ-Raman	Microscopia Raman
PIGE	<i>Particle Induced Gamma-ray Emission</i>
SRM	<i>Standard Reference Material</i>

Lista de Símbolos

Z	Número atómico
ω	Rendimento de fluorescência
ω_K	Rendimento de fluorescência do nível K
a	Rendimento de Auger
a_K	Rendimento de Auger do nível K
I_i	Intensidade da fluorescência de raios-X
x	Espessura da amostra
$d\Omega$	Ângulo sólido diferencial para a radiação característica
φ_1	Ângulo de incidência da radiação primária
i	Subscrito do analito
j	Subscrito do elemento da matriz
Q_i	Sensibilidade do espectrómetro para a radiação característica do analito i
q_i	Sensibilidade do método para o analito i
W_i	Fração mássica do analito i
W_j	Fração mássica do elemento j da matriz
λ_{min}	Comprimento de onda mínimo
λ_{edge}	Comprimento de onda da descontinuidade de absorção do analito
$\tau_i(\lambda)$	Coefficiente de absorção fotoelétrico do analito i para a radiação primária de comprimento de onda λ
$I_0(\lambda)$	Intensidade da radiação primária
ρ	Densidade da amostra

$\chi(\lambda, \lambda_i)$	Coeficiente mássico de atenuação total da amostra para as radiações primária, λ , e fluorescente, λ_i
S_{ij}	Termo de reforço para o elemento j da matriz
C_i	Concentração do elemento i no material de referência
N_B	Taxa de contagem para o fundo
N_P	Taxa de contagem para o pico correspondente ao elemento i



Introdução

1. Contextualização do Tema

Os seres humanos têm contacto com metais pesados desde há milhares de anos e a exposição aos mesmos continua ainda a ser muito relevante nos dias de hoje, quer pelas condições ambientais e ocupacionais em que se inserem, quer pela sua dieta.

Sabe-se que alguns dos metais que representam as maiores ameaças à saúde pública, como o Pb, Cd, Hg e As, se depositam maioritariamente nos ossos, cérebro e cabelo, ao passo que outros elementos se acumulam preferencialmente em tecidos moles, como o fígado e os rins[1]–[3]. Além disso, já se conhecem também alguns dos efeitos adversos resultantes do contacto com metais pesados. Não obstante, os mecanismos que originam os efeitos tóxicos do depósito desses mesmos metais permanecem ainda desconhecidos.

A essa lacuna, soma-se o facto de ser escassa a informação relativa à correlação entre as concentrações dos elementos traço e os diferentes tecidos do corpo humano, informação essa que poderá aumentar a noção do papel que cada um desses elementos desempenha em possíveis estados patológicos[3].

Assim, torna-se crucial aprofundar estes conhecimentos através da medição da distribuição espacial de elementos traço no esqueleto, bem como da distribuição dos metais pesados supramencionados, sobretudo referentes a períodos históricos, em que não havia reservas face à exposição às fontes de contaminação[1], [4], [5].

2. Objetivos

O presente trabalho tem como principal objetivo estudar a forma como se distribuem os elementos acumulados nos ossos, em consequência da eventual contaminação por metais ao longo da vida. Além disso, pretende também compreender a sua influência na toxicocinética desses elementos, bem como fazer a comparação entre os níveis de metais pesados encontrados nas amostras analisadas com os níveis atualmente aceites pela comunidade científica.

Como tal, foi analisado um conjunto de ossos de uma Necrópole Cristã dos séculos XIII-XVI, localizada em Cacela Velha (Algarve, Portugal), com recurso à técnica espectroscópica de Microfluorescência de Raios-X Dispersiva em Energia (μ -EDXRF). Adicionalmente, foi usada a técnica de Microscopia Raman (μ -Raman) para estimar o perfil estrutural dos constituintes do osso, nomeadamente a sua cristalinidade e a proporção entre as suas componentes mineral (hidroxiapatite e carbonato) e orgânica (colagénio)[6].

Os resultados obtidos foram analisados com o intuito de adquirir informações relativas aos hábitos alimentares daquela comunidade e à influência ambiental na mesma. Os resultados foram comparados com os da literatura, nomeadamente, obtidos para amostras de estruturas ósseas mais antigas, uma vez que foram exumadas em localizações geográficas semelhantes[7].



Os ossos

1. Matriz Óssea

O tecido ósseo possui propriedades estruturais únicas que se devem essencialmente ao facto de ser composto por duas fases distintas, nomeadamente a fase mineral, responsável pelas características elásticas do osso, e a fase orgânica, responsável pelas suas características plásticas[8].

A matriz extracelular é constituída por cerca de 70% de componentes inorgânicos e 30% de componentes orgânicos. Destes últimos, 94% correspondem a colagénio tipo I, 4% a proteínas não colagenosas e 2% a células ósseas. A parte mineral é composta principalmente por cristais de hidroxiapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), resultantes da interação do fosfato de cálcio com o hidróxido de cálcio[9]. A matriz óssea, ao contrário de outros tecidos conjuntivos, tem a capacidade única de sofrer calcificação[8].

2. Estrutura do Tecido Ósseo

O tecido ósseo é altamente estruturado, heterogéneo e dinâmico, e apresenta uma organização extremamente complexa em várias escalas[6]. A nível macroscópico, pode ser classificado como cortical e trabecular; a nível microscópico, pode ser classificado como lamelar e reticular. Na figura 1 encontra-se um esquema representativo da hierarquia do tecido ósseo.

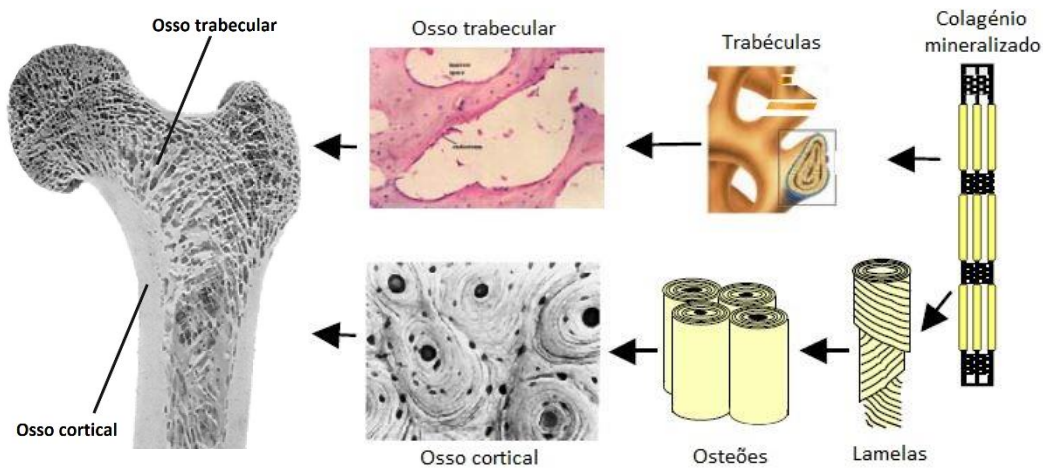


Figura 1 - Hierarquia do tecido ósseo. Adaptada da referência [10].

2.1. Osso Cortical e Osso Trabecular

Todo o tecido ósseo é constituído primordialmente por moléculas de colagénio que, associadas a cristais de hidroxiapatite, originam fibras de colagénio mineralizadas, às quais se dá o nome de lamelas (3-7 μm de espessura)[6]. A forma como as lamelas se dispõem no espaço dita as características do tecido ósseo e, por conseguinte, a sua classificação.

Quando várias lamelas se juntam e sofrem enrolamento em relação a um eixo central, adquirindo a forma aproximada de um cilindro, forma-se um osteão, que apresenta um diâmetro médio de 200-250 μm . O conjunto de osteões origina uma estrutura densa e compacta, à qual se dá o nome de osso cortical. Este compreende cerca de 80% de todo o esqueleto humano, conferindo-lhe força, rigidez e forma, e é muito denso, apresentando uma porosidade de 5%-10%. A atividade metabólica do osso cortical é mais reduzida do que a do osso trabecular. O aumento da taxa de remodelação óssea cortical provoca o aumento da sua porosidade e, como tal, diminui a massa óssea[10]. Neste tipo de osso, as propriedades mecânicas são consideravelmente influenciadas pela porosidade, grau de mineralização e organização da matriz sólida. É, portanto, difícil prever as micropropriedades do tecido *in vivo* através da medição das propriedades mecânicas do mesmo ao nível da sua macroestrutura[11].

Quando as lamelas não se juntam de forma ordeira e se dispõem irregularmente nos vários sentidos, formam-se trabéculas, cujo tamanho médio varia entre os 50 µm e os 400 µm. O conjunto de trabéculas forma o osso trabecular. Quando comparado com o osso cortical, o trabecular é significativamente mais poroso (porosidade de 75%-95%). Os poros estão interligados e preenchidos por medula óssea[10]. Em geral, o material que constitui o osso trabecular é cerca de oito vezes mais ativo metabolicamente, sofre remodelação com maior frequência e, como tal, é um tecido mais recente do que o cortical. O balanço entre as taxas de formação e de remoção ósseas altera-se com a idade, provocando uma diminuição progressiva da massa do osso.

Embora ambos os tecidos sejam constituídos pelo mesmo tipo de material, a maturação do osso cortical pode alterar as propriedades mecânicas do tecido ao nível microscópico[11].

Quando se considera um osso longo, como o fémur, um corte longitudinal ao seu comprimento revela uma periferia densa, de osso compacto, e um interior poroso, de osso esponjoso, tal como representado na figura 2. Ossos achatados, como os do crânio, apresentam camadas densas de osso cortical nas superfícies mais externas e uma camada fina de osso esponjoso no interior.

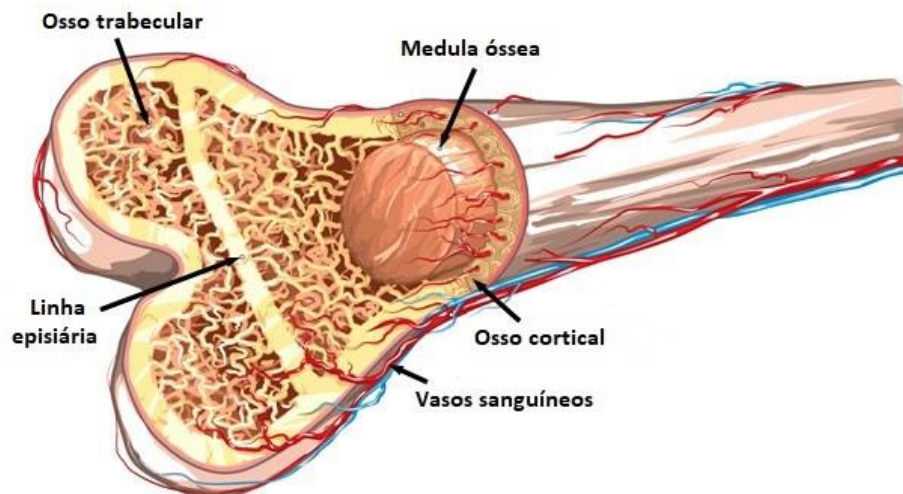


Figura 2 - Representação esquemática de um corte sagital parcial de um osso longo. Adaptada da referência [12].

Os tecidos ósseos cortical e trabecular diferem essencialmente no seu desenvolvimento, arquitetura, função, proximidade à medula óssea e suprimento de sangue[11].

2.2. Osso Reticular e Osso Lamelar

Tanto os ossos corticais como os trabeculares são formados por dois tipos de tecidos diferentes ao longo da vida: um tecido primário (ou imaturo), ao qual se dá o nome de reticular, e um tecido secundário, ao qual se dá o nome de tecido lamelar.

O tecido reticular começa a ser formado aquando da formação dos ossos no feto e é o principal tecido ósseo até aos quatro ou cinco anos de idade, altura em que é substituído por tecido lamelar, através de processos de remodelação óssea. Depois de substituído, o tecido reticular só volta a ser formado no processo de reparação de fraturas.

A composição dos dois tecidos apresenta diferenças a nível da organização estrutural e das propriedades mecânicas[10].

3. Principais Características do Tecido Ósseo

O osso é um material biológico extremamente sofisticado e complexo, que abarca relações intrincadas entre as suas componentes mineral e orgânica. As suas propriedades mecânicas refletem as propriedades dos materiais que o constituem e a forma como esses materiais estão organizados e interagem entre si[8].

A quantidade, a qualidade e a distribuição dos diferentes componentes do osso estão intimamente relacionadas com a força e a fragilidade ósseas[6], [13]. O parâmetro que mais influencia a força de um osso é a Densidade Mineral Óssea (DMO). No entanto, a forma tridimensional como as trabéculas estão organizadas, a forma e a geometria do osso, a potencial existência de danos a nível microscópico e as propriedades intrínsecas da matriz óssea também contribuem para a força do mesmo. Fatores como a idade podem também provocar alterações nas propriedades da hidroxiapatite e do colagénio e, por conseguinte, nas propriedades do próprio osso[8].

O tecido ósseo é dos principais tecidos do corpo humano a integrar informação mecânica proveniente do ambiente, tendo a capacidade de alterar a sua própria

morfologia e metabolismo de modo a satisfazer novas necessidades[14]. É sensível a influências metabólicas, nutricionais e endócrinas[15].

Este tecido é constantemente renovado através de um processo fisiológico de reabsorção de osso antigo e formação de osso novo, fundamental para a saúde óssea ao longo da vida[14], [16]. Desta forma, o osso é considerado um bom biomarcador da concentração de alguns elementos traço, devido à sua significativa taxa de renovação, estando constantemente a integrar novos minerais. Assim sendo, a análise da constituição de um osso pode fornecer-nos informações *ante-mortem* relativas ao tipo de ambiente e ao tipo de alimentação praticada pelo indivíduo cujas ossadas se analisaram. É importante, no entanto, salientar que a morfologia e a composição ósseas podem sofrer alterações *post-mortem*[5] devidas, por exemplo, ao tipo de solo em que os corpos foram sepultados, bem como às condições meteorológicas a que o local de sepultura esteve sujeito. Estudos sugerem que os ossos esponjosos são mais suscetíveis a contaminação *post-mortem*, ao passo que os ossos compactos são mais representativos das condições *in vivo*[15], [17].

Elementos Químicos no Organismo

1. Elementos Essenciais e Não Essenciais

No organismo humano há um conjunto de elementos químicos que são cruciais para que o sistema biológico funcione corretamente, aos quais se chama elementos essenciais. Descreveu-se inicialmente um elemento essencial como aquele que é obrigatório para a vida e cuja ausência resulta na morte do organismo. Mais tarde, foi proposta uma definição mais abrangente de elemento essencial, sendo a mais aceita: um elemento é essencial quando a toma insuficiente do mesmo resulta, de forma consistente, no comprometimento de determinada função; e quando a suplementação do mesmo (em quantidades coerentes com as requeridas), mas não de outros, previne ou resolve esse comprometimento[18].

Os elementos essenciais podem ser classificados como maioritários, traço e ultra-traço, de acordo com a maior ou menor concentração com que devem estar presentes no organismo, respetivamente. Os elementos maioritários são os elementos que mais estão envolvidos na formação de ligações covalentes e são constituintes importantes dos diferentes tecidos (C, O, H, N). Constituem cerca de 96% da massa total do corpo[19], [20].

Os elementos traço essenciais são necessários para o ser humano em quantidades que variam entre os 50 µg e os 18 mg por dia[18], constituindo, maioritariamente, componentes estruturais de enzimas e cofatores, cujos papéis principais passam por prevenir défices nutricionais, regular a expressão genética, prevenir doenças crónicas e desempenhar funções no sistema imunitário. Cada um deles representa menos de 0,01% da massa total do corpo, e, em conjunto, representam menos de 1% da mesma.

São absorvidos no trato gastrointestinal e incluem o Cr, Co, Cu, I, Fe, Mn, Mo, Se e Zn[21]. Embora a essencialidade do F para o normal funcionamento de um organismo ainda não tenha sido comprovada, pode ser considerado um elemento essencial devido ao seu impacto na saúde dos dentes[18].

As deficiências em elementos traço são pouco frequentes, especialmente por serem necessários em quantidades tão pequenas, a não ser quando ocorrem alterações dramáticas na dieta do indivíduo, ou quando o metabolismo de elementos traço está, de alguma forma, comprometido. Desequilíbrios moderados ou severos destes elementos são considerados fatores de risco para várias doenças[18], [20].

De seguida, apresentam-se com maior pormenor os elementos traço, essenciais e não essenciais, mais relevantes para o presente trabalho.

Magnésio

O Mg é requerido em inúmeras funções biológicas e é cofator em mais de trezentas enzimas envolvidas na síntese proteica, funções musculares e nervosas, controlo da glicose no sangue e regulação da pressão arterial.

Os alimentos com maior teor de Mg são os espinafres, leguminosas, frutos secos, sementes, cereais integrais, algumas especiarias, cacau e vegetais.

Embora o défice em Mg seja pouco comum, ocorre essencialmente devido ao consumo insuficiente dos alimentos supramencionados. Os sintomas de um défice moderado incluem perda de apetite, náuseas, vômitos, cansaço, dormência, taquicardia, delírios e alucinações[22].

Crómio

É responsável pelo aumento significativo da atividade enzimática e desempenha funções importantes no metabolismo dos hidratos de carbono, estimulação de ácidos gordos, síntese de colesterol no fígado e na ativação da insulina[22].

A maioria dos alimentos fornece quantidades muito reduzidas de Cr, sendo as melhores fontes as gemas de ovo, cereais integrais, café, frutos secos, feijão verde,

brócolos, carnes e levedura de cerveja. Alimentos como os laticínios e a maioria das frutas e vegetais contêm quantidades ínfimas de Cr[22], [23].

O déficit em Cr em humanos é raro e ocorre quando se verifica intolerância à glucose ou resistência à insulina em pacientes sujeitos a alimentação parentérica a longo prazo[22]. Esse déficit manifesta-se através de sinais e sintomas semelhantes a diabetes tipo II, neuropatia, níveis de ácidos gordos elevados no plasma e aterosclerose. Visto que é excretado através dos rins, o Cr não deve ser suplementado por pacientes em falência renal.

A toxicidade por Cr é uma doença ocupacional comum em soldadores e a exposição contínua pode causar úlceras crônicas da pele e dermatite irritativa aguda. Inalação de compostos ricos em Cr causam irritação do trato respiratório, rinite, broncoespasmo e pneumonia[21], [23].

Manganês

Cerca de 43% do Mn no corpo é encontrado no sistema esquelético, sendo que o restante se concentra em tecidos moles, como o fígado, pâncreas, rins e cérebro, bem como no sistema nervoso central. Este está envolvido no metabolismo dos lípidos e hidratos de carbono e na absorção de cálcio e regulação dos níveis de glicose no sangue. Auxilia na formação de tecido conjuntivo, osso, fatores coagulantes e hormonas sexuais, e é necessário para um funcionamento normal do sistema nervoso.

É encontrado em leguminosas secas, frutos secos, sementes, gérmen de trigo e alimentos integrais (trigo sarraceno, bulgur, centeio, aveia, arroz integral e milho), ananás, diversos chás, salsa, vegetais com folhas verdes e tubérculos. Alimentos como os laticínios, carnes, peixes e marisco não são boas fontes de Mn[22].

Como os valores de referência para o Mn são tão baixos, o déficit é raro e pode causar dermatite, mudanças de cor no cabelo, anormalidades no sistema esquelético, alterações na tolerância à glucose, infertilidade, surdez e prejudicar a síntese de fatores coagulantes dependentes da vitamina K[21].

A acumulação de Mn a longo prazo causa anorexia, apatia, cefaleias, impotência, câibras nas pernas, problemas de fala e síndromes semelhantes a encefalite e à doença

de Parkinson, podendo ocorrer psicose[23]. A toxicidade tem sido reportada especialmente em pacientes com doenças hepáticas[21]. Estudos demonstram que concentrações elevadas no cérebro, especialmente ao nível dos gânglios basais, estão associadas a distúrbios neuronais semelhantes à doença de Parkinson[22].

Ferro

A maioria do Fe no corpo encontra-se na hemoglobina, responsável pelo transporte do oxigénio dos pulmões até aos restantes tecidos. É essencial para o crescimento e desenvolvimento, bem como para o funcionamento normal das células e para a síntese de algumas hormonas e tecido conjuntivo. É ainda um componente fundamental da mioglobina, que fornece oxigénio aos músculos.

É o metal mais abundante no corpo humano e encontra-se naturalmente em alimentos como carnes vermelhas, fígado, leguminosas, frutos secos, sementes, carnes de caça, peixe, marisco, tofu, vegetais com folhas verdes e melão. O Fe disponível em alimentos de origem animal (ferro heme) é mais facilmente absorvido no organismo do que aquele que está disponível em alimentos de origem vegetal.

O défice em Fe é o défice nutricional mais comum do mundo. Quando se torna severo, provoca anemia ferropénica, cujos sintomas mais vulgares são cansaço, fraqueza, palidez nas mãos e nas pálpebras, tonturas, perda de cabelo, irritabilidade e unhas frágeis e quebradiças.

Quando os níveis de Fe estão drasticamente elevados, verificam-se sintomas como náuseas, vómitos, diarreia e ocorrem danos hepáticos[22].

Níquel

Embora a sua função no corpo humano ainda não esteja bem definida, o Ni é considerado um elemento ultra-traço essencial. No organismo, encontra-se em maiores quantidades nos ácidos nucleicos (particularmente no RNA) e pensa-se que esteja envolvido na estrutura e/ou função de proteínas.

No que toca a fontes alimentares, encontra-se naturalmente presente em alimentos de origem vegetal, enquanto os alimentos de origem animal são pobres neste elemento[24]. Os alimentos mais ricos em Ni são os frutos secos (como nozes e avelãs), leguminosas, chocolate, aveia, trigo sarraceno, cevada e milho. Também ocorre naturalmente em cinzas vulcânicas e em rochas e solos.

Estudos demonstram que a exposição aguda ao Ni pode causar problemas hepáticos, renais e cerebrais, danos ao nível dos tecidos, eczema vesicular e cancro pulmonar[22].

Cobre

O Cu é um componente essencial em muitas enzimas e coenzimas, estando envolvido em diversas reações metabólicas. É fundamental para os sistemas hematológico e neurológico, sendo necessário no processo de cicatrização de feridas, na síntese de colagénio, no crescimento e formação ósseos, na formação de bainhas de mielina e no auxílio da incorporação do Fe na hemoglobina, bem como na absorção do mesmo no trato gastrointestinal[21]–[23].

Encontra-se em alimentos como trigo, cevada, sementes de sésamo, amêndoas, nozes, nozes pecan, amendoins, cajus, ameixas, uvas passas, alperces, feijões secos, cogumelos, frango e na maioria dos peixes[22].

Uma vez que o Cu é armazenado em grandes quantidades no fígado, o défice em Cu é raro em pessoas com uma alimentação saudável, salvo em pessoas sujeitas a cirurgias gástricas, como bypass gástrico, nas quais é comum ocorrer má absorção do nutriente. Deficiência em Cu resulta em doenças hematológicas, como anemia, neutropenia e diminuição do número de leucócitos, descoloração da pele e fadiga.

Toxicidade por Cu apresenta-se como gastroenterite, anemia hemolítica, hepatite, cirrose, distúrbios comportamentais e de personalidade, e deficiência cognitiva[21]–[23].

Zinco

É componente de mais de duzentas enzimas importantes para o sistema imunitário a desempenha funções catalíticas e estruturais. É um elemento essencial que funciona como cofator para determinadas enzimas envolvidas no metabolismo e no crescimento celulares. É necessário no processo de cicatrização de feridas e regeneração, no equilíbrio ácido-base, no metabolismo dos ovários e testículos, e na função hepática[21], [22].

É o segundo metal mais presente no corpo humano (a seguir ao Fe) e está presente em alimentos como trigo, arroz integral, aveia, lentilhas, soja, ervilhas secas, feijão frade, nozes, amendoins, cajú, castanhas do Brasil, vários queijos, fígados, carnes (vaca, carneiro, frango e peru), peixes e marisco[22].

O déficit em Zn ocorre, especialmente, devido ao baixo consumo dos alimentos mencionados acima. Pode causar dificuldades no processo de cicatrização de feridas, disfunções imunológicas, anorexia, diarreia, queda de cabelo, dermatite e depressão. Em crianças e adolescentes, pode causar pneumonias e atrasos cognitivos, problemas comportamentais, falta de memória e prejudicar o sistema imunitário.

Em casos mais severos, pode causar atrasos no desenvolvimento sexual, impotência, hipogonadismo em indivíduos do sexo masculino, lesões ao nível da pele e dos olhos, alterações no paladar e letargia.

Toxicidade por Zn, devida à suplementação excessiva por longos períodos de tempo, causa anemia sideroblástica[21], [22].

Bromo

À semelhança do Ni, o Br é considerado um elemento traço essencial, mesmo que ainda não se conheçam ao certo as funções que desempenha no organismo.

O Br encontra-se amplamente disponível na natureza, sendo que 99% se encontra nas águas do mar. Assim sendo, as melhores fontes alimentares serão as que provêm diretamente do mar ou de ambientes próximos a ele. Peixes, algas e marisco são os alimentos mais ricos em Br, mas as plantas e os animais que crescem ou vivem, respetivamente, perto do mar, também costumam ser boas fontes de Br[25].

É extremamente irritante para os olhos e para a garganta, e o contacto pode levar a inflamações dolorosas. A toxicidade ocorre para quantidades muito pequenas (10 $\mu\text{g/g}$), e ocorre essencialmente por via da inalação, ou por exposição dérmica. Pode conduzir a danos nos rins, cérebro e sistema nervoso, apresentando uma dose letal de 14 $\mu\text{g/g}$ [26].

Estrôncio

O Sr não é considerado um elemento traço essencial, já que não se conhecem funções biológicas do mesmo. Ainda assim, está presente na grande maioria dos seres vivos devido ao facto de ser estruturalmente similar ao Ca e, como tal, poder substituí-lo nas partes inorgânicas dos ossos[27], [28].

Os seres humanos entram em contacto com este elemento especialmente através da sua dieta. A quantidade de Sr presente num organismo diminui com o aumento do nível trófico, o que implica que as plantas são os elementos com teor de Sr mais elevado. No que toca a animais, os herbívoros apresentam maior quantidade relativa de Sr do que os omnívoros, e estes do que os carnívoros. Assim sendo, o Sr é um bom indicador de uma dieta rica em vegetais. Dos alimentos com maior teor em Sr destacam-se as especiarias, os vegetais verdes, os tubérculos, os cereais e as leguminosas[27].

2. Elementos Tóxicos

Um elemento diz-se tóxico para um organismo quando se encontra presente em concentrações superiores às adequadas, pelo que até mesmo elementos essenciais podem ser considerados tóxicos aquando de um aumento significativo da sua concentração. Há, no entanto, elementos considerados tóxicos mesmo em concentrações muito reduzidas, como é o caso do Pb e do Hg[2], [18].

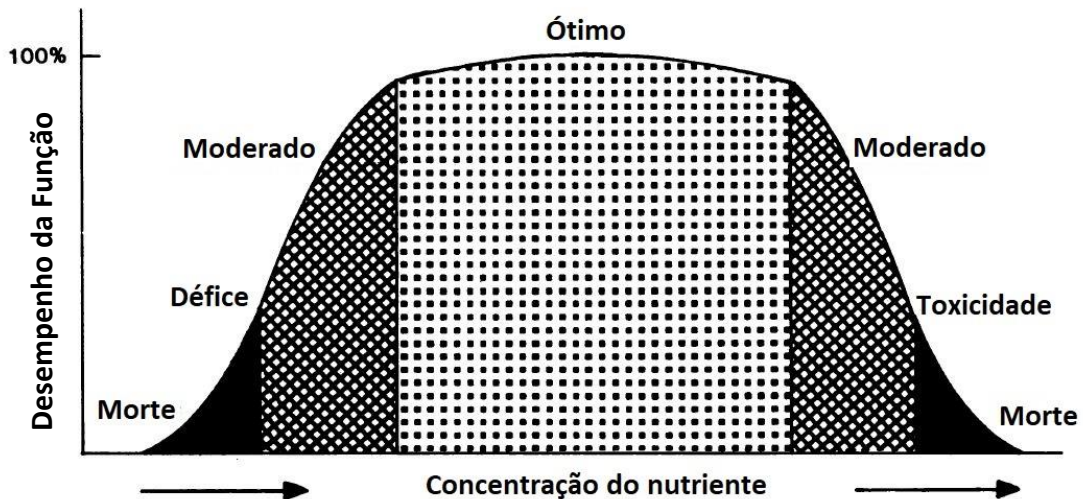


Figura 3 - Variação do desempenho de uma função biológica, dependente de um elemento essencial, de acordo com a concentração desse mesmo elemento no tecido. Adaptada da referência [18].

Na figura 3 encontra-se o gráfico da variação do desempenho de uma função biológica, dependente de um elemento essencial, de acordo com a concentração desse mesmo elemento no tecido. A Lei de Bertrand[18] afirma que a função para a qual um elemento é essencial é muito baixa ou inexistente no caso de deficiência absoluta e aumenta com o aumento da exposição a esse elemento essencial. Este aumento é seguido por um *plateau*, que representa a manutenção do estado ótimo por regulação homeostática, e este, por sua vez, é seguido por um decréscimo dessa mesma função, à medida que os mecanismos de regulação são dominados por concentrações de elemento essencial cada vez maiores, que se tornam tóxicas.

Deste modelo podem retirar-se duas conclusões relevantes para a compreensão dos estudos de elementos traço: para cada elemento, há uma janela para a exposição segura e adequada, na qual a homeostasia mantém a concentração ótima em tecidos; e todos os elementos traço são potencialmente tóxicos quando a janela de exposição segura e adequada é excedida[18].

De seguida, apresentam-se, de forma mais pormenorizada, os elementos traço com maior toxicidade que são mais relevantes para o presente trabalho.

Arsénio

Embora tenha elevada toxicidade e ainda não se conheçam funções biológicas deste elemento, o As é considerado um elemento traço essencial. Isto deve-se maioritariamente ao elevado número de respostas negativas ao défice em As registado em diferentes espécies animais, que sugerem veemente a sua essencialidade para o ser humano. Além disso, experiências *in vitro* e em animais apontam para possíveis funções deste elemento no metabolismo de moléculas do grupo metil e, conseqüentemente, no processo de metilação de moléculas como o ADN[29].

Quando presente no organismo, acumula-se tanto nos tecidos moles, como nos tecidos duros. A exposição ao As pode ocorrer por inalação, ingestão ou por contacto com a pele. Para a maioria das pessoas, a dieta é a maior fonte de exposição a este elemento, quer às suas formas orgânicas e não tóxicas, quer às suas formas inorgânicas e tóxicas. Os alimentos com maior teor inorgânico de As são as frutas, as leguminosas e os cereais, provavelmente por crescerem em solos contaminados. Alimentos ricos em arsenobetaína, como o marisco, são ricos na sua forma orgânica[30].

A intoxicação por As pode ser crónica ou aguda. No caso de intoxicação crónica, os sintomas mais comuns abarcam lesões cutâneas, doenças respiratórias e cardiovasculares, neuropatia periférica, e diferentes tipos de cancro (pele, pulmões, rins, bexiga e fígado). A intoxicação aguda por As provoca toxicidade do miocárdio, doenças ao nível dos rins, fígado e trato gastrointestinal e, em casos severos, falência do tronco cerebral e morte[31].

Chumbo

O Pb é um elemento de extrema importância, devido às suas características tóxicas, e é um metal muito comum, estando presente na água, em tintas, baterias, inseticidas e gasolina. É rapidamente absorvido para a corrente sanguínea por inalação, ingestão ou por contacto com a pele. Quando entra no organismo, distribui-se pelo sangue, pelos tecidos moles, como os rins, medula óssea, fígado e cérebro, e pelos tecidos mineralizados, como os ossos e os dentes.

Não se conhecem benefícios do Pb no corpo humano. Pelo contrário, sabe-se que pode afetar quase todos os órgãos do corpo, provocando danos no cérebro, rins, sistema nervoso, sistema reprodutivo e pode provocar pressão arterial elevada.

A toxicidade crónica ocorre quando o seu nível no sangue cerca os 40-60 µg/dL[22], [32].

Cádmio

Uma vez que lhe são desconhecidas funções biológicas, e como não há evidências que sugiram a sua essencialidade, o Cd é um elemento traço não essencial ao organismo humano.

Está presente em muitos fertilizantes e nas águas residuais de determinadas indústrias. Assim, plantas que crescem em solos contaminados, bem como animais que se alimentam delas, tornam-se, eles próprios, fonte de contaminação. Também se encontram elevados níveis de Cd em certos peixes e crustáceos. O consumo desses alimentos constitui a forma mais comum de exposição a este metal[33].

Atualmente, existem duas teorias que explicam os mecanismos de ação do Cd nos ossos: ação direta nas células do tecido ósseo; ou ação indireta, induzindo falência renal e, conseqüentemente, aumentando a excreção de Ca e P, reduzindo a síntese de vitamina D e, assim, diminuindo a absorção do Ca ao longo do trato digestivo.

Estudos demonstram, por exemplo, que o Cd é responsável por induzir apoptose osteoblástica, bem como fragmentação do ADN. Níveis excessivos de Cd no organismo provocam falência renal, osteoporose e aumentam o risco de fraturas. A exposição crónica a este metal provoca a diminuição do volume ósseo[34].

1. Fluorescência de Raios-X

Os elementos traço nos ossos são fonte de interesse e têm vindo a ser estudados desde há muitos anos. A sua análise por Fluorescência de Raios-X (XRF) tornou-se mais usual na década de 60[1], depois de Roberts *et al.* terem estimado, em 1959, a concentração de Sr em ossos de animais com recurso a esta técnica[35]. Antes disso, era comum recorrer-se à espectroscopia de emissão ótica, tal como fizeram Thurber *et al.*, para avaliar a concentração de Sr em amostras de ossos humanos[36], e à fotometria de chama, tal como fizeram Harrison *et al.*, para estimar a concentração de Sr em amostras de materiais biológicos humanos, como ossos e excreções[37]. Na Figura 4 encontra-se um esquema da evolução das técnicas utilizadas para a análise de elementos traço nos ossos, bem como um resumo das suas principais características.

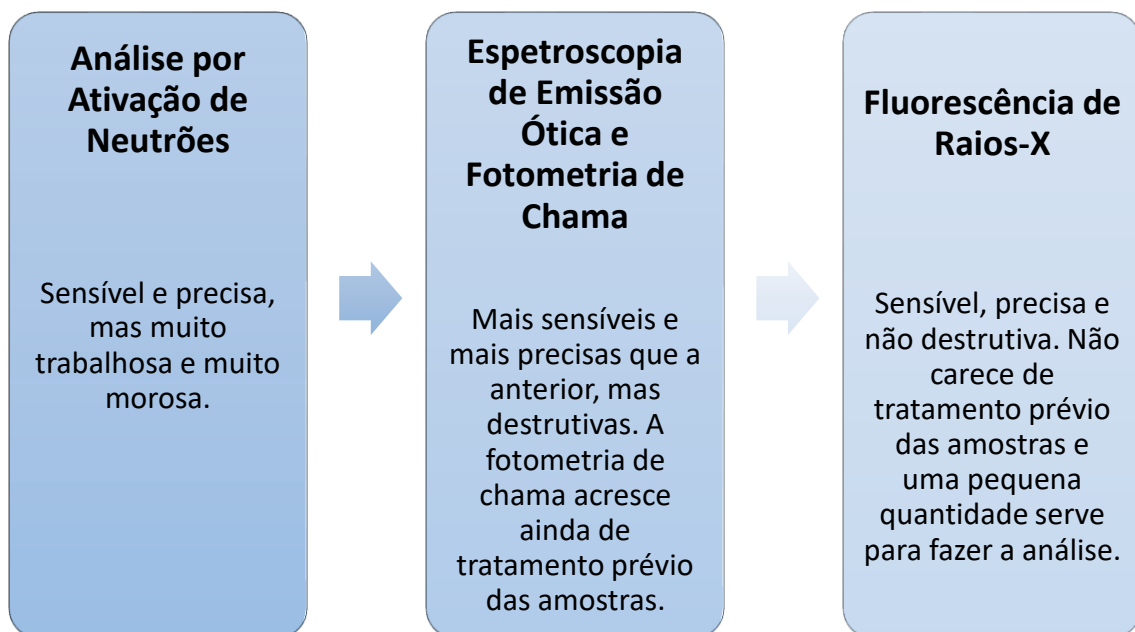


Figura 4 - Esquema da evolução das técnicas usadas na análise de elementos traço nos ossos e principais características. Construído com base nas referências [35]-[37].

A análise de elementos traço em ossos humanos passou a ser comumente feita através de XRF e o mapeamento da distribuição espacial desses mesmos elementos por Fluorescência de Raios-X Dispersiva em Energia (EDXRF)[38]–[40].

Em 2000, Carvalho *et al.* usaram EDXRF com geometria triaxial para analisar a concentração de elementos traço em fragmentos de ossos do período Calcolítico. Os resultados revelaram elevadas concentrações de Br e de Sr, que foram associadas à influência do ambiente e de hábitos alimentares, especialmente da ingestão de alimentos ricos em proteína, como marisco. As amostras de ossos revelaram ainda elevadas concentrações de Mn, possivelmente devidas à contaminação do solo do local onde os cadáveres haviam sido sepultados[41]. A mesma metodologia foi usada em 2003 para analisar ossos humanos do período Neolítico e comparar os resultados. Verificou-se uma maior concentração de Pb em ossos contemporâneos do que em ossos dos períodos Neolítico e Calcolítico, atribuída à contaminação do solo na altura do estudo, concordante com resultados obtidos em estudos *in vivo*. Foi detetada a maior concentração de Cu em ossos do Calcolítico, que poderá estar relacionada com os utensílios de cobre usados para cozinhar naquele período, conhecido como Idade do Cobre. A pequena concentração de Sr nos ossos do Neolítico foi atribuída a hábitos alimentares pobres em carne e peixe e as elevadas concentrações de Br em amostras de ambos os períodos foram atribuídas à proximidade do mar a que viviam estes indivíduos[42].

Em 2008, Carvalho *et al.* serviram-se da EDXRF para analisar a composição de ossos humanos corticais e trabeculares de uma população que viveu na Idade Média, com o objetivo de determinar de que forma o processo de diagénese afetaria a integridade do osso durante a sepultura. Os resultados mostraram que as concentrações de Zn e de Sr não foram afetadas pelo processo de diagénese, pelo que refletem condições *ante-mortem*, sendo bons indicadores de condições *in vivo*. Foi possível concluir que os ossos compactos são muito menos suscetíveis a contaminações por elementos presentes no local de sepultura, sendo que as elevadas concentrações de Pb indicaram uma contaminação *post-mortem* bastante significativa[43].

Em 2015, Dias *et al.* avaliaram as diferenças na distribuição do Pb em ossos e dentes humanos com recurso a técnicas de XRF. Relacionaram a acumulação de Pb com a contaminação *ante-mortem* e *post-mortem* e compararam a sua concentração em

diferentes tecidos. Os resultados confirmaram que o osso esponjoso é mais propenso a alterações *post-mortem* do que o osso compacto, sendo a concentração de Pb em osso esponjoso cerca do dobro da concentração em osso compacto para a mesma amostra[1].

Em 2016, Guimarães *et al.* usaram técnicas de XRF para identificar contaminações *post-mortem* em ossos humanos dos séculos XVIII e XIX. Os resultados mostraram que, enquanto os níveis de Ca e de Sr se mantiveram constantes, as concentrações de Fe, Zn, Br, Cu e Pb eram variáveis, embora não tivessem conseguido estabelecer uma relação clara entre os depósitos destes elementos e o tipo de ossos (cortical ou trabecular). Verificou-se também que os elementos Zn, Pb e Cu se acumulavam maioritariamente na periferia do osso, indicando que a contaminação ocorreu *post-mortem*[5].

Em 2020, Santos estudou estruturas ósseas dos II e I Milénios A. N. E., provindas de Vila Nova de Cacela (Algarve, Portugal), para avaliação da contaminação por metais pesados através de técnicas de XRF. Concluiu que a exposição da população a metais pesados tóxicos, como o Pb e o Cd, seria reduzida e pôde aferir que a pesca seria a principal atividade económica, o peixe o alimento mais presente na dieta dos indivíduos estudados e que as ferramentas e utensílios usados seriam possivelmente feitos de Cu[7].

2. Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman teve origem em 1928, quando C. V. Raman publicou um artigo no qual fez a descrição da observação experimental da dispersão inelástica da luz visível[44].

Embora o efeito Raman tenha sido descoberto há quase um século, só começou a ser visto como um método extremamente flexível e aplicável a quase todas as áreas da ciência nas últimas décadas. Este renascimento da espectroscopia Raman foi maioritariamente despoletado pelos avanços na tecnologia dos lasers, pelo design de novos filtros, capazes de suprimir a radiação dispersa elasticamente (efeito de Rayleigh), e pelo desenvolvimento de detetores extremamente sensíveis[45], [46]. Além disso, a

redução significativa dos tempos de aquisição com a detecção multicanal permitiu uma melhoria considerável na razão sinal-ruído e, como tal, um melhor sinal[45].

A espectroscopia Raman começou por ser usada para providenciar a “impressão digital” que permite determinar a composição e a estrutura molecular de um vasto grupo de materiais. Aliando este ao facto de ser não invasiva e potencialmente não destrutiva, estas características fazem desta técnica uma boa opção quando se pretende caracterizar materiais no ramo das ciências da vida e forenses, ou em investigações arqueológicas.

Mais recentemente, a espectroscopia Raman também tem vindo a ser utilizada em aplicações biomédicas, incluindo a avaliação da estrutura dos ossos, através de marcadores indicativos da saúde dos mesmos[47]. Desses marcadores, destacam-se a medição da largura a meia altura da banda de alongamento simétrico do ião fosfato[48] e o cálculo do rácio entre as componentes mineral e orgânica. A substituição dos iões de carbonato pelos iões de fosfato nos ossos diminui a cristalinidade e aumenta o número de imperfeições e, como tal, a avaliação do grau dessa substituição também constitui uma medida da saúde óssea[49].

Estudos de diferentes doenças ósseas indicam que a espectroscopia Raman pode ser utilizada como ferramenta de diagnóstico[50]–[56].

Em 2010, Raghavan *et al.* provaram que é possível obter, de forma simultânea, informações qualitativas respeitantes à composição do tecido ósseo e informações quantitativas referentes à orientação dos componentes mineral e orgânico nesse mesmo tecido, usando espectroscopia Raman polarizada para analisar ossos de ratos[57].

Em 2011, Morris *et al.* fizeram a revisão da literatura com o objetivo de avaliar o uso da espectroscopia Raman para medir a qualidade dos ossos, através dos rácios mineral/matriz e carbonato/fosfato e da cristalinidade mineral. Salientaram como principal ponto forte desta técnica, além do facto de ser uma boa ferramenta para medir a qualidade óssea, a sua aplicabilidade *in vivo*, em animais ou humanos[48].

Também em 2011, Nyman *et al.* analisaram vários espectros obtidos através da espectroscopia confocal de Raman e compararam-nos com resultados anteriores relativos a amostras ósseas de ratos, de modo a aferir a sua capacidade de distinguir diferentes tecidos intracorticais de ossos humanos. Verificou-se uma discrepância entre tecido ósseo de ratos e de humanos, que poderá ser explicada pelas diferenças nos

períodos da segunda mineralização entre as espécies. Os resultados permitiram concluir também que os minerais se tornam mais cristalinos com o tempo[58].

Em 2020, Shah recorreu à espectroscopia Raman de alta resolução para examinar a sobreposição das contribuições das componentes orgânica e inorgânica, em tecidos ósseos de bovinos e de humanos, por forma a refinar o procedimento da aplicação da técnica de espectroscopia de Raman enquanto método para a avaliação da composição dos ossos[59].

Técnicas Analíticas

1. Técnica Analítica de Fluorescência de Raios-X

1.1. Raios-X e a sua interação com a matéria

Os raios-X são ondas eletromagnéticas que se encontram, no espectro da radiação eletromagnética, entre as radiações gama e ultravioleta, com comprimentos de onda entre os 0,001 nm e os 10 nm, o que corresponde, aproximadamente, ao intervalo de energias de 0,125 keV a 125 keV[60]. Como são detentores de uma energia bastante elevada, são capazes de provocar a ionização da matéria e de originar danos biológicos.

Quando os raios-X interagem com um determinado material, a sua intensidade é atenuada, devido aos processos de interação dos fótons de raios-X com os eletrões dos átomos que constituem esse material[61]. Essa interação pode provocar a absorção completa dos fótons pela matéria, ou provocar a dispersão dos mesmos, com ou sem perda de energia, dependendo da energia do feixe incidente e dos átomos que constituem a matéria.

Efeito fotoelétrico: dos processos de interação dos raios-X com a matéria, o efeito fotoelétrico é o dominante. O átomo absorve a totalidade da energia do fóton incidente e, caso essa energia exceda a de ligação de uma orbital, o eletrão é ejetado, provocando a ionização do átomo e criando uma lacuna nessa orbital[62], tal como ilustrado na figura 5. Esse eletrão segue animado de uma energia cinética numericamente igual à diferença entre as energias do fóton incidente e de ligação do eletrão na orbital da qual foi ejetado.

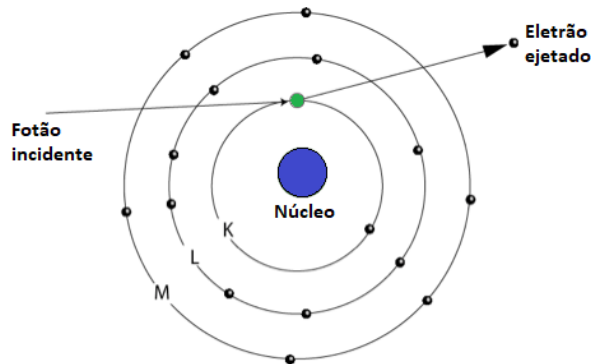


Figura 5 - Esquema ilustrativo do efeito fotoelétrico. Adaptado da referência [63].

Dispersão de Rayleigh: o fóton interage com um átomo como um todo. O átomo não absorve energia, pelo que o fóton sofre dispersão e mantém a mesma energia dos fótons incidentes (dispersão elástica), não ocorrendo ionização do átomo. A radiação emitida é difundida em todas as direções[61].

A probabilidade de ocorrência deste fenômeno é maior para baixas energias e Z elevados[64], [65].

Dispersão de Compton: dá-se uma colisão entre um fóton e um elétron de valência fracamente ligado (elétron "livre"). O fóton cede parte da sua energia inicial ao elétron de recuo e sofre deflexão com um ângulo θ , diferente do ângulo inicial de incidência[62], tal como ilustrado na figura 6. Uma vez que o elétron de valência possui uma energia de ligação baixa, pode então ser ejetado, provocando, assim, a ionização do átomo.

Este efeito é mais provável para fótons incidentes com energias elevadas e para materiais de baixo Z, tal como amostras de material biológico, já que são constituídas essencialmente por elementos leves[65].

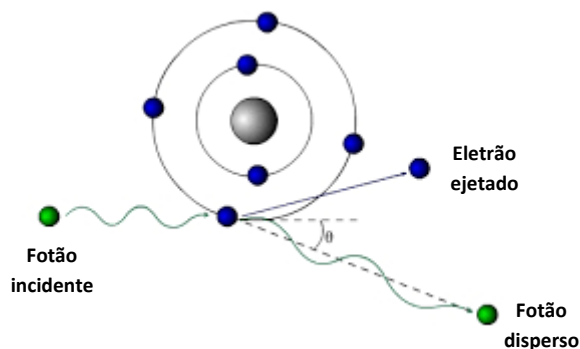


Figura 6 - Esquema ilustrativo da dispersão de Compton. Adaptado da referência [63].

Os processos de dispersão não contribuem para a identificação da amostra estudada, além de que induzem o aumento do fundo do espectro[61].

1.2. Produção de Raios-X

Os raios-X podem ser produzidos por desaceleração de partículas carregadas, como elétrons, prótons, íons e partículas α (provocando emissão de radiação de *Bremsstrahlung*); transições eletrônicas de elétrons nas camadas internas dos átomos (provocando emissão de radiação característica do átomo) ou decaimento de fontes radioativas[66].

A radiação de *Bremsstrahlung* resulta da emissão contínua de fótons de raios-X e é provocada por elétrons que, ao interagirem com os núcleos dos átomos do material do alvo, sofrem desaceleração e desvios na direção do seu movimento.

Quando as camadas mais internas dos átomos constituintes da amostra sofrem ionização, o átomo pode voltar ao estado fundamental por via de dois processos alternativos, nomeadamente, fluorescência de raios-X, com produção de radiação X característica do átomo, ou efeito de Auger, sem produção de radiação X característica do átomo.

A fluorescência de raios-X é o processo através do qual, após ionização, um elétron de uma camada mais exterior transita para orbitais mais internas, por forma a preencher a lacuna existente. A radiação decorrente deste processo designa-se por fluorescência e a sua energia é consequência do Z do átomo que a emite, pelo que é característica do átomo em estudo[66]–[68].

O efeito de Auger é o processo através do qual, após ionização, se verifica o rearranjo do cortejo eletrónico, sendo que o excesso energético do átomo pode provocar uma segunda ionização, através da ejeção de um elétron de uma camada periférica, mas sem emissão de radiação X característica do átomo.

A figura 7 esquematiza a fluorescência de raios-X e o efeito de Auger.

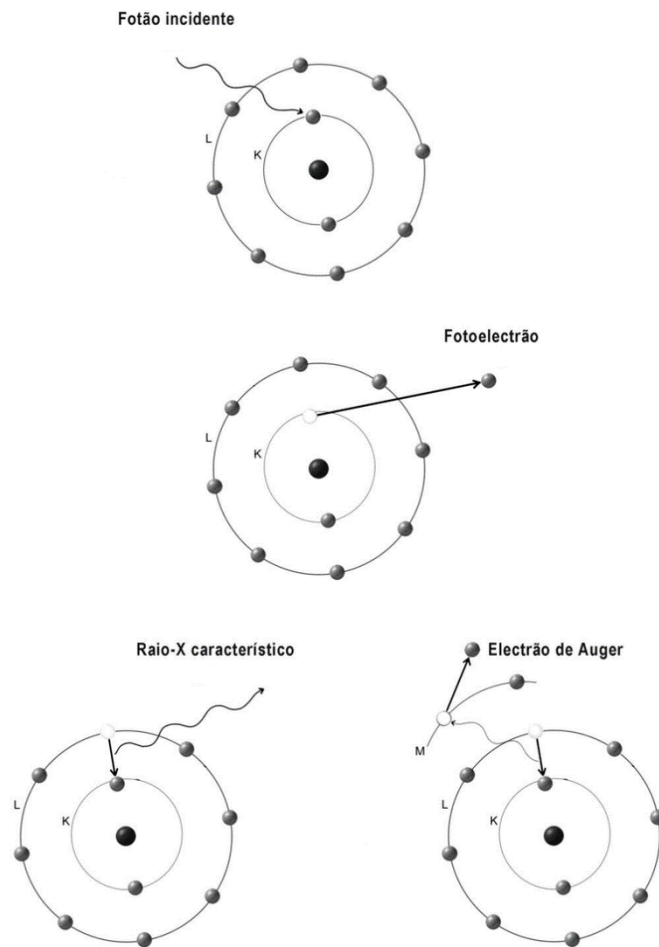


Figura 7 -Esquema ilustrativo dos processos de reorganização atômica após ionização: fluorescência de raios-X e efeito de Auger. Adaptado da referência [69].

O rendimento de fluorescência, ω , corresponde à probabilidade do preenchimento de uma lacuna resultar na emissão de radiação X característica do átomo. Por sua vez, o rendimento de Auger, α , corresponde à probabilidade de reorganização por efeito de Auger. Considerando apenas o nível K, os rendimentos de fluorescência, ω_K , e de Auger, α_K , para essa camada são complementares, sendo que $\alpha_K = 1 - \omega_K$.

Na figura 8, abaixo, encontra-se o gráfico que traduz a variação do rendimento de fluorescência em função do número atômico. É possível verificar que, para elementos de baixo número atômico ($Z < 30$), o efeito de Auger é predominante, uma vez que $\omega_K < 0,5$ e, como tal, $\alpha_K > 0,5$. Para elementos com $Z > 30$, $\omega_K > 0,5$ e, assim, predomina o processo de fluorescência.

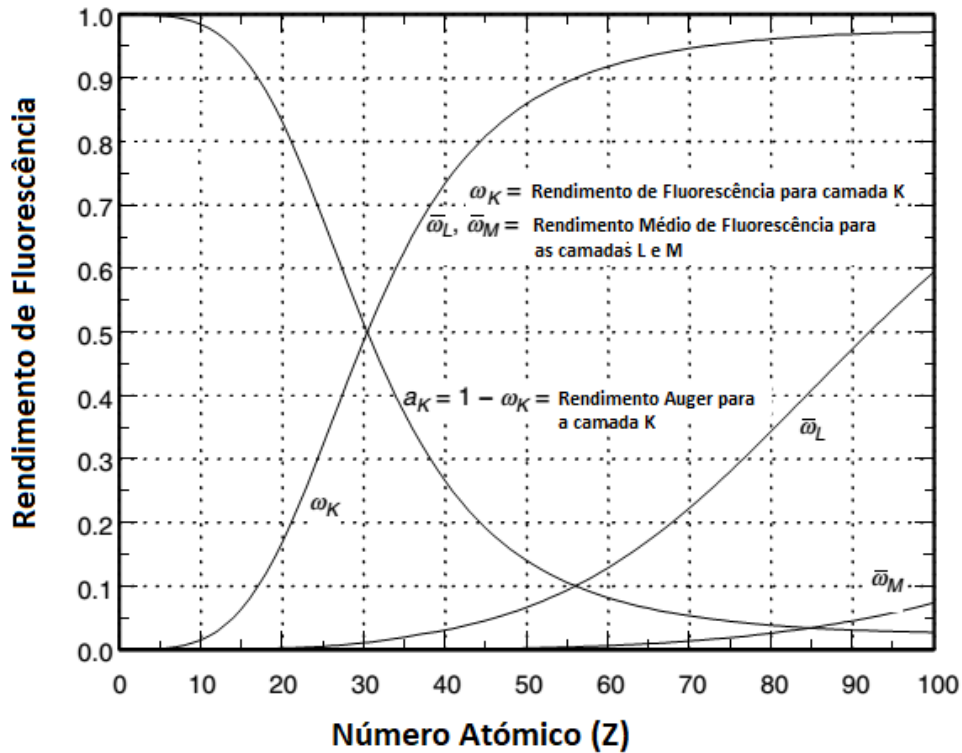


Figura 8 - Rendimento de fluorescência em função do número atômico. Adaptada da referência [70].

1.3. Princípios Físicos da Espectroscopia de Fluorescência de Raios-X

A espectroscopia de fluorescência de raios-X é uma técnica de análise elementar não destrutiva que permite os estudos quantitativo e qualitativo da maioria dos elementos ($Z > 11$) em diversas amostras.

Ao bombardear-se certa amostra com fótons de raios-X, é possível instigar transições eletrônicas entre as orbitais mais internas dos átomos que a constituem. Estas transições provocam emissão de radiação de fluorescência, de energia característica, que é independente da ligação química dos mesmos. A identificação do elemento é feita com base na energia da radiação de fluorescência (análise qualitativa), ao passo que a concentração desse elemento na amostra analisada se baseia na intensidade da radiação de fluorescência, ou seja, no número de fótons de raios-X emitidos durante uma aquisição (análise quantitativa)[71], [72].

Esta técnica constitui uma excelente ferramenta para estudar o conteúdo de amostras de tecido biológico em elementos traço, já que permite detectar simultaneamente vários elementos, mesmo que se encontrem em baixas concentrações[3].

1.4. Fluorescência de Raios-X Dispersiva em Energia

A fluorescência de raios-X dispersiva em energia é uma técnica não destrutiva capaz de determinar a concentração de vários elementos em simultâneo, quer sejam elementos maioritários, quer sejam elementos traço[73]. Tem, no entanto, limitações na deteção de elementos com $Z < 11$, o que impossibilita a identificação de componentes orgânicos, especialmente porque, nessa gama de Z , ocorre competição entre a XRF e o efeito de Auger.

Um sistema de EDXRF necessita de três componentes fundamentais, nomeadamente, fonte de excitação (fonte de raios-X), um detetor e um sistema de aquisição de dados[74].

Após a excitação da amostra, ocorre emissão de radiação X por fluorescência. Esta radiação é detetada por um detetor semiconductor (tipicamente de Si), que faz a contagem dos fótons e, de acordo com a energia dos mesmos, faz a sua discriminação. De seguida, esses dados são enviados para o analisador multicanal, no qual, a cada canal, corresponde uma determinada energia. As contagens acumuladas em cada canal são, depois, convertidas em intensidade dos raios-X e o *output* final consiste num espectro de raios-X de intensidade em função da energia[67].

1.5. Microfluorescência de Raios-X Dispersiva em Energia

A Microfluorescência de Raios-X Dispersiva em Energia (μ -EDXRF) utiliza um microfeixe de radiação que vai percorrendo a amostra, por forma a medir a distribuição dos elementos presentes na mesma[75]. O microfeixe é conseguido devido a lentes

policapilares que fazem a recolha dos fotões de raios-X divergentes provenientes do todo e os redirecionam, através de múltiplas reflexões totais internas nas paredes dos tubos. Na figura 9 encontra-se um esquema dos principais componentes da μ -EDXRF.

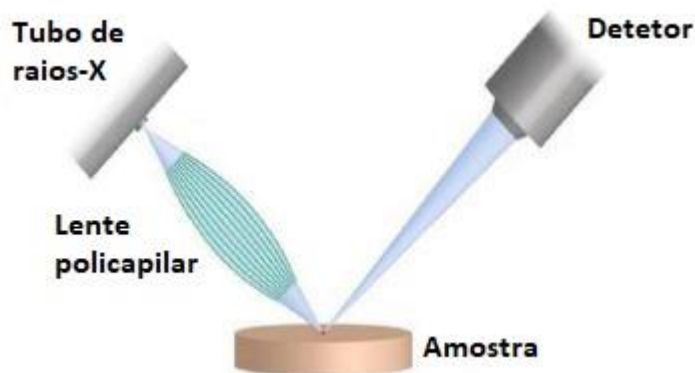


Figura 9 - Esquema dos principais componentes da μ -EDXRF. Adaptado da referência [76].

2. Técnica Analítica de Espetroscopia Raman

2.1. Princípios Físicos da Espetroscopia Raman

A técnica espectroscópica Raman baseia-se no efeito Raman e possibilita a análise de estruturas moleculares e da composição de materiais orgânicos e inorgânicos, através da identificação dos seus modos vibracionais[77]–[79], já que as bandas correspondentes aos modos vibracionais dos materiais apresentam posições específicas para determinados grupos químicos, permitindo a sua identificação.

A espectroscopia Raman consiste num método analítico não destrutivo, muito versátil e aplicável a moléculas isoladas, sistemas complexos (macromoléculas), células, tecidos, ou mesmo animais e humanos. Os materiais analisados podem ser biológicos ou sintéticos; estar no estado sólido, líquido ou gasoso; ser transparentes ou opacos; e apresentar superfícies com diferentes texturas[45], [46].

Os comprimentos de onda usados na espectroscopia Raman são significativamente mais pequenos quando comparados a técnicas baseadas em radiação infravermelha, o que faz com que a sua resolução espacial seja consideravelmente superior.

Uma das características da espectroscopia Raman na análise de tecidos *in vivo* diz respeito à baixa contribuição da água para o sinal Raman, o que se traduz numa das maiores vantagens desta técnica, visto que a maioria dos tecidos humanos é constituída por cerca de 70%-80% de água.

As principais limitações desta técnica estão relacionadas com a influência da fluorescência nos espectros Raman e com o facto de, geralmente, resultarem desta interação sinais de muito baixa intensidade, especialmente no que respeita a amostras biológicas[45].

2.2.Efeito Raman

Sempre que um material é irradiado com radiação eletromagnética, esta pode sofrer transmissão, absorção e/ou dispersão. Ao interagir com os fotões, as moléculas que constituem o material sob estudo ficam polarizadas, uma vez que a sua nuvem eletrónica interage com o campo elétrico da radiação incidente, sofrendo deformação. Isto faz com que transite para um estado de energia virtual instável, no qual os fotões são rapidamente reemitidos[80]. Este fenómeno pode ocorrer segundo dois processos diferentes, nomeadamente, dispersão de Rayleigh, já descrita, e efeito Raman.

O efeito Raman pode ser interpretado como uma colisão inelástica entre o fotão incidente e a molécula, e de onde resulta mudança da polarizabilidade da mesma durante a vibração[81]. As energias dos fotões disperso e incidente devem ser diferentes, por forma a respeitar o princípio da conservação da energia[82]–[84].

A probabilidade de ocorrer dispersão de Rayleigh é muito superior à de ocorrer efeito Raman. Como tal, verifica-se que este último é responsável pela dispersão de uma percentagem ínfima da radiação (cerca de 10^{-5})[85]. Assim sendo, embora a especificidade da espectroscopia Raman seja elevada, a sua sensibilidade, *i. e.*, a

conversão eficiente do efeito Raman, é bastante baixa, o que faz com que a detecção de moléculas presentes em concentrações muito baixas seja limitada[46].

Pode verificar-se a ocorrência de dois fenômenos distintos associados ao efeito Raman, nomeadamente, dispersão Stokes e dispersão anti-Stokes. A primeira depende da população do estado vibracional fundamental, ao passo que a última depende da população de estados vibracionais excitados[86].

A dispersão Stokes ocorre quando a molécula está, inicialmente, no estado vibracional fundamental e, depois da dispersão, fica num estado vibracional de energia mais elevado. Assim, a interação da radiação incidente com a molécula provoca a vibração do material. Por sua vez, a dispersão anti-Stokes ocorre quando a molécula está, inicialmente, num estado vibracional de energia mais elevado e, depois da dispersão, fica num estado vibracional mais baixo. Assim, a vibração existente no material é aniquilada como resultado da interação entre a radiação incidente e a molécula[45], [82], [84].

Na figura 10, abaixo, estão representadas as transições vibracionais referentes a estes dois tipos de dispersões.

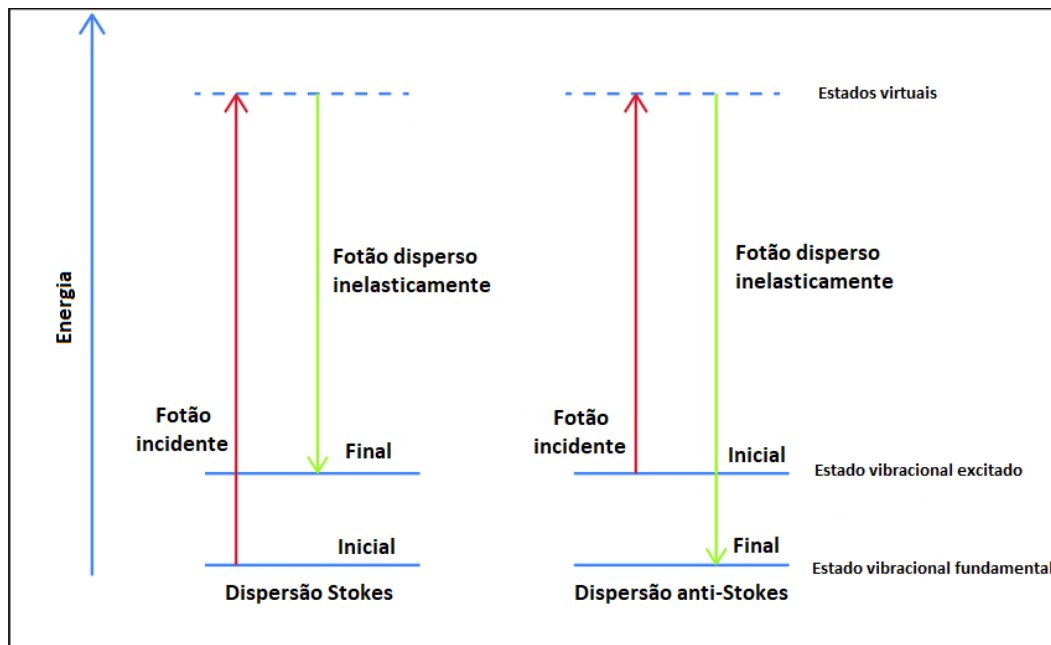


Figura 10 - Representação esquemática das transições vibracionais que ocorrem na dispersão de Stokes e anti-Stokes. Adaptada da referência [87].

À temperatura ambiente, grande parte das moléculas encontra-se no seu estado fundamental. Assim, a probabilidade de ocorrer dispersão Stokes é muito superior à de

ocorrer dispersão anti-Stokes, o que se traduz em linhas de Stokes mais intensas, comparativamente às linhas de anti-Stokes.

As intensidades relativas do sinal resultante da dispersão Stokes ou anti-Stokes sofrem alterações de acordo com a temperatura do material estudado, pelo que podem ser usadas como termómetros[45].

O posicionamento da frequência de uma banda Raman é característico da vibração de uma ligação molecular ou de um determinado grupo. O espectro vibracional de Raman resulta da combinação dessas bandas e é único para cada material, podendo ser considerado a “impressão digital” do mesmo. Como tal, quaisquer mudanças respeitantes a essa mesma “impressão digital” podem ser usadas para monitorizar ou caracterizar mudanças químicas ou físicas a nível molecular[45], [79].

2.3. Confocalidade e Espetroscopia Raman

Quando se irradiam materiais biológicos com luz visível, a maioria exhibe fluorescência que, em oposição ao efeito Raman, diz respeito a um processo de absorção e de transição para um nível eletrónico excitado, com consequente emissão de um fóton de fluorescência. Como tal, a fluorescência é cerca de 10^7 vezes mais intensa do que o efeito Raman, dificultando, assim, a análise do espectro Raman[88]. Esta constitui uma das maiores desvantagens desta técnica espectroscópica.

Por forma a minimizar o efeito da fluorescência nos espectros Raman, bem como a radiação que é dispersa elasticamente, possivelmente responsável pelo fundo dos espectros Raman para comprimentos de onda na região do visível, é usual recorrer-se a sistemas com uma configuração verdadeiramente confocal.

Além disso, é também usual recorrer-se a lasers de excitação de comprimentos de onda mais longos, visto que a redução da energia do laser garante uma maior diferença entre o nível virtual de energia e o nível eletrónico excitado. Desta forma, não só se reduz o número de transições eletrónicas, particularmente no caso da matéria orgânica, como se diminui o sinal de fundo.

É importante ter em conta que a redução da fluorescência é conseguida à custa da diminuição da intensidade do efeito Raman.

A razão sinal-ruído é uma medida importante da qualidade do espectro; o inverso dessa razão corresponde à precisão relativa da medida, ou ao erro médio relativo do sinal original[45].

2.4. Microscopia Confocal de Raman

O espectrómetro de Raman aparece regularmente associado a um microscópio ótico tradicional, por forma a contornar o facto de o sinal de Raman ser muito fraco e, em conjunto, são usualmente utilizados enquanto medida pontual, sendo a área e a profundidade da amostra determinadas pela escolha da objetiva[45]. Com este acoplamento, é possível focalizar o feixe de laser sobre a amostra e recolher eficientemente a radiação dispersa, alcançando-se a análise de áreas microscópicas[88].

Os microscópios confocais de Raman contêm uma abertura situada antes da fenda de entrada do monocromador, à qual se dá o nome de *pinhole*. A radiação dispersa pela amostra atravessa a objetiva do microscópio, sendo encaminhada para um filtro rejeita-banda responsável pela eliminação dos fotões de Rayleigh. Os fotões dispersos segundo o efeito Raman são encaminhados para o *pinhole*, voltam a ser direccionados para a fenda de entrada do monocromador e, em seguida, para o espectrómetro, alcançando o detetor.

Adotando diferentes valores de *pinhole*, é possível controlar o grau de confocalidade. A fenda de entrada é usada para controlar a resolução espectral[88].

A figura 11 constitui um esquema de um aparelho de microscopia confocal de Raman, bem como os seus principais constituintes.

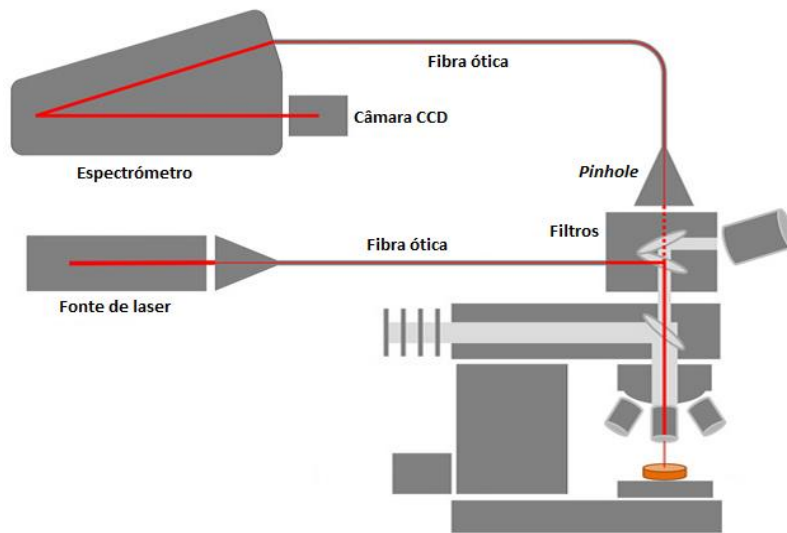


Figura 11 - Imagem esquemática de um aparelho de microscopia confocal de Raman. Adaptada da referência [89].



Materiais e Métodos

1. Amostras

1.1. Descrição das Amostras

As amostras analisadas neste trabalho provieram de uma Necrópole Cristã dos séculos XIII-XVI, localizada em Cacela Velha. Foram cedidas pelo Doutor Francisco Curate, investigador no Centro de Investigação em Antropologia e Saúde da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Cacela pertence ao concelho de Vila Real de Santo António e localiza-se no levante algarvio, assentando numa faixa territorial com 11 km de extensão, no sentido norte-sul, encaixada entre os concelhos de Tavira e Castro Marim e abrangendo uma área de 50 km². As primeiras referências históricas respeitantes a Cacela remontam à época fenícia e a sua fundação recua, possivelmente, ao ano de 804 a.C.[91].

Depois da conquista de Cacela pelos Cristãos, os espaços habitacionais anteriormente pertencentes à comunidade islâmica começaram a ser reutilizados enquanto espaços funerários. A Necrópole Cristã correspondeu, assim, à época de assentamento dos primeiros cristãos em Cacela. Localizava-se no exterior do castelo, junto da ribeira das Hortas, e depositava-se sobre o bairro islâmico do Poço Antigo[90], [91]. Na figura 12 encontra-se uma representação esquemática da mesma.

Foram realizadas duas campanhas arqueológicas nos anos de 1998 e 2001, no Sítio do Poço Antigo, em Cacela Velha, onde foram exumadas cinquenta e seis sepulturas e catorze reduções e ossários, dos quais foram recuperados os remanescentes esqueléticos de setenta e quatro indivíduos[91].

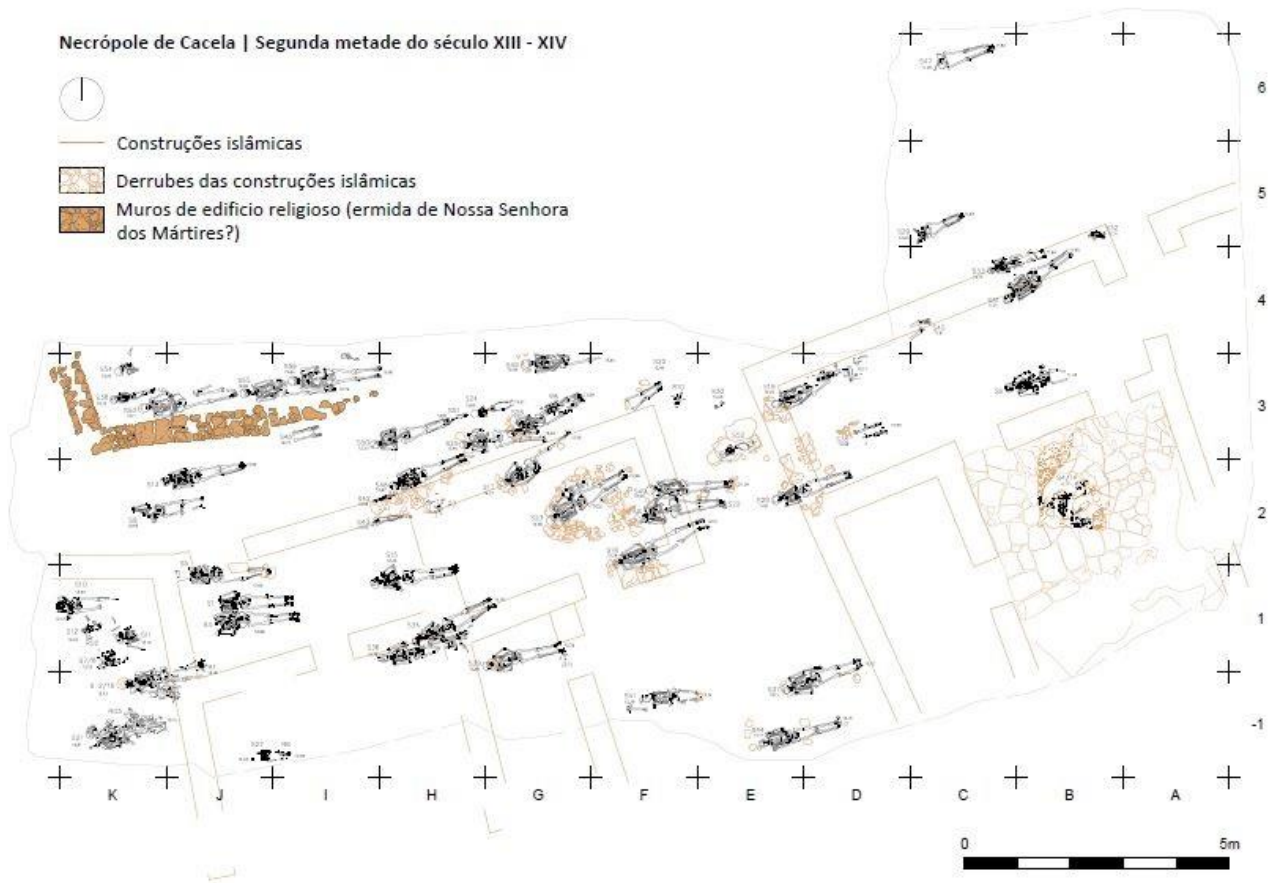


Figura 12 - Representação esquemática da Necrópole Cristã de Cacela Velha, no Algarve. Adaptada da referência [91].

As figuras 13 e 14, abaixo, retratam, respetivamente, três das sepulturas exumadas e os remanescentes esqueléticos do indivíduo inumado numa das mesmas.



Figura 13 - Sepulturas 53, 55 e 56. Adaptada da referência [91].



Figura 14 - Remanescentes esqueléticos do indivíduo da sepultura 53. Adaptada da referência [91].

Os ossos foram encontrados a uma cota média de $(12,6 \pm 0,3)$ m. Apresentavam um excelente estado de conservação, proporcionado pelo solo arenoso do local de exumação, bem como pelo seu pH alcalino, associados às ótimas condições de drenagem das águas pluviais[91], estando, na sua maioria, intactos, ou com um pequeno número de fraturas. Exibiam uma cor alaranjada, indicativa de contaminações externas, possivelmente provocadas pelo solo do local de exumação.

Do conjunto estudado constavam nove ulnas, três fíbulas e dois rádios. No que respeita ao sexo dos indivíduos cujas ossadas se analisou, nove eram do sexo masculino e quatro do sexo feminino, sendo que não foi possível definir o sexo do indivíduo da sepultura 43. Em relação à classe etária, treze indivíduos foram classificados como adultos, havendo apenas um não adulto.

Na tabela 1, abaixo, encontra-se um quadro-resumo das principais características de cada osso, nomeadamente, o número da sepultura de que foi exumado, a letra que lhe foi atribuída, o tipo de osso analisado, o sexo do indivíduo, e a sua classe etária.

Tabela 1 - Quadro-resumo das principais características de cada osso.

Sepultura	Identificação	Ossos	Sexo	Classe etária
2	A	Rádio	M	Adulto
17	B	Ulna	M	Adulto
18	C	Fíbula	M	Adulto
21	D	Fíbula	M	Adulto
23	E	Ulna	M	Adulto
28	H	Fíbula	F	Adulto
33	I	Ulna	M	Adulto
37	K	Ulna	F	Adulto
39	L	Ulna	M	Adulto
43	M	Ulna	N/D	Não Adulto
48	N	Rádio	F	Adulto
50	O	Ulna	F	Adulto
53	P	Ulna	M	Adulto
45	R	Ulna	M	Adulto

1.2. Pré-tratamento das Amostras

Tal como referido anteriormente, os ossos apresentavam uma cor alaranjada, indicativa de possíveis contaminações externas, além de se verificar a transferência de sedimentos para as mãos aquando do seu manuseamento. Assim sendo, por forma a remover o máximo de contaminações possível, escovou-se, a seco, cada uma das amostras, com recurso a uma escova de dentes macia vulgar. Os ossos foram escovados de forma cuidadosa, em movimentos circulares.

Depois de concluído o processo, constatou-se que a escovagem a seco não havia sido suficiente para remover os sedimentos da superfície óssea, pelo que se procedeu à sua escovagem com água destilada. Com o auxílio de um frasco de esguicho, humedeceu-se uma pequena área da superfície do osso, escovando-se, de seguida, essa mesma área e, por fim, a região escovada foi passada novamente por água destilada. O processo foi repetido até toda a amostra ter sido contemplada. Na figura 15 mostram-se algumas amostras depois de serem escovadas e lavadas. O uso de água destilada foi reduzido ao máximo e a escovagem foi feita em pequenas áreas e à vez, para que não houvesse dissolução da concentração dos elementos químicos presentes na superfície do osso, nem comprometimento da integridade da mesma. O processo de secagem foi efetuado a 30°C, durante 24 horas, no forno, tal como se mostra na figura 16.



Figura 15 - Algumas amostras depois do processo de escovagem e lavagem.



Figura 16 - Disposição das amostras no forno, para secagem.

2. Análise com Microfluorescência de Raios-X Dispersiva em Energia

2.1. Escolha da Metodologia

Atendendo à literatura, é habitual que trabalhos que procuram fazer a análise de tecido ósseo com recurso a técnicas de XRF adotem como metodologia a análise em pastilhas. Uma vez que o presente trabalho vem na continuidade de trabalhos anteriores[7], [26], nos quais se fez a análise de estruturas ósseas sob a forma de pastilhas com recurso a técnicas de XRF, e de modo a tentar diferenciar ao máximo o presente trabalho desses, procurou-se recorrer a uma metodologia alternativa.

O processo da escolha de metodologia, bem como toda a análise feita por μ -EDXRF, foram realizados no Laboratório de Física Atómica e Molecular do Departamento de Física da FCT-NOVA.

Deste ponto em diante, far-se-á referência a dois modos diferentes de aquisição de dados: modo “leves”, que diz respeito às medições feitas com o filtro de Al, com 12,5 μ m de espessura, e corrente de 300 μ A; e modo “pesados”, que diz respeito às medições feitas com o filtro de Al/Ti/Cu, com uma espessura respetiva de 100, 50 e 25 μ m, e corrente de 400 μ A. Todos os dados foram adquiridos a uma tensão de 50 kV.

A título de exemplo, na figura 17 encontra-se a sobreposição dos espectros obtidos para um dos pontos da fatia B_1 em modo “leves” e em modo “pesados”.

Quando se comparam os espectros da figura 17, representativos dos dois modos de aquisição de dados, é possível perceber que, ao passo que o modo “leves” apresenta uma melhor relação sinal/ruído para elementos leves (com baixo Z), o modo “pesados” apresenta uma melhor relação sinal/ruído para elementos pesados (com elevado Z). Assim sendo, de modo que não houvesse perda de informação relativa aos elementos presentes nas amostras, bem como à respetiva concentração, a análise das amostras com μ -EDXRF foi realizada em ambos os modos.

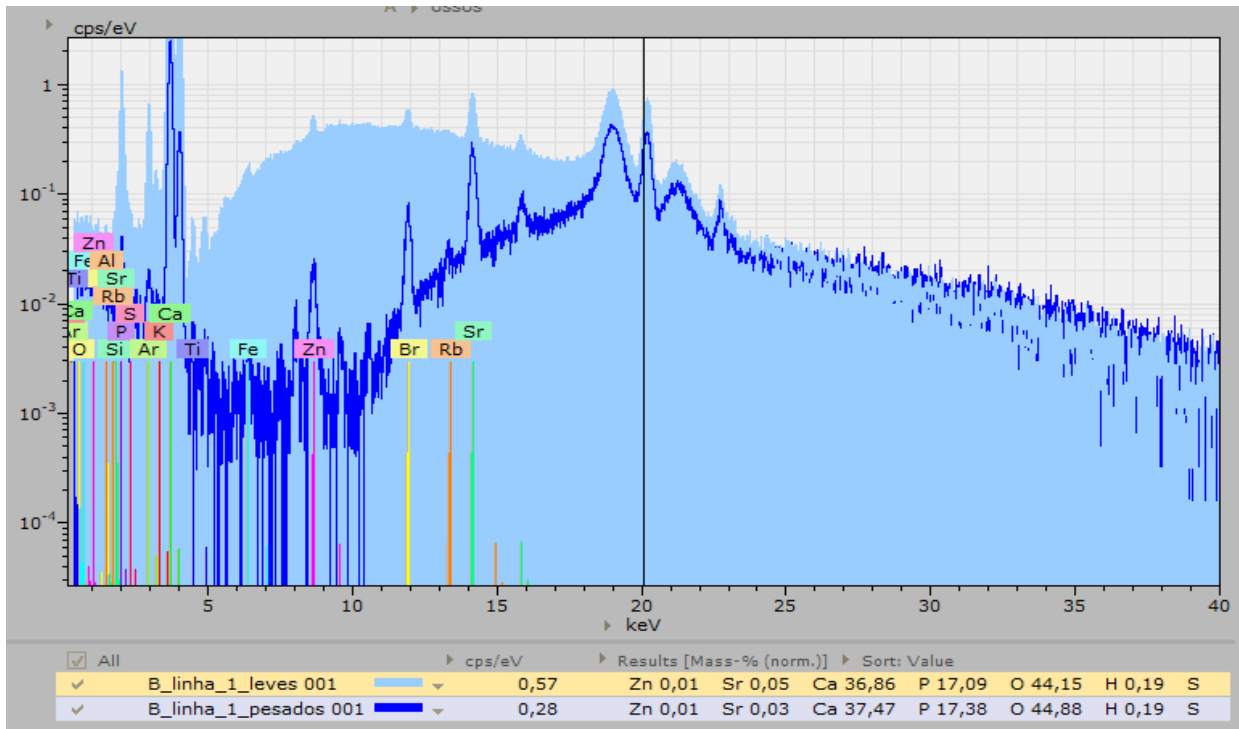


Figura 17 - Comparação dos espectros obtidos para um mesmo ponto em modo "leves" e em modo "pesados".

2.1.1. Primeira Etapa: Análise Direta vs. Análise em Pastilha

Atendendo ao estado de conservação do conjunto de ossos, ponderou-se adotar como metodologia a análise direta da superfície externa do fragmento ósseo, tendo como principal vantagem a preservação da integridade do mesmo.

Por forma a testar a viabilidade dessa metodologia comparativamente à análise em pastilhas, consideraram-se dois fragmentos ósseos do indivíduo A com regiões sensivelmente planas. Esses fragmentos foram colocados no tabuleiro do *M4 Tornado* (Bruker, Alemanha), de forma que a região a analisar, coincidente com a face mais plana, ficasse paralela ao mesmo, e a sua análise foi feita diretamente na superfície externa dos fragmentos (análise direta). Nas figuras 18 e 19 encontram-se, respetivamente, um dos fragmentos analisados do osso A, bem como o mesmo colocado no tabuleiro do *M4 Tornado*.



Figura 18 - Exemplo de um dos fragmentos analisados.



Figura 19 - Fragmento no tabuleiro do M4 Tornado.

Para cada um desses fragmentos, fez-se a recolha dos dados de 5 pontos e de 3 áreas, ambos em modo “pesados”.

Depois da análise direta, os dois fragmentos foram usados para fazer duas pastilhas. Primeiro, foram reduzidos a pó com auxílio de um almofariz e pilão de mármore (figura 20). Depois, o pó foi prensado com uma prensa hidráulica manual de 13 toneladas (Specac Ltd, Reino Unido) e transformado em pastilhas com 2 cm de diâmetro e 1 mm de espessura. Cada pastilha foi, seguidamente, colada com cola universal numa película de *Mylar*, que, por sua vez, foi colada num suporte plástico quadrangular de 5 cm de lado (figura 21).



Figura 20 - Almofariz, pilão e pó de teste usados para fazer as pastilhas.



Figura 21 - Pastilha 1 feita a partir do primeiro fragmento do osso A.

As pastilhas foram colocadas no tabuleiro e, tal como para os fragmentos, foram recolhidos dados respeitantes a 5 pontos e a 3 áreas, em modo “pesados”.

Comparando os dados obtidos através da análise direta com os obtidos através da análise em pastilhas, percebeu-se que as contaminações externas tinham uma prevalência muito acentuada na análise direta face à análise em pastilhas.

Assim sendo, selecionou-se dois novos fragmentos do osso A e procedeu-se à sua lavagem com água destilada, escovagem, secagem (por um período de, pelo menos, três horas) e análise. Este processo foi repetido mais três vezes, perfazendo um total de quatro lavagens sucessivas, com medições entre cada uma dessas lavagens.

Com os resultados obtidos, construíram-se gráficos de barras onde constam as concentrações de cada elemento para cada uma das fases da análise: pastilha, fragmento sem lavagem, e fragmento após as 1ª, 2ª, 3ª e 4ª lavagens. Na figura 22 encontram-se os resultados mais relevantes. Os restantes resultados encontram-se no apêndice 1.

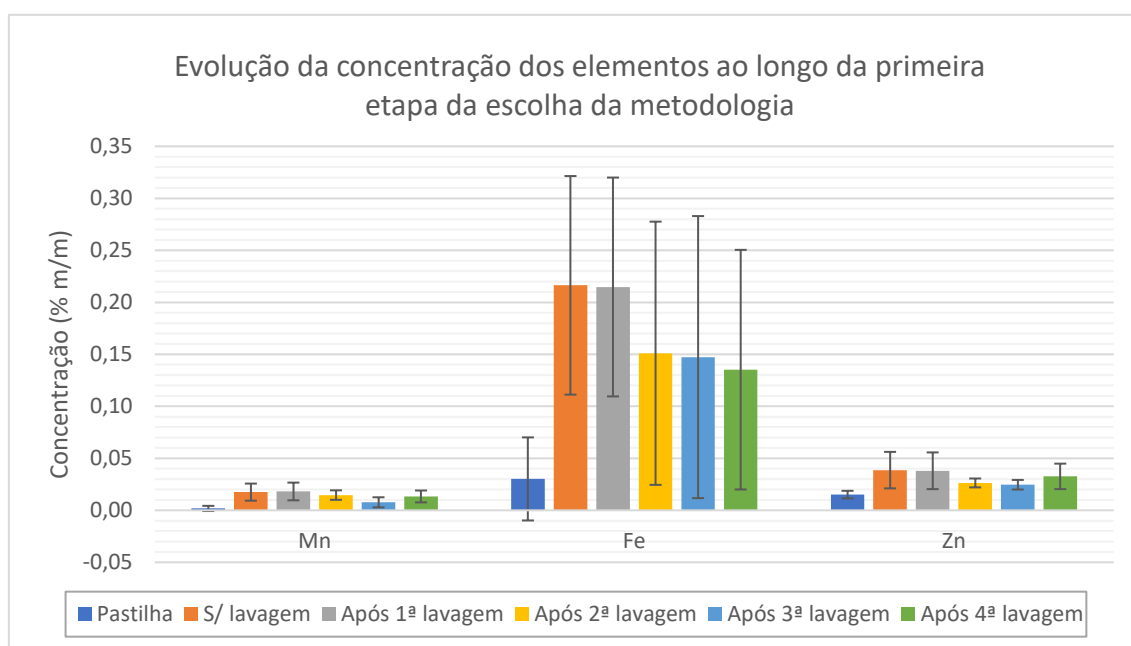


Figura 22 - Evolução da concentração dos elementos Mn, Fe e Zn ao longo da primeira etapa da escolha da metodologia, nomeadamente, na análise em pastilha e na análise direta (fragmento sem lavagem e após as 1ª, 2ª, 3ª e 4ª lavagens). As incertezas foram determinadas pelo método da propagação das incertezas.

Dos elementos inicialmente considerados, destacam-se o Mn, o Fe e o Zn como sendo os que apresentam maiores disparidades no que toca às concentrações obtidas na pastilha em relação às obtidas na análise direta do fragmento ósseo. Verificam-se mesmo diferenças de uma ordem de grandeza em algumas das suas concentrações.

É possível verificar que, quando se compara a análise direta da superfície do fragmento ósseo com a análise em pastilha, o valor médio das concentrações é muito superior para esses elementos, principalmente após as lavagens, o que resulta em barras de incerteza muito grandes.

Para garantir uma maior estatística, considerou-se um segundo indivíduo, o indivíduo I, e o processo foi repetido analogamente.

Como os resultados obtidos para o indivíduo I vieram reiterar os previamente obtidos para o indivíduo A, decidiu-se, então, descartar a análise direta da superfície externa dos fragmentos, uma vez que as contaminações externas permaneceram muito relevantes, mesmo após quatro lavagens.

2.1.2. Segunda Etapa: Análise em Fatia vs. Análise em Pastilha

Não perdendo de vista o objetivo de preservar ao máximo a integridade do fragmento ósseo, considerou-se a adoção da análise em fatia como metodologia.

Consideraram-se novamente os indivíduos A e I para testar a viabilidade da análise em fatia em relação à análise em pastilha. Os dados considerados para a análise em pastilha foram os recolhidos previamente, na primeira etapa.

As fatias foram obtidas através do uso de um micrótomo com serra de diamante, para não haver contaminação da superfície de corte. Os cortes foram feitos transversalmente ao comprimento do osso, sob refrigeração com água destilada, por forma a evitar o aquecimento da amostra sujeita a corte, bem como danos biológicos na mesma. As fatias resultantes apresentavam uma espessura de 2 mm.

Para evitar deslizamentos durante o processo de focagem no espectrómetro, as fatias foram coladas a uma etiqueta de papel e esta, por sua vez, foi colada a uma lâmina de vidro, tal como se mostra na figura 23.



Figura 23 - Fixação das fatias dos ossos O, P e R a uma lâmina de vidro.

De forma semelhante à análise em pastilhas, as fatias foram colocadas no tabuleiro do *M4 Tornado* e foram analisadas, com recolha de dez pontos (em modo “pesados”), descartando-se, desta vez, a comparação das áreas.

Com os resultados obtidos, construíram-se gráficos de barras das concentrações de cada elemento para a análise em pastilha e para a análise em fatia. Na figura 24 encontram-se os resultados mais relevantes. Os restantes resultados encontram-se no apêndice 2.

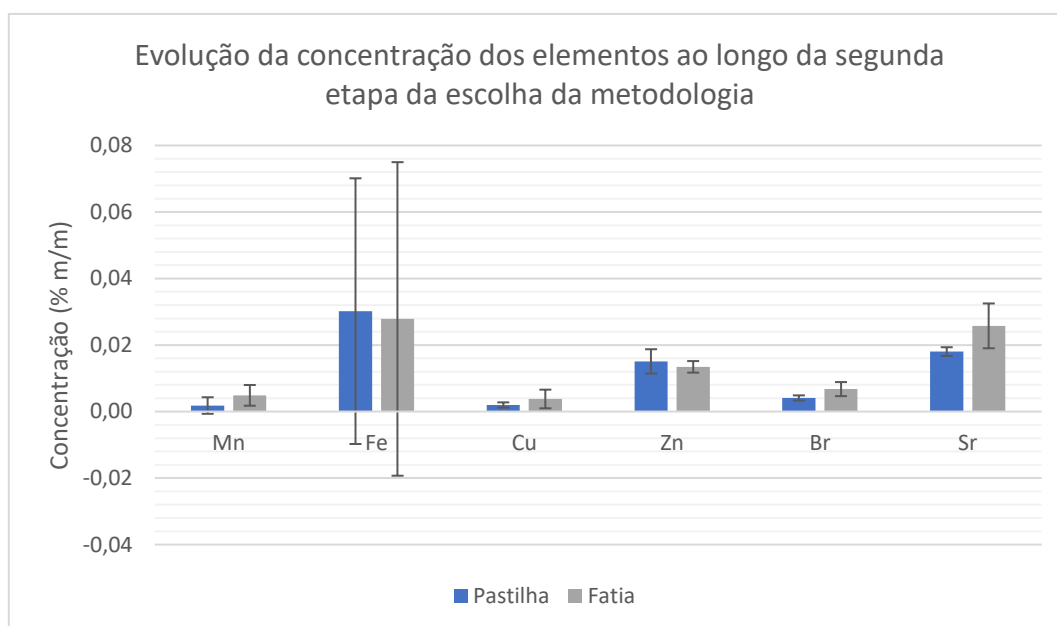


Figura 24 - Evolução da concentração dos elementos Mn, Fe, Cu, Zn, Br e Sr ao longo da segunda etapa da escolha da metodologia, nomeadamente, na análise em pastilha e na análise em fatia. As incertezas foram determinadas pelo método da propagação das incertezas.

Tal como se pode observar, embora ainda se verifiquem diferenças entre as concentrações obtidas, encontram-se na mesma ordem de grandeza, tanto na análise em pastilhas, como na análise em fatias.

Dado que a fatia preserva mais a integridade e as características do osso do que a pastilha, e dado que os resultados obtidos na comparação das duas análises foram satisfatórios, decidiu, então, adotar-se a análise em fatias como metodologia de análise XRF.

2.2. Metodologia

2.2.1. Análise em Profundidade

O objetivo principal desta análise passou por perceber de que forma se distribuíam os elementos traço, em profundidade, numa superfície de corte de determinado osso. Os resultados obtidos foram cruciais para aferir que elementos terão sido integrados no tecido ósseo *ante-mortem* e *post-mortem*.

Por forma a uniformizar a análise de cada osso, estabeleceu-se que:

- seriam analisadas duas fatias por cada osso, para garantir maior estatística;
- em cada uma das fatias, seriam consideradas três linhas diferentes (cada linha corresponde a um conjunto de pontos sobre a mesma direção, definida pelo raio da circunferência que circunscribe a fatia);
- a seleção dos pontos das linhas seria sempre feita do exterior (superfície mais externa da fatia) para o interior (superfície mais interna da fatia);
- cada fatia teria, no mínimo, um total de 20 pontos analisados;
- todas as medições seriam feitas em modo “leves” e em modo “pesados”, para garantir que não se perdia informação relativa aos elementos presentes nas amostras, bem como à concentração desses mesmos elementos.

A figura 25, abaixo, constitui um exemplo de uma das três linhas analisadas no estudo da primeira fatia do osso B. É possível verificar que os pontos da linha se encontram sensivelmente sobre o raio da circunferência que circunscreve a fatia e que foram escolhidos no sentido da periferia para o centro.

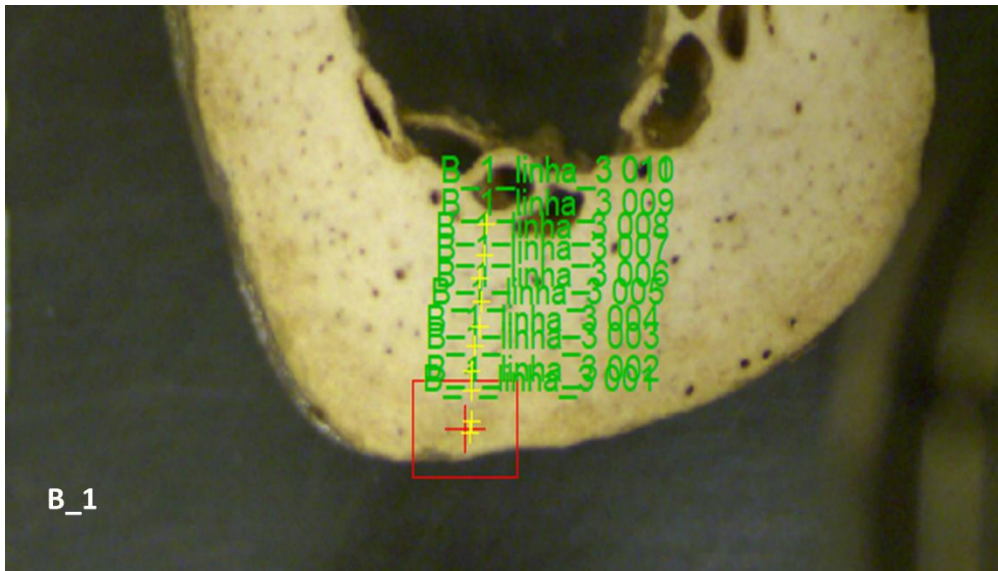


Figura 25 - Seleção dos pontos da linha 3 da fatia B_1.

Os espectros obtidos foram, posteriormente, quantificados pelo *software* do *M4 Tornado*, tal como se explica na secção “Quantificação das Amostras”. Os resultados dessa quantificação foram analisados com recurso ao *Microsoft Excel* (Microsoft, EUA), e, com o *software OriginPro 2018* (OriginLab Corporation, EUA), fez-se uma análise multivariada (*Multivariate Analysis*), usando como método de agrupamento o *Group Average* e como tipo de distância a euclidiana, para a construção de um dendrograma, bem como a análise dos coeficientes de correlação de Pearson, *R*.

2.2.2. Mapeamento

O mapeamento das fatias foi feito por forma a complementar a análise em profundidade, com o intuito de ter, visualmente, a noção da distribuição dos elementos ao longo da superfície de corte. O *software* atribui uma cor a cada elemento, sendo possível visualizar a distribuição de um elemento singular, ou de todos os elementos

presentes na superfície de corte da fatia que está a ser mapeada em simultâneo. A figura 26 mostra o exemplo da fatia B_1 e do respetivo mapeamento.

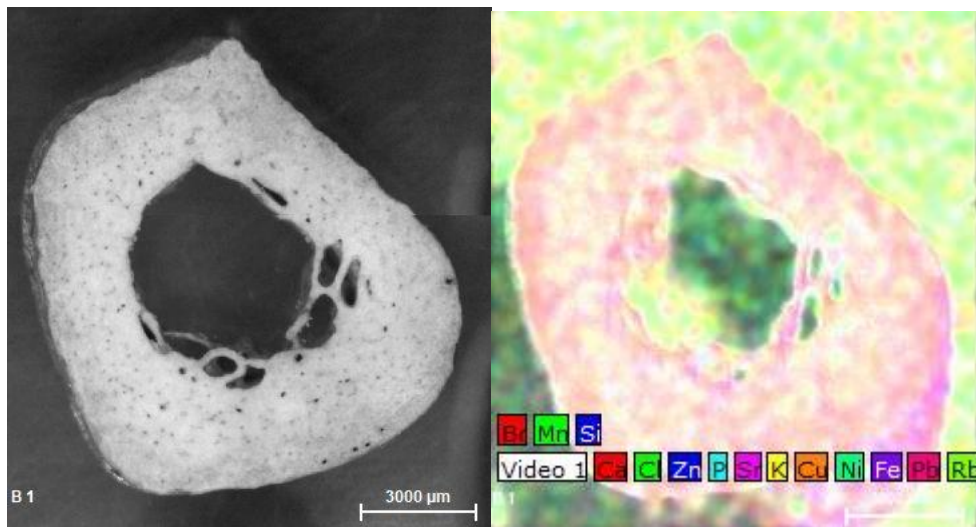


Figura 26 - Fatia B_1 e respetivo mapeamento.

Para esta análise, estabeleceu-se que seria estudada uma fatia de cada osso, em modo “pesados”, com uma distância entre pontos de 35 µm, a 12 ms/pixel e 1 acumulação.

2.3. Quantificação das Amostras

A análise quantitativa das amostras foi realizada pelo *software* do *M4 Tornado*, com recurso ao método dos parâmetros fundamentais. Este é um método matemático que permite a determinação composicional de uma amostra, através da conversão das intensidades de fluorescência medidas pelo espectrómetro nas concentrações dos analitos (elementos presentes na amostra em estudo)[92], [93].

Na prática, a aplicação do método dos parâmetros fundamentais consiste em duas fases distintas, nomeadamente, fase da calibração e fase da análise de uma amostra de concentração desconhecida.

A calibração pode envolver uma análise padronizada ou não padronizada (*standardless*). A análise padronizada recorre a um padrão que é escolhido de forma que as suas características (matriz e morfologia) se aproximem ao máximo das

características da amostra que se pretende estudar. Visto que a composição dos analitos é conhecida para o padrão, obtém-se uma função resposta de XRF para cada um deles. A análise *standardless*, por sua vez, tem em conta valores teóricos de diversos parâmetros.

A fase da análise da amostra de concentração desconhecida é um processo iterativo. Inicialmente, o *software* começa por estimar um valor para essa concentração. De seguida, com base no valor estimado, calcula a intensidade teórica. Consoante a diferença entre as intensidades medida e teórica, o *software* estima um novo valor para a concentração do analito e este processo repete-se até que os valores experimental e teórico convirjam.

O método dos parâmetros fundamentais permite calcular a intensidade da fluorescência de raios-X, I_i , emitida por um analito numa amostra de espessura x , quando irradiado por um feixe de raios-X policromático, através da equação seguinte:

$$I_i = \frac{d\Omega}{4\pi \sin \varphi_1} Q_i q_i W_i \int_{\lambda_{min}}^{\lambda_{edge}} \tau_i(\lambda) I_0(\lambda) \frac{1 - e^{[-\chi(\lambda, \lambda_i) \rho x]}}{\chi(\lambda, \lambda_i)} \left(1 + \sum_j W_j S_{ij} \right) d\lambda \quad (6.1)$$

Na expressão anterior, $d\Omega$ é o ângulo sólido diferencial para a radiação característica; φ_1 é o ângulo de incidência da radiação primária; i é o subscrito do analito em causa; j é o subscrito do elemento da matriz; Q_i é a sensibilidade do espectrómetro para a radiação característica do analito i ; q_i é a sensibilidade do método para o analito i ; W_i é a fração mássica do analito i ; λ_{min} é o comprimento de onda mínimo, correspondente à energia máxima do espectro; λ_{edge} é o comprimento de onda da descontinuidade de absorção do analito; $\tau_i(\lambda)$ 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; ρ é a densidade da amostra; $\chi(\lambda, \lambda_i)$ é o coeficiente mássico de atenuação total da amostra para as radiações primária, λ , e fluorescente, λ_i ; W_j é a fração mássica do elemento j da matriz; e S_{ij} é o termo de reforço para o elemento j da matriz.

Esta equação é extremamente complexa e, através dela, é possível verificar a dependência da intensidade da fluorescência de raios-X, característica de determinado analito, em relação à composição elementar da amostra e à sua espessura[92].

No presente trabalho, a análise quantitativa das fatias foi realizada sem recurso a padrões (análise *standardless*). A identificação dos elementos presentes na amostra foi conseguida através do reconhecimento dos picos característicos, observados nos espectros obtidos para a mesma. A matriz atribuída ao método foi de hidroxiapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), uma vez que é a constituinte principal da componente mineral do tecido ósseo.

2.4. Validação do Método

Com o objetivo de avaliar a adequação do método de quantificação escolhido, foi analisado um *SRM* (*Standard Reference Material*), nomeadamente, o Bone Ash SRM NIST-1400, pela aproximação das suas características às das amostras ósseas analisadas no presente trabalho.

O valor obtido experimentalmente através desse método foi comparado com o valor certificado. A essa comparação dá-se o nome de exatidão e esse valor pode ser usado para assegurar a qualidade das medições e, conseqüentemente, do próprio método[94].

Tabela 2 - Comparação das concentrações ($\mu\text{g/g}$) obtidas experimentalmente para Bone Ash SRM NIST-1400 com os valores certificados e diferença percentual relativa entre os mesmos.

	Valor Experimental	Valor Certificado	$\Delta\%$
P	173720 ± 40	179100 ± 1900	3
Ca	374630 ± 80	381800 ± 1300	2
Fe	700 ± 200	660 ± 27	6
Zn	170 ± 10	181 ± 3	6
Sr	240 ± 50	249 ± 7	4
Pb	8 ± 10	$9,0 \pm 0,1$	11

Na tabela 2 encontram-se as concentrações experimentais e certificadas, expressas em $\mu\text{g/g}$, acompanhadas da respetiva incerteza, bem como a diferença percentual relativa entre os dois valores ($\Delta\%$).

Ao analisar os valores da tabela 2, é possível observar que a diferença percentual relativa entre os valores experimental e certificado é bastante pequena, o que indica uma proximidade bastante grande entre esses dois valores. Assim sendo, a exatidão do método é satisfatória e, como tal, comprova-se a validade do mesmo.

O limite de deteção (LD) de um elemento, para uma determinada técnica, diz respeito à concentração mínima desse mesmo elemento que essa técnica é capaz de detetar e constitui uma boa medida para aferir a sensibilidade do método[2].

Os limites de deteção foram calculados com base na seguinte equação[95]:

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

Na expressão anterior, C_i é a concentração do elemento i no material de referência; 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 .

Dado que o facto da concentração de um elemento ser detetável não significa que seja quantificável, calculou-se também o limite de quantificação, LQ , para cada elemento. Esse limite corresponde ao valor que melhor indica a concentração mínima de determinado elemento que o método é capaz de quantificar[96] e é calculado através da expressão:

$$LQ = 3LD \quad (6.3)$$

Na tabela 3 encontra-se os limites de deteção e de quantificação, com a respetiva incerteza, para o Bone Ash SRM NIST-1400.

Tabela 3 - Limites de detecção e de quantificação ($\mu\text{g/g}$) obtidos para Bone Ash SRM NIST-1400.

	Limite de detecção	Limite de quantificação
P	580 ± 50	1740 ± 150
Ca	34 ± 1	102 ± 3
Fe	7 ± 2	21 ± 6
Zn	$1,6 \pm 0,2$	$4,8 \pm 0,6$
Sr	$7,4 \pm 0,5$	$22,2 \pm 1,5$
Pb	$0,6 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,3$
K	$10,6 \pm 0,6$	$31,8 \pm 1,8$

3. Análise com Microscopia Raman

A análise por μ -Raman foi também realizada no Laboratório de Física Atômica e Molecular do Departamento de Física da FCT-NOVA. Para tal, foi utilizado o espectrómetro confocal XploRA (Horiba/Jobin-Yvon Xplora, França), dotado de um microscópio (Olympus BX41, Japão) com três objetivas (10x, 50x e 100x). A aquisição da totalidade dos espectros foi obtida com uma fonte de laser díodo de comprimento de onda de 785 nm, filtro de 50%, fenda confocal de 300 μm , *slit* de 100 μm e *grating* de 1200 *grooves/mm*. A aquisição dos espectros foi efetuada em modo *Multi windows*, com um tempo de exposição de 25 s e 4 acumulações.

Depois de adquiridos, os espectros foram tratados com o *software* LabSpec versão 9.1.0.15 (Horiba/Jobin-Yvon Xplora, França), com recurso à ferramenta *Smoothing* (com os parâmetros *Degree 2*, *Size 9* e *Height 10*) para filtrar o espectro, e à ferramenta *Baseline Correction* (com *Degree 8*) para corrigir a linha de base do mesmo. Nas figuras abaixo representa-se a sequência de tratamento de um espectro, começando por um exemplo de um dos espectros adquiridos (figura 27), seguido do resultado da aplicação das ferramentas *Smoothing* e *Baseline Correction* (figura 28), na qual se indicam os picos de interesse característicos de um espectro Raman para uma amostra de tecido ósseo.

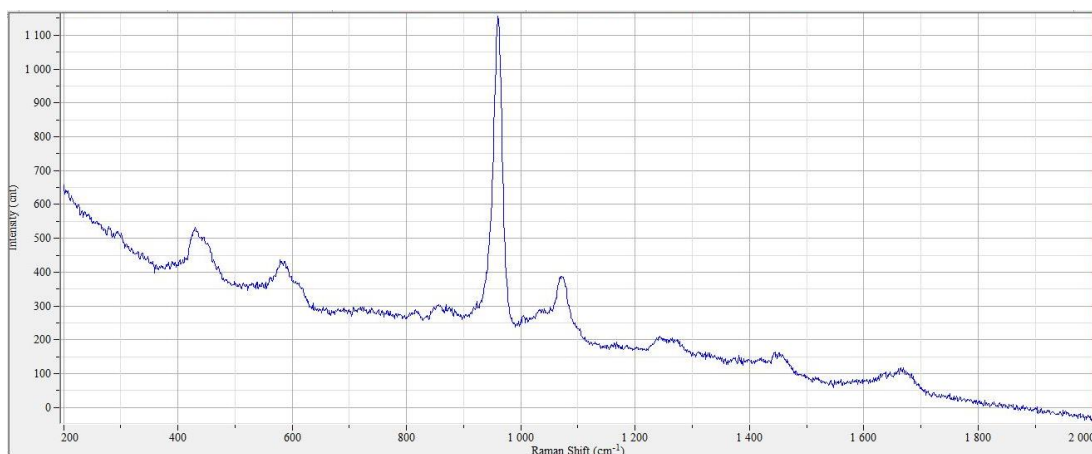


Figura 27 - Exemplo de um espectro da Intensidade Raman (u.a.) em função do Deslocamento Raman (cm^{-1}) obtido para a fatia B.

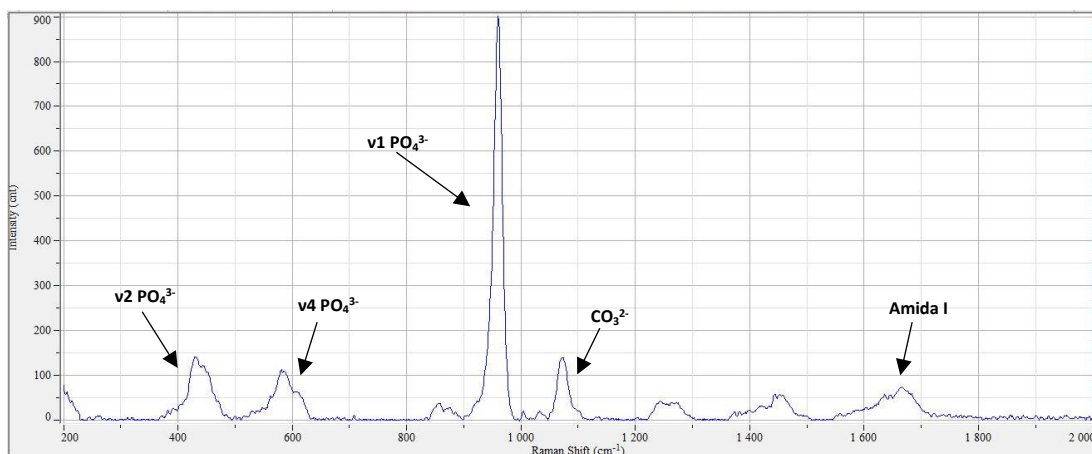


Figura 28 - Exemplo de um espectro da Intensidade Raman (u.a.) em função do Deslocamento Raman (cm^{-1}), obtido para a fatia B, tratado no LabSpec, com indicação dos picos de interesse característicos de um espectro Raman para uma amostra de tecido ósseo.

Posteriormente, foi usada a ferramenta *Integral* para extrair os valores das áreas abaixo da curva dos picos de interesse (v1 PO_4^{3-} , v2 PO_4^{3-} , v4 PO_4^{3-} , CO_3^{2-} e Amida I), bem como a ferramenta *Peaks* com a função *GaussLoren* para obter os valores da posição e da largura a meia altura da banda de alongamento simétrico do fosfato (v1 PO_4^{3-}).

A análise e o tratamento estatístico dos dados adquiridos foram realizados no *Microsoft Excel* e no *OriginPro*, à semelhança do que se fez na análise com μ -EDXRF.



Resultados e Discussão

1. Análise com Microfluorescência de Raios-X Dispersiva em Energia

1.1. Composição Elementar das Amostras

Após se ter efetuado a quantificação dos elementos presentes nas amostras de tecido ósseo analisadas, cujos resultados se encontram presentes nas tabelas que constam do apêndice 3, procedeu-se à comparação dos mesmos com valores obtidos previamente noutros estudos. Na tabela 4 encontram-se as concentrações de alguns elementos obtidas para indivíduos dos períodos contemporâneo[3], [42], Calcolítico[41], Neolítico[42] e Helenístico[24], e Idade do Bronze Média[97].

Tabela 4 - Concentrações de elementos traço ($\mu\text{g/g}$) em estudos anteriores para indivíduos modernos e de diferentes períodos históricos.

	Mn	Fe	Ni	Cu	Zn	As	Br	Sr
Século XX [42]	≤ 11	165 ± 114	≤ 8	7 ± 1	205 ± 32	-	$2,7 \pm 0,4$	195 ± 75
Século XX [3]	$20 \pm 1,6$	153 ± 265	-	$4,9 \pm 0,6$	172 ± 26	$4,5 \pm 1,7$	-	147 ± 55
Calcolítico [41]	30-80	113-350	-	38-62	45-135	-	62-75	125-180
Neolítico [42]	90 ± 11	-	≤ 7	35 ± 7	320 ± 10	-	50 ± 10	95 ± 10
Idade do Bronze Média [97]	12-369	-	-	12-27	61-333	-	-	146-364
Período Helenístico [24]	56 ± 51	248 ± 125	$3,2 \pm 0,7$	$1,1 \pm 1,5$	99 ± 35	-	-	-

Os resultados obtidos para as concentrações médias dos elementos, em ($\mu\text{g/g}$), bem como a incerteza que lhes está associada, para o presente trabalho e para o trabalho desenvolvido por Santos[7], relativo a remanescentes ósseos dos II e I milénios A. N. E., também provenientes do concelho de Vila Real de Santo António, encontram-se na tabela 5, abaixo. As incertezas foram determinadas pelo método da propagação das incertezas.

Tabela 5 – Comparação das concentrações médias ($\mu\text{g/g}$) dos elementos analisados no presente trabalho e no trabalho de Santos[7], com as respetivas incertezas.

	Trabalho precedente [7]	Trabalho atual
Al	11000 \pm 6000	30000 \pm 9000
Si	20000 \pm 30000	20000 \pm 20000
P	155000 \pm 8000	168000 \pm 3000
S	100 \pm 80	2000 \pm 4000
K	4000 \pm 8000	200 \pm 400
Ca	330000 \pm 20000	361000 \pm 6000
Ti	1000 \pm 1000	200 \pm 200
Cr	80 \pm 60	60 \pm 50
Mn	1000 \pm 1000	50 \pm 40
Fe	10000 \pm 20000	100 \pm 500
Ni	50 \pm 20	30 \pm 10
Cu	40 \pm 20	30 \pm 30
Zn	130 \pm 40	100 \pm 40
As	11 \pm 7	2 \pm 3
Br	80 \pm 40	70 \pm 50
Rb	50 \pm 50	10 \pm 7
Sr	140 \pm 50	300 \pm 100

Verifica-se que os ossos do presente trabalho apresentam uma concentração bastante superior em S relativamente ao trabalho anterior[7], bem como uma concentração muito inferior no que toca aos elementos K, Ti, Mn e Fe. No que toca a metais pesados, também não foram detetados valores anormais nas amostras de tecido ósseo estudadas.

Comparando as concentrações obtidas com as que se obtiveram para indivíduos do período contemporâneo[3], [42], verifica-se que a concentração de Zn é muito semelhante, a de Fe é ligeiramente inferior e que as de Mn, Ni e Br são bastante superiores às encontradas nesses estudos.

Os resultados da quantificação efetuada pelo *software* do *M4 Tornado* foram usados para contruir o dendrograma da figura 29.

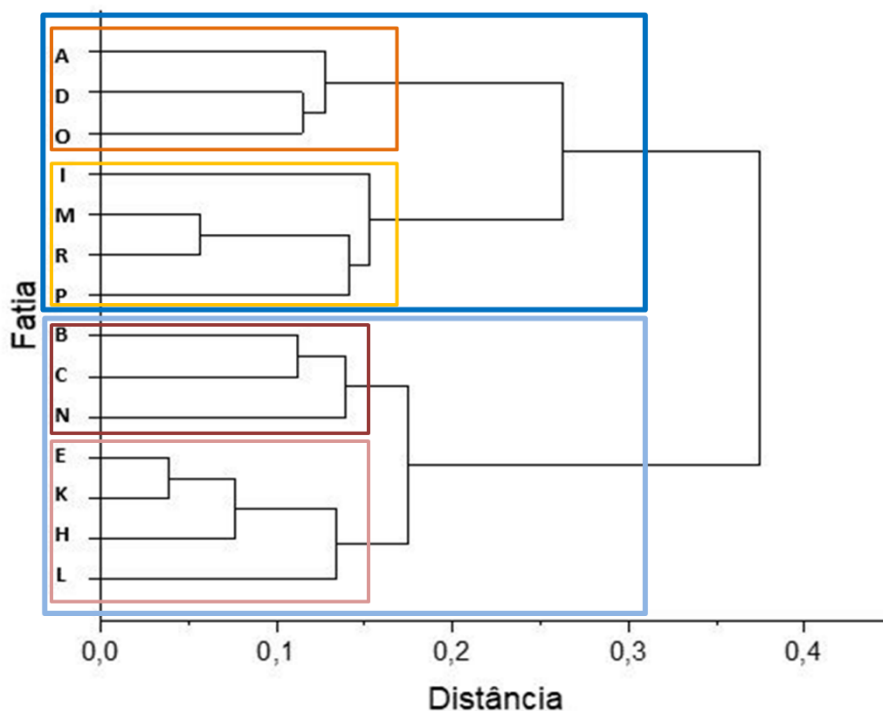


Figura 29 - Dendrograma das concentrações de todos os elementos estudados em cada fatia.

É possível destacar dois grandes clusters: o primeiro, constituído pelos ossos A, D, O, I, M, R e P; e o segundo, constituído pelos ossos B, C, E, K, H e L. Dentro do primeiro cluster, é possível ainda destacar-se dois subgrupos distintos, nomeadamente, o que é constituído pelos ossos A, D e O; e o que é constituído pelos ossos I, M, R e P. Analogamente, o segundo cluster também pode ser dividido em dois subgrupos: o que é constituído pelos ossos B, C e N; e o que é constituído pelos ossos E, K, H e L.

O *software* destacou como amostra mais representativa a fatia do osso N e como menos representativa a do osso O.

O critério usado pelo *software* para o agrupamento em clusters foi o da menor distância euclidiana. Inicialmente, suspeitou-se que esta poderia estar relacionada com

o sexo ou com a classe etária dos indivíduos, mas rapidamente se percebeu que isso não se verificava. No que toca à classe etária, o osso M é um único classificado como Não Adulto, pelo que a junção dos ossos em clusters não pode ser explicada por este fator. No que toca ao sexo, os ossos que o *software* indicou como os que têm um maior grau de semelhança (traduzido por uma menor distância no dendrograma), nomeadamente, os ossos E e K, pertencem a indivíduos com sexos opostos.

Os resultados obtidos sugerem que as diferenças na composição dos ossos estudados não são devidas à idade ou ao sexo dos indivíduos.

1.2. Relação entre os Elementos Estudados

Com o objetivo de perceber se haveria algum tipo de relação entre os elementos estudados, recorreu-se à análise dos coeficientes de correlação de Pearson, R . Estes coeficientes constituem uma medida da força de associação linear entre duas variáveis, admitindo valores entre -1 e 1. Se R for igual a 1, o aumento de uma variável implica sempre o aumento da outra, numa proporção que é fixa (coeficiente de proporcionalidade). Analogamente, se R for igual a -1, o aumento de uma variável implica sempre a diminuição da outra, numa proporção constante. Por outro lado, se R for 0, não existe qualquer tipo de associação linear entre as duas variáveis estudadas. Considera-se que existe uma relação moderada quando $0,40 < |R| < 0,69$; forte quando $0,70 < |R| < 0,89$; e muito forte quando $0,90 < |R| < 1$ [98].

Com base nas tabelas que constam do apêndice 3, foi construída a matriz do apêndice 4, na qual constam os coeficientes de correlação de Pearson, bem como o p -value que lhes está associado.

Dessa matriz foram destacados apenas os coeficientes de correlação de Pearson com significância estatística, ou seja, associados a um p -value < 0,05 [3]. Com esses valores foram construídas as matrizes das tabelas 6 e 7, onde se explicitam, respetivamente, as correlações positivas e as correlações negativas entre os elementos estudados.

		Correlação Positiva					
		Forte					
		Moderada					
	Al	Si	S	K	Ti	Cr	Fe
Fe				0,72			
Cu							0,72
Zn			0,73				
Br						0,57	
Rb	0,55	0,83					
Sr					0,75		
Pb	0,54						

Tabela 6 - Matriz de correlação de Pearson para associações positivas.

Com base na tabela 6, é possível confirmar a existência de uma correlação positiva forte entre os pares de elementos Fe e K, Cu e Fe, Zn e S, Rb e Si, e Sr e Ti; e uma correlação positiva moderada entre os pares de elementos Br e Cr, Rb e Al, e Pb e Al. Assim sendo, para as amostras analisadas, o aumento da concentração de um dos elementos, implica, em alguma proporção, o aumento da concentração do elemento que faz par com ele.

		Correlação Negativa					
		Muito forte					
		Forte					
		Moderada					
	Al	Si	P	S	Ca	Ti	Zn
P	-0,71	-0,95					
Ca	-0,71	-0,95					
Ti				-0,63			
Zn						-0,67	
As							-0,56
Rb			-0,82		-0,82		

Tabela 7 - Matriz de correlação de Pearson para associações negativas.

Com base na tabela 7, confirma-se a existência de uma correlação negativa muito forte entre os pares de elementos P e Si, e Ca e Si; uma correlação negativa forte entre os pares de elementos P e Al, Ca e Al, Rb e P, e Rb e Ca; e, por fim, uma correlação negativa moderada entre os pares de elementos Ti e S, Zn e Ti, e As e Zn. Deste modo, conclui-se que, para as amostras analisadas, o aumento da concentração de um dos

elementos, implica, em alguma proporção, a diminuição da concentração do elemento que faz par com ele.

Uma vez que o Ca e o P estão presentes na componente mineral do osso, seria expectável que se tivesse obtido uma relação positiva forte para esses elementos. Com base na matriz do apêndice 4, é possível verificar a existência de uma correlação positiva perfeita entre as concentrações de Ca e de P, resultado que pode ser explicado pelo facto de se ter atribuído ao método de quantificação a hidroxiapatite como matriz. Como tal, o *software* quantificou a concentração de Ca e, pela estequiometria, atribui a concentração esperada ao P. Por esse motivo, essa correlação foi excluída da matriz da tabela 6.

De acordo com a literatura[99], seria esperada uma correlação negativa entre o Ca e o Mn e entre o Ca e o Fe, uma vez que o Mn e o Fe originam iões com raios iónicos semelhantes entre si, e que podem ser incorporados no osso *post-mortem*, em caso de contaminações externas, através da substituição dos iões Ca^{2+} . Seria ainda provável que se verificasse uma relação positiva forte entre o Mn e o Fe, uma vez que a similaridade dos seus raios iónicos provoca mobilidade paralela destes elementos no tecido ósseo, de acordo com as suas concentrações. Como essas relações não se verificam, é possível que o Mn e o Fe nos ossos analisados tenham sido incorporados no tecido ósseo *in vivo*.

Analogamente, quando se verifica contaminação do solo do local de exumação com Sr, espera-se que haja uma correlação negativa forte entre o Sr e o Ca, uma vez que o Sr^{2+} é estruturalmente semelhante ao Ca^{2+} e, como tal, também o pode substituir no processo de diagénese[28], [99]. Com base na tabela 7, facilmente se percebe que não se confirma essa correlação negativa, pelo que se conclui que não há indícios de contaminação do solo do local de exumação com Sr.

Trabalhos anteriores[3] encontraram coeficientes de correlação para os elementos Fe e Cu significativamente mais baixos e, como tal, uma correlação mais fraca.

1.3. Hábitos Alimentares da População

Numa investigação paleonutricional, apenas os elementos químicos que são introduzidos e assimilados pelo organismo através da dieta são úteis. Estes elementos são fixados nos ossos em proporções que variam de acordo com a quantidade consumida e estão relacionados com grupos alimentares específicos. Os elementos traço presentes em ossos compactos permitem a reconstrução da dieta predominante de um indivíduo relativamente aos últimos cinco anos da sua vida[100].

Para que um elemento químico seja considerado um bom indicador da dieta alimentar, é necessário que preencha os seguintes requisitos: tem de haver uma relação bem estabelecida entre o elemento e a dieta; o elemento só é absorvido pelos ossos através de alimentos; e a sua concentração não sofre alterações *post-mortem*, ou seja, não é afetada pelo processo de diagénese[32]. Dos elementos estudados neste trabalho, os que melhor satisfazem os requisitos acima mencionados são o Zn e o Sr, pelo que foram estudados com maior minúcia.

Tal como foi referido no Capítulo 3, o Zn e o Cu estão particularmente ligados ao consumo de proteína de origem animal, ao passo que outros elementos, como o Sr e o Mg, são indicadores de dietas ricas em alimentos de origem vegetal. Assim, quando grupos homogéneos de indivíduos de uma mesma região são investigados, é possível formular algumas hipóteses em relação aos seus hábitos alimentares com base na concentração desses elementos nos seus ossos[32].

Ao longo dos anos, os estudos que fizeram comparações entre populações ancestrais e atuais permitiram estabelecer valores-limite para determinadas razões indicativas do tipo de dieta de um indivíduo. Esses valores são aceites por muitos autores e permitem fazer a discriminação da dieta de um grupo de indivíduos com base na composição dos seus remanescentes ósseos[100]. Nas figuras 30, 31 e 32 encontram-se os valores de referência para os rácios mais relevantes, nomeadamente, Zn/Ca, Sr/Ca e Cu/Ca. Importa salientar que, a par com estes, o rácio Mg/Ca também é relevante para tirar ilações em relação à dieta das populações. No entanto, não foi possível estudá-lo, dado que não foi possível detetar a presença de Mg nas amostras analisadas.

Zn/Ca	Dieta
<0,35	Pobre em proteína
0,35-0,60	Moderada
>0,60	Rica em proteína

Figura 30 - Valores de referência para o rácio Zn/Ca. Adaptada da referência [100].

Sr/Ca	Dieta
<0,40	Pobre em vegetais
0,40-0,57	Moderada
>0,57	Rica em vegetais

Figura 31 - Valores de referência para o rácio Sr/Ca. Adaptada da referência [100].

Valores ótimos para Cu/Ca
0,15-0,20

Figura 32 - Valores ótimos para o rácio Cu/Ca. Adaptada da referência [100].

Com base nas concentrações obtidas para cada um dos elementos, calcularam-se os valores dos rácios Zn/Ca, Sr/Ca e Cu/Ca para cada uma das fatias analisadas. Nesse cálculo, as concentrações de Zn, Sr e Cu são expressas em $\mu\text{g/g}$, enquanto as concentrações de Ca são expressas em mg/g . A incerteza associada a cada um dos valores foi determinada pelo método da propagação das incertezas.

Os valores dos rácios obtidos, juntamente com a incerteza que lhes está associada, encontram-se na tabela 8. As células foram programadas no Excel de modo que ficassem preenchidas a verde, amarelo ou vermelho, de acordo com o intervalo de valores em que se encontrasse o rácio, tal como nas figuras 30, 31 e 32.

Tabela 8 - Valores experimentais dos rácios Zn/Ca, Sr/Ca e Cu/Ca.

	Zn/Ca	σ	Sr/Ca	σ	Cu/Ca	σ
A	0,4	0,1	0,7	0,4	0,10	0,09
B	0,3	0,2	1,0	0,5	0,08	0,04
C	0,3	0,1	0,9	0,5	0,08	0,04
D	0,3	0,2	0,7	0,4	0,10	0,04
E	0,3	0,2	1,0	0,5	0,09	0,04
H	0,3	0,1	0,9	0,5	0,09	0,04
I	0,4	0,2	0,6	0,3	0,09	0,04
K	0,4	0,2	0,9	0,5	0,08	0,04
L	0,4	0,2	0,7	0,3	0,07	0,04
M	0,3	0,2	0,8	0,4	0,09	0,04
N	0,3	0,2	0,9	0,5	0,08	0,04
O	0,4	0,2	0,9	0,5	0,08	0,04

P	0,3	0,1	0,8	0,4	0,08	0,03
R	0,4	0,2	0,8	0,4	0,08	0,04

Poucos anos depois de a Necrópole de Cacela Velha ter sido descoberta, Curate[90] fez o relato de um possível caso de brucelose num indivíduo pertencente à população analisada no presente trabalho. Como a brucelose é uma doença ligada ao consumo de animais domésticos e/ou à proximidade aos mesmos, especialmente caprinos, era expectável que o valor dos rácios apontasse para uma dieta rica em proteína de origem animal.

Com base nos valores do rácio Zn/Ca, presentes na tabela 8, é possível verificar que os valores obtidos sugerem que a população não tinha o hábito de consumir proteína de origem animal, especialmente carne. Apenas seis dos catorze indivíduos analisados apresentavam um consumo moderado deste tipo de proteína, sendo que os restantes apresentavam valores indicativos de uma dieta pobre na mesma. Estes resultados são apoiados pelos valores obtidos para o rácio Cu/Ca, que indicam que todos os indivíduos apresentavam um valor inferior ao valor ótimo mínimo (figura 34), sugestivos de um consumo insuficiente de proteína de origem animal, especialmente peixe e moluscos.

Assim sendo, embora se suspeite que a população exumada daquela Necrópole tivesse contacto com animais domésticos, os resultados sugerem que esses animais não seriam para consumo próprio. Supõe-se, então, que a população fizesse criação de animais domésticos para troca ou venda, ou para auxílio na agricultura, e que o consumo desses mesmos animais não fosse um hábito diário, mas sim ligado a rituais e ocasiões especiais.

Do mesmo modo, a proximidade da Necrópole ao mar poderia levantar a suspeita de que a pesca seria a principal atividade para a obtenção de alimentos, mesmo não havendo registo da escavação de materiais associados à mesma, como redes e estacas de madeira, o que poderia ser explicado pela sua perecibilidade[100]. No entanto, os baixos valores do rácio Cu/Ca descartam essa hipótese.

Com base no mesmo rácio, Fornaciari[32] propôs uma maneira de classificar o estado económico de determinada população: quanto mais superior a 0,5 for o rácio Zn/Ca, mais rica será a população; pelo contrário, quanto mais inferior a 0,5 for o rácio,

mais pobre será a população. Com base nos resultados expostos na tabela 8, verifica-se que a classificação de Fornaciari sugere que a população estudada seria pobre, o que suporta a hipótese da criação de animais domésticos para vender ou trocar, ao invés de consumir.

Com base na tabela 8, conclui-se que todos os indivíduos estudados desta população tinham uma dieta muito rica em vegetais. A avaliação antropológica dos ossos exumados da Necrópole Cristã de Cacela Velha indicou que os dentes do indivíduo A ostentavam um desgaste dentário severo, possivelmente relacionado com o consumo de uma dieta abrasiva, abundante em fibras vegetais, facto que apoia os resultados obtidos neste trabalho.

1.3.1. Comparação dos Resultados com os de Estudos Anteriores

Ao analisar os remanescentes ósseos de uma população dos II e I Milénios A. N. E., estabelecida também na região de Cacela, Santos[7] também concluiu que nenhum dos indivíduos apresentava uma dieta rica em proteína animal. A percentagem de indivíduos com uma dieta pobre em proteína era, no entanto, bastante superior à encontrada no presente trabalho (87,5% em contraste com, sensivelmente, 57%). No que respeita ao consumo de vegetais, verificou que 75% da população tinha uma dieta pobre em vegetais e que 25% tinha uma dieta moderada, não havendo nenhum indivíduo com uma dieta rica em vegetais.

Supõe-se que, ao longo dos séculos, as populações que se estabeleceram na zona de Cacela tenham introduzido ligeiramente mais proteína de origem animal na sua dieta. O aumento drástico do consumo de vegetais registado no presente trabalho, comparativamente com o trabalho anterior[7], pode estar relacionado com o aumento da diversidade de produtos hortícolas, bem como com o desenvolvimento da agricultura.

1.4. Variação das Concentrações dos Elementos em Profundidade

Tal como foi previamente referido, a análise em profundidade foi realizada com o objetivo de perceber de que forma se distribuíam os elementos traço, em profundidade, na superfície de corte de cada fatia, com o intuito de detetar eventuais contaminações externas.

A título de exemplo, apresentam-se os resultados obtidos para a análise de uma das linhas da fatia B_1, fatia essa que se encontra representada na figura 26. Esses resultados encontram-se acompanhados pela respetiva incerteza, determinada pelo método da propagação das incertezas. É importante ressaltar que os pontos da linha foram selecionados como ilustrado na figura 25.

A tabela de valores com que se construíram os gráficos para a análise em profundidade encontra-se no apêndice 5. Os gráficos respeitantes aos elementos que não se consideraram relevantes para esta secção, por não sugerirem qualquer ligação a contaminações externas, encontram-se no apêndice 6, e os mapas da fatia B_1 que não se apresentam abaixo, estão presentes no apêndice 7.

Uma vez que o Ca é constituinte da hidroxiapatite, está presente ao longo da totalidade da superfície de corte da fatia. Além disso, por ser um elemento da matriz, encontra-se em quantidades significativamente superiores às dos restantes elementos analisados nesta secção. Como tal, apresentam-se, abaixo, o gráfico que ilustra a variação da concentração de Ca em profundidade (figura 33), seguido da imagem resultante do mapeamento para o mesmo elemento (figura 34), para que sirvam de referência para o estudo dos restantes elementos.

Verifica-se que, para os pontos analisados, a concentração de Ca em profundidade sofre uma variação inferior a 5%.

A figura 34 ilustra claramente que os elementos presentes na matriz do osso originam mapas límpidos, com contornos bem definidos e bastante uniformes ao longo da superfície de corte do osso.

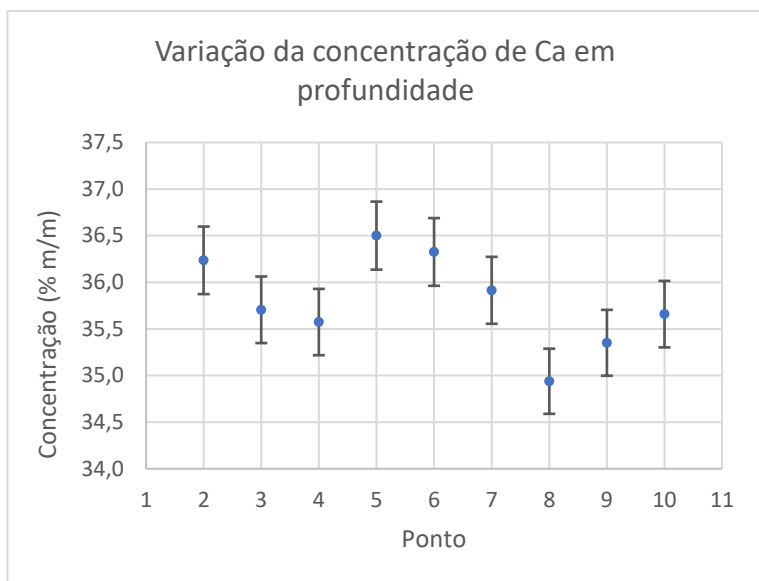


Figura 33 - Variação da concentração de Ca em profundidade e respetiva incerteza, determinada pelo método da propagação das incertezas.

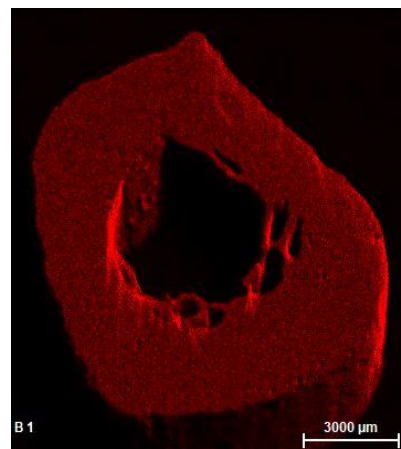


Figura 34 - Distribuição do Ca ao longo da superfície de corte da fatia.

Analisando o gráfico da figura 35, verifica-se que a concentração de Al nos pontos 2 e 10, correspondentes, respetivamente, ao ponto mais próximo da superfície externa da fatia e ao ponto mais próximo da superfície interna da fatia, se encontra aumentada em relação à concentração nos restantes pontos. Este aumento pode sugerir que houve incorporação de Al no osso *post-mortem*, possivelmente devido a elevadas concentrações de Al no solo do local de exumação dos remanescentes ósseos.

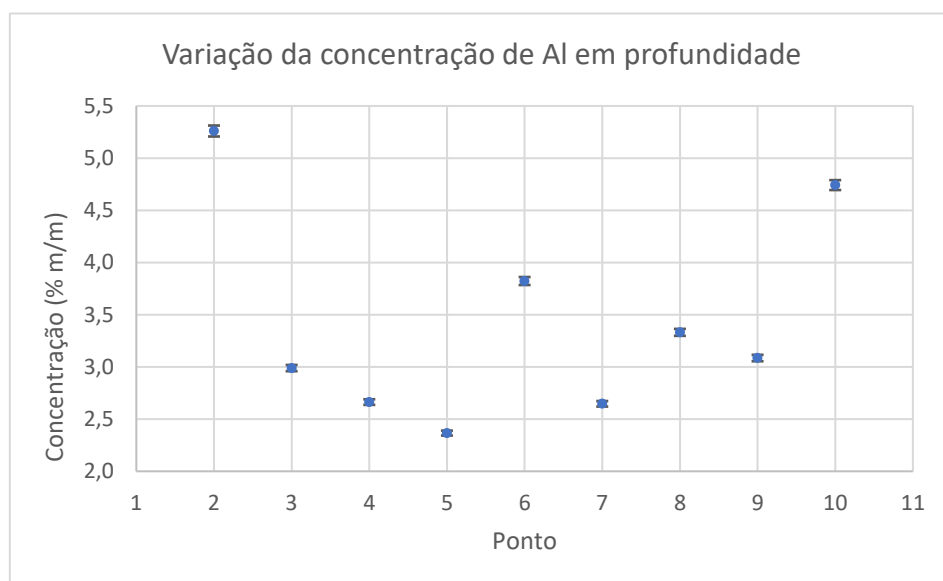


Figura 35 - Variação da concentração de Al em profundidade e respetiva incerteza, determinada pelo método da propagação das incertezas.

Analisando os gráficos das figuras 36 e 37, referentes às variações das concentrações de K e de Fe em profundidade, respetivamente, é possível verificar um aumento considerável das concentrações de ambos os elementos nas proximidades da superfície interna da fatia. Isto sugere possível contaminação do solo acumulado nas trabéculas da ulna com K e Fe, mas não do solo que envolvia os componentes esqueléticos.

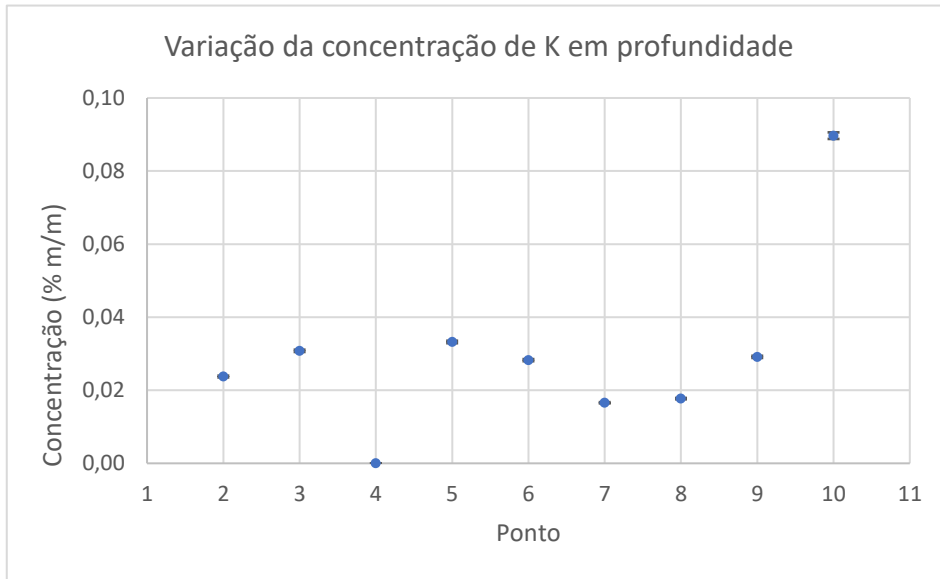


Figura 36 - Variação da concentração de K em profundidade e respetiva incerteza, determinada pelo método da propagação das incertezas.

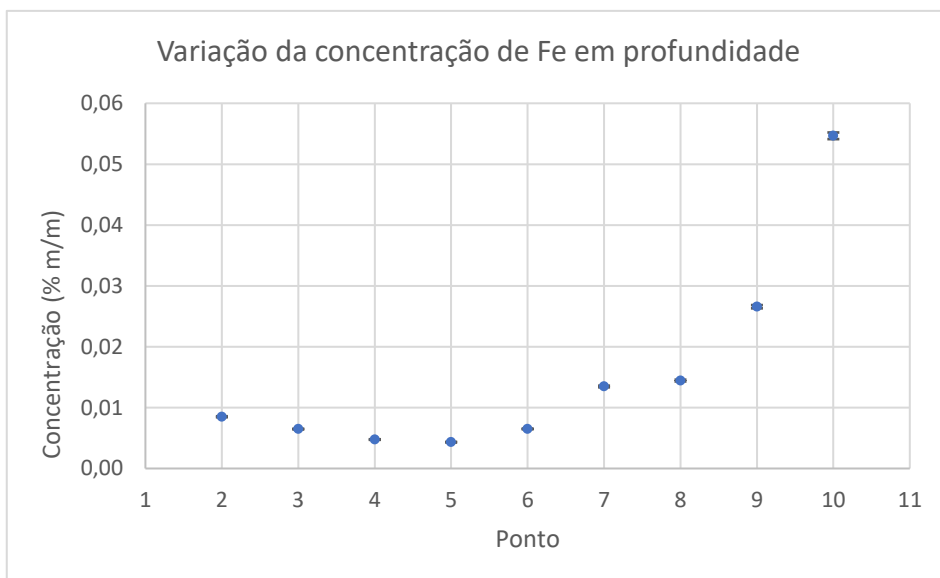


Figura 37 - Variação da concentração de Fe em profundidade e respetiva incerteza, determinada pelo método da propagação das incertezas.

Nas figuras 38 e 39 encontram-se, respectivamente, os mapeamentos dos elementos K e Fe para a mesma fatia. Embora, na figura 38, não se consiga comprovar a maior concentração de K na superfície interna da fatia, na figura 39 facilmente se observa um anel roxo brilhante sobre a delimitação interna da fatia, indicativo de uma maior concentração de Fe nesse local.

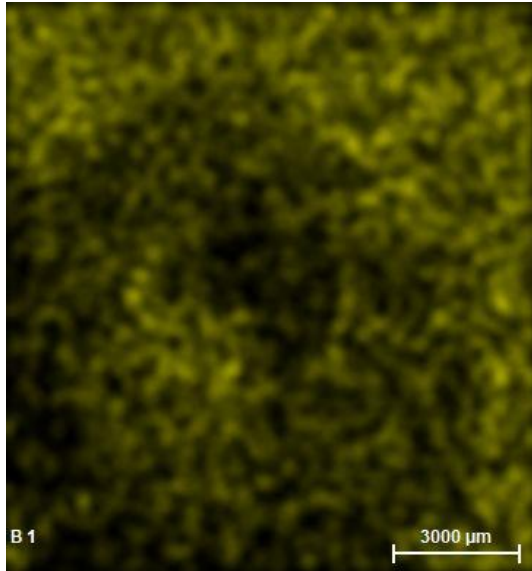


Figura 38 - Distribuição do K ao longo da superfície de corte da fatia.

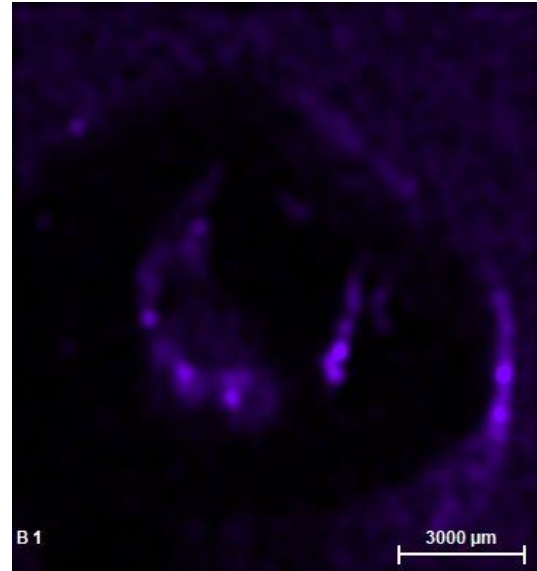


Figura 39 - Distribuição do Fe ao longo da superfície de corte da fatia.

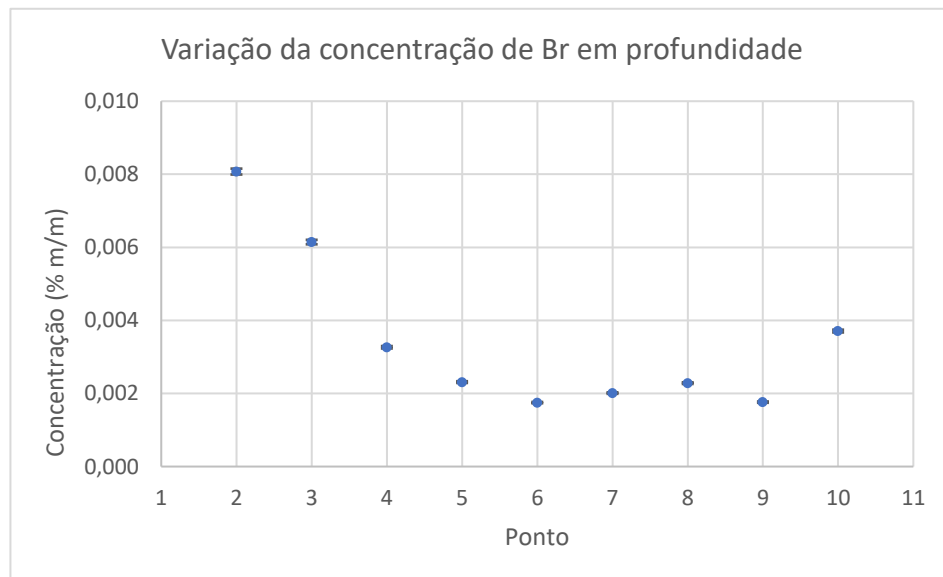


Figura 40 - Variação da concentração de Br em profundidade e respectiva incerteza, determinada pelo método da propagação das incertezas.

No caso do Br (figura 40), verifica-se um aumento considerável da sua concentração na superfície mais externa da fatia, o que sugere contaminação do solo do local de exumação com Br. Este resultado é reiterado no mapa da fatia para este elemento, presente na figura 41, abaixo, onde se verifica que a zona mais brilhante da figura corresponde ao limite externo da amostra.

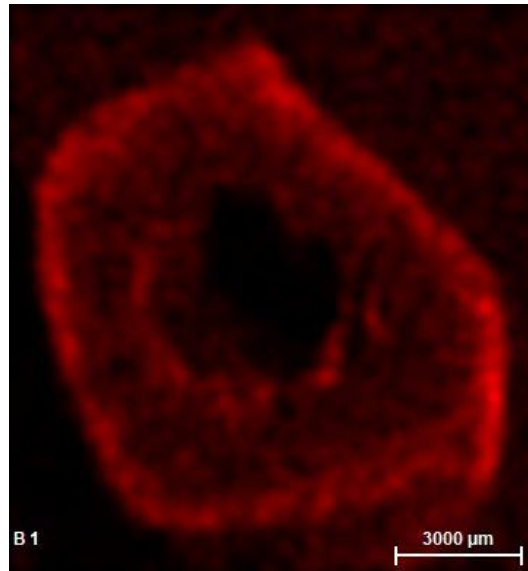


Figura 41 - Distribuição do Br ao longo da superfície de corte da fatia.

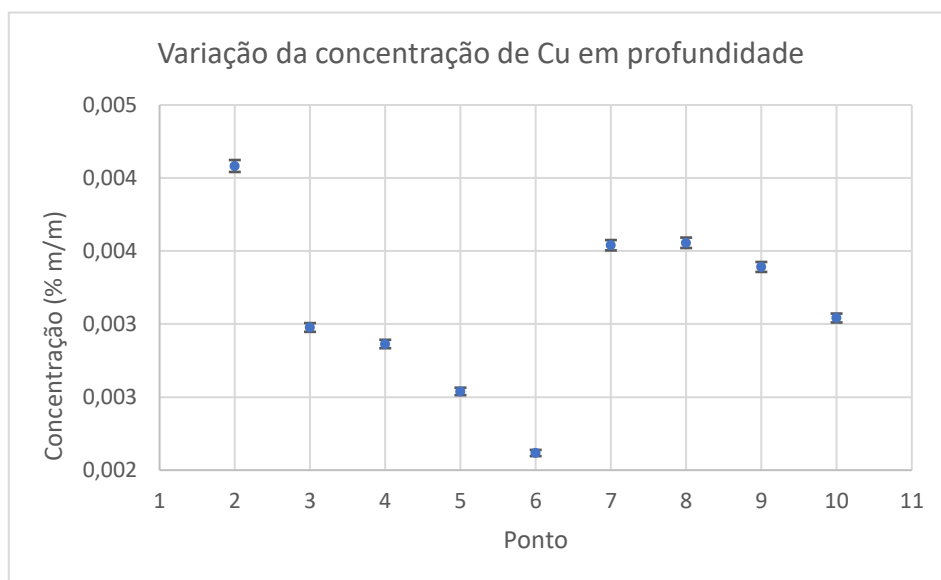


Figura 42 - Variação da concentração de Cu em profundidade e respetiva incerteza, determinada pelo método da propagação das incertezas.

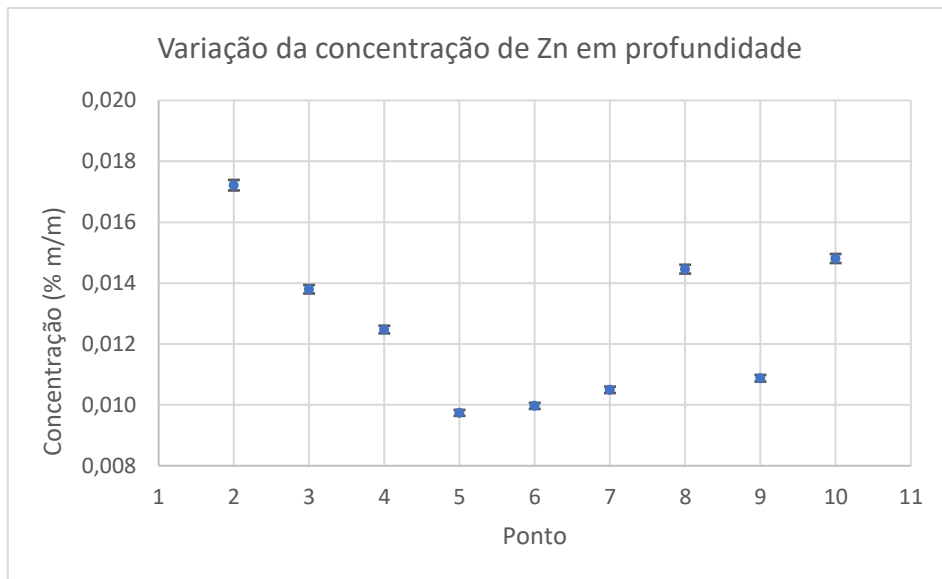


Figura 43 - Variação da concentração de Zn em profundidade e respetiva incerteza, determinada pelo método da propagação das incertezas.

Relativamente aos elementos Cu e Zn, cujas variações se encontram nas figuras 42 e 43, respetivamente, verifica-se um ligeiro aumento das suas concentrações na superfície externa da fatia, que pode estar também relacionado com contaminações externas. Nas figuras 44 e 45 encontram-se, respetivamente, os mapeamentos dos elementos Cu e Zn. Embora, na figura 44, não se consiga comprovar a maior concentração de Cu na superfície externa da fatia, na figura 45 observa-se o contorno da superfície externa da fatia a azul mais brilhante, indicativo de uma maior concentração de Zn nesse local.

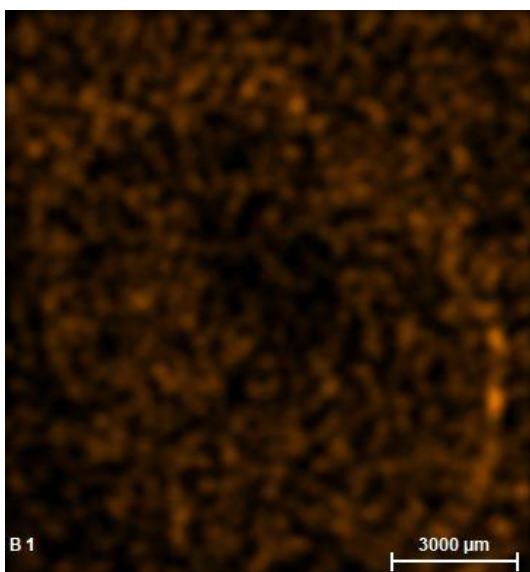


Figura 44 - Distribuição do Cu ao longo da superfície de corte da fatia.

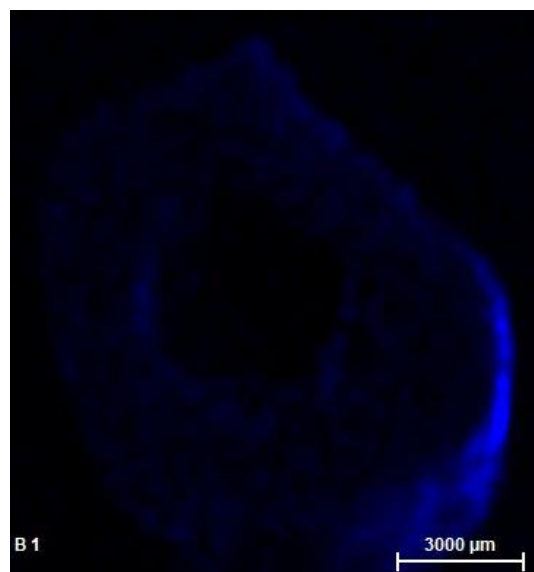


Figura 45 - Distribuição do Zn ao longo da superfície de corte da fatia.

O relatório preliminar da escavação, fornecido pelo antropólogo Doutor Francisco Curate, lista alguns materiais recuperados nas proximidades dos remanescentes ósseos exumados da Necrópole Cristã de Cacela Velha, nomeadamente, cerâmicas, pregos, tachas, alfinetes e argolas de cobre. Os remanescentes esqueléticos do indivíduo B, exumado da sepultura 17, usado como exemplo nesta secção, foram encontrados junto de fragmentos cerâmicos, que poderão estar relacionados com as contaminações de Al aqui relatadas. De forma geral, a lista de artefactos pode justificar as possíveis contaminações dos fragmentos ósseos com Al, Cu e Fe.

A proximidade da Necrópole ao mar pode explicar a contaminação do solo do local de exumação com Br[25]. No caso do K e do Zn, não é clara a origem da contaminação, mas pensa-se que tenha que ver com a origem das rochas que constituem os solos da região.

2. Análise com Microscopia Raman

2.1. Composição das Amostras

À semelhança do que se fez na análise com μ -EDXRF, com base nos valores médios das áreas dos picos de interesse, presentes na tabela do apêndice 8, construiu-se o dendrograma da figura 46.

É notória a dissemelhança entre a fatia do osso B e as restantes fatias e, com exceção dessa, destacam-se dois grandes clusters: o primeiro, constituído pelos ossos A, C, D, I e N; e o segundo, constituído pelos ossos E, O, L, R, P, H, K e M. Dentro do primeiro cluster, a fatia do osso A é a menos semelhante às restantes. Dentro do segundo cluster, as fatias dos ossos H, K e M são muito mais semelhantes entre si do que as restantes.

O *software* destacou como amostra mais representativa a do osso O e como menos representativa a do osso B.

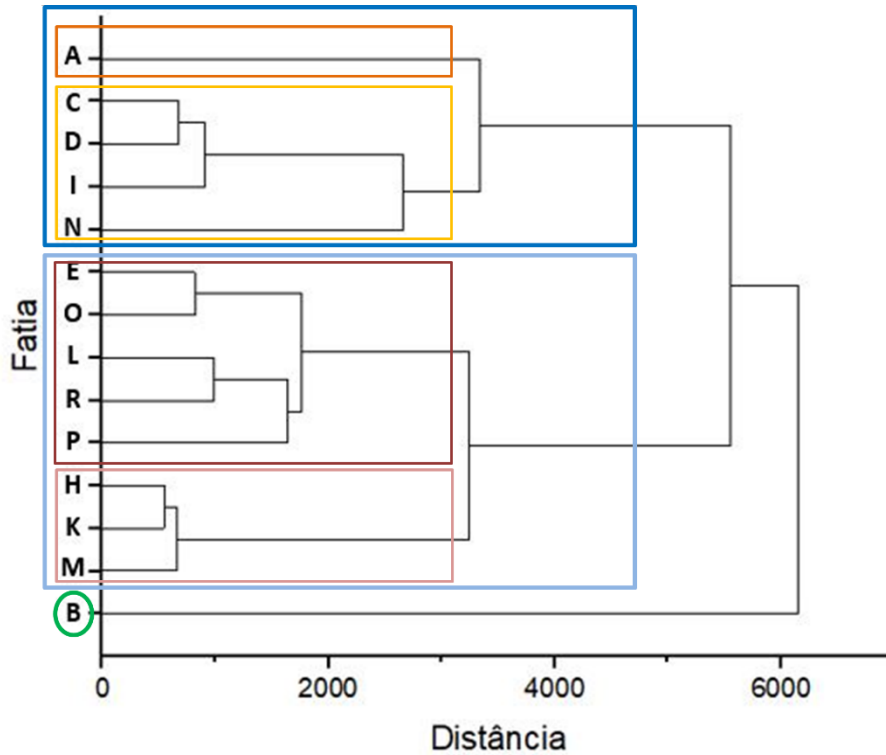


Figura 46 - Dendrograma das áreas dos picos estudados em cada fatia.

2.2. Qualidade do Tecido Ósseo

Tal como foi mencionado anteriormente, a espectroscopia Raman tem sido usada para avaliar alterações na composição do tecido ósseo, associadas ao envelhecimento, doença e lesão.

Os indicadores mais fortes das propriedades mecânicas de determinado osso são os rácios Mineral/Matriz e Carbonato/Fosfato. O rácio Mineral/Matriz indica o grau de mineralização do osso e, embora ainda não tenha sido calibrado para a espectroscopia Raman com materiais de referência, pode ser usado para detetar tendências na composição dos ossos de uma população. O rácio Carbonato/Fosfato, por sua vez, pode fornecer informações relativas à composição química do tecido ósseo analisado, uma

vez que essa composição sofre alterações de acordo com a arquitetura do próprio osso, idade do indivíduo e cristalinidade da componente mineral[48].

Com recurso aos valores das áreas dos picos presentes na tabela do apêndice 8, calcularam-se os rácios Mineral/Matriz, através do cálculo da razão entre as áreas dos picos do $\nu_1 \text{PO}_4^{3-}$ e da Amida I, e Carbonato/Fosfato, através do cálculo da razão entre as áreas dos picos do CO_3^{2-} e do $\nu_1 \text{PO}_4^{3-}$. Nas figuras 47 e 48, abaixo, estão presentes os resultados obtidos para esses mesmos rácios. A tabela que contém os valores dos rácios, bem como a incerteza que lhes está associada, está presente no apêndice 9.

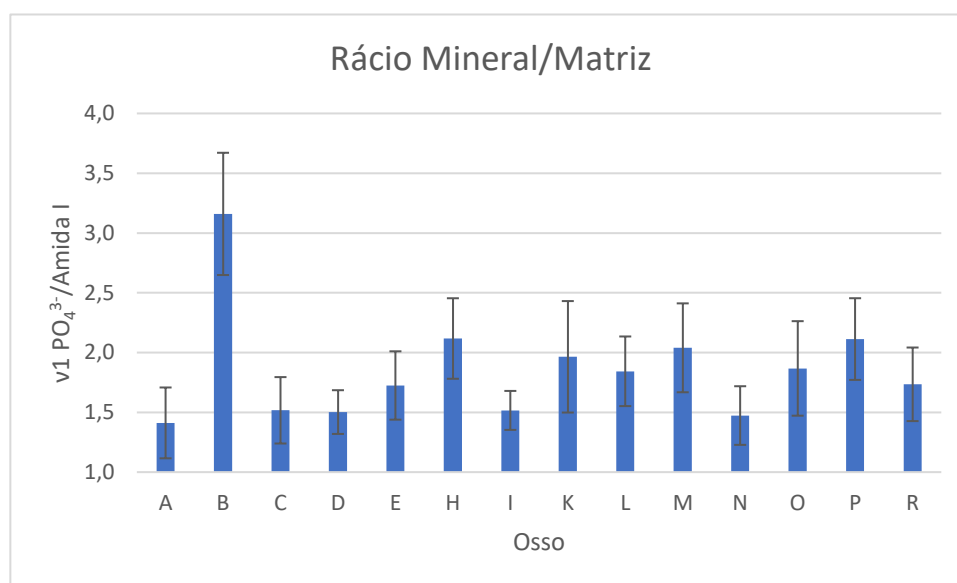


Figura 47 - Gráfico dos valores experimentais do rácio Mineral/Matriz para cada uma das amostras analisadas. As incertezas foram determinadas pelo método da propagação das incertezas.

Os valores experimentais obtidos para o rácio Mineral/Matriz apresentam um valor médio de $1,9 \pm 0,4$. Por análise da figura 47, é possível verificar que, para o osso B, o valor deste rácio é muito superior ao valor médio (cerca de 1,68 vezes), o que se traduz por um maior grau de mineralização deste osso face aos restantes. Com exceção desse, verifica-se que os ossos H, K, M e P apresentam um rácio superior à média, ao passo que os restantes ossos apresentam um rácio inferior.

Comparando estes resultados com o dendrograma da figura 46, suspeita-se que a dissimilaridade do osso B face aos restantes pode ser justificada com base no rácio Mineral/Matriz, uma vez que o seu valor se destaca tanto dos valores respeitantes às outras fatias. A semelhança entre as fatias H, K e M, previamente referida, poderá ser explicada pela proximidade dos seus rácios Mineral/Matriz, do mesmo modo que a

junção do cluster do dendrograma, formado pelos ossos A, C, D, I e N, também poderá estar relacionada com este rácio.

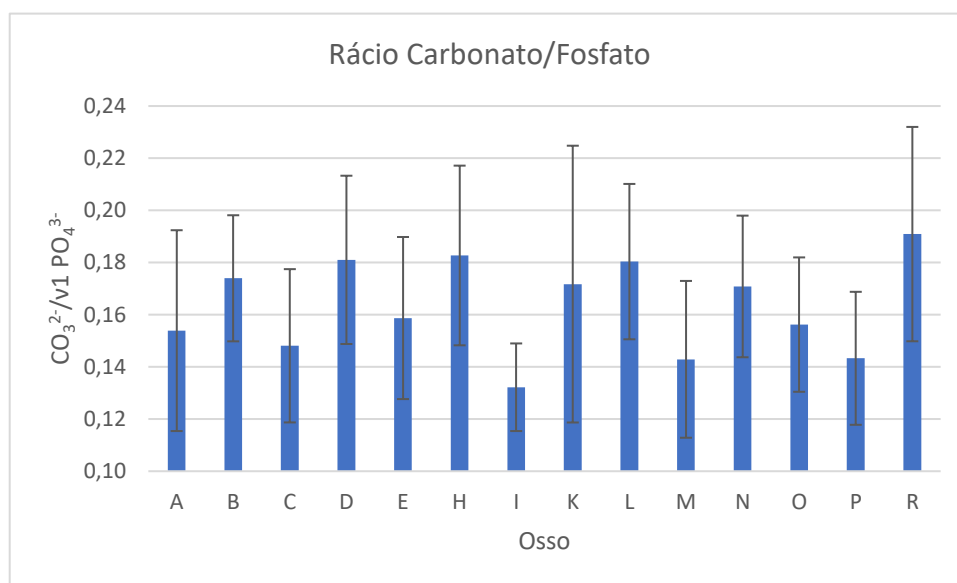


Figura 48 - Gráfico dos valores experimentais do rácio Carbonato/Fosfato para cada uma das amostras analisadas. As incertezas foram determinadas pelo método da propagação das incertezas.

Para o rácio Carbonato/Fosfato (figura 48), obteve-se um valor médio de $0,16 \pm 0,02$. Não se verificam grandes discrepâncias entre os valores experimentais obtidos para este rácio, sendo o valor mais baixo correspondente ao osso I, o que evidencia uma menor substituição do fosfato por carbonato, e o valor mais alto correspondente ao osso R, o que evidencia uma maior substituição do fosfato por carbonato.

Ao contrário do que se verificou com o rácio Mineral/Matriz, os resultados obtidos para o rácio Carbonato/Fosfato não parecem justificar o agrupamento dos ossos nos clusters mostrados no dendrograma da figura 46. Podem, no entanto, explicar o facto de haver uma maior proximidade entre os ossos H e K, relativamente ao osso M.

A medida mais acessível, em contexto experimental, para aferir a cristalinidade mineral de um osso é a largura a meia altura, *FWHM* (do inglês, *Full Width at Half Maximum*), da banda de alongamento simétrico do fosfato[48], sendo que estas medidas são inversamente proporcionais, i. e., quanto menor for a largura a meia altura da banda do $v1 PO_4^{3-}$, maior a cristalinidade mineral do osso[49].

Na figura 49 encontram-se os valores experimentais da largura a meia altura dessa mesma banda. A tabela que contém os valores fornecidos pelo *OriginPro*, bem como a incerteza que lhes está associada, está presente no apêndice 9.

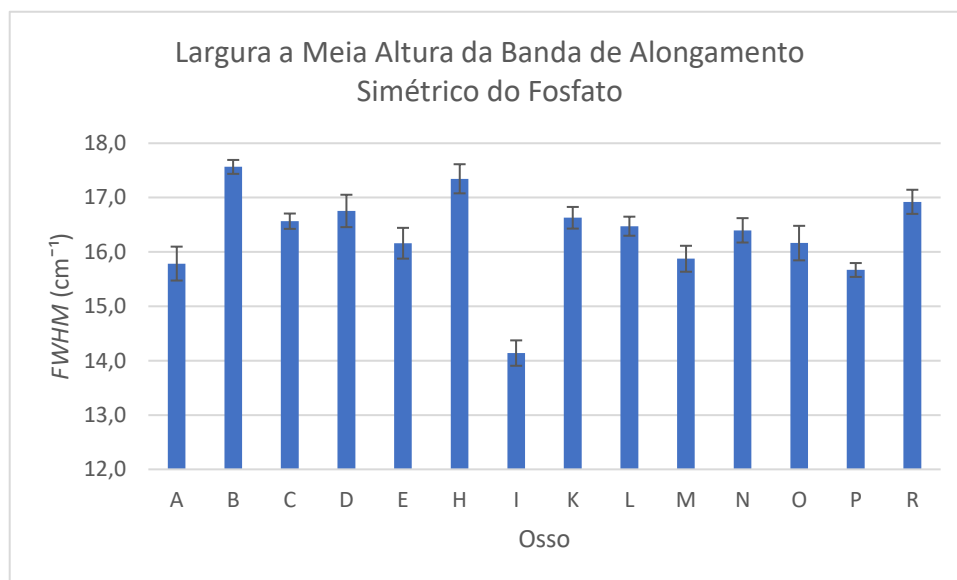


Figura 49 - Gráfico dos valores experimentais da FWHM da banda correspondente ao v1 PO43- para cada uma das amostras analisadas. As incertezas foram determinadas pelo método da propagação das incertezas.

O valor experimental médio obtido para a largura a meia altura da banda de alongamento simétrico do fosfato foi de $(16,3 \pm 0,8) \text{ cm}^{-1}$. O osso que apresenta um maior valor de *FWHM* é o osso B, o que significa que é o osso que apresenta menor cristalinidade mineral; e o que apresenta menor valor é o osso I, o que se traduz por uma maior cristalinidade mineral.

2.3. Relação entre as Medidas da Qualidade do Tecido Ósseo

Com o objetivo de perceber se existe alguma relação entre as diferentes medidas da qualidade do tecido ósseo analisadas no presente trabalho, nomeadamente, entre os rácios Mineral/Matriz e Carbonato/Fosfato, e a largura a meia altura para a banda de

alongamento simétrico do fosfato, recorreu-se novamente à análise dos coeficientes de correlação de Pearson, *R*.

Com base nas tabelas que constam do apêndice 9, construiu-se a matriz de correlação de Pearson da tabela 9, apresentada abaixo. Nela encontram-se destacados, a cinzento, os valores de *p-value* inferiores a 0,05, bem como os coeficientes de correlação que lhes estão associados, de acordo com a legenda.

		Correlação Positiva		
		Forte		
		<i>FWHM</i>	Mineral/Matriz	Carbonato/Fosfato
<i>FWHM</i>	Pearson Corr.			
<i>FWHM</i>	p-value	--		
Mineral/Matriz	Pearson Corr.	0,48		
Mineral/Matriz	p-value	0,083	--	
Carbonato/Fosfato	Pearson Corr.	0,81	0,18	
Carbonato/Fosfato	p-value	0,001	0,522	--

Tabela 9 - Matriz de correlação de Pearson para associações com significância estatística.

Através da análise da matriz é possível verificar que apenas um dos três coeficientes tem significância estatística e, como tal, destaca-se apenas a correlação positiva forte existente entre a largura a meia altura da banda de alongamento simétrico do fosfato e o rácio Carbonato/Fosfato. Isto implica que, para a população analisada, um aumento da largura a meia altura implica sempre um aumento do rácio Carbonato/Fosfato, numa proporção variável. De forma equivalente, a diminuição da largura a meia altura também implicará a redução do rácio Carbonato/Fosfato, numa proporção variável.

De acordo com Morris & Mandair[50], para tecido ósseo de diversos animais, uma maior cristalinidade mineral implica uma largura a meia altura inferior para as bandas de fosfato, o que é traduzido por uma menor substituição do fosfato por carbonato (ou seja, por uma redução do rácio carbonato/fosfato). No entanto, em amostras de tecido ósseo humano, esta tendência pode não se verificar. Neste trabalho, foi possível constatar a relação positiva entre essas duas medidas.

Conclusões e Perspetivas Futuras

1. Conclusões

Este trabalho trouxe uma maior noção do *ethos* da população que habitou a área de Cacela Velha, nos séculos XIII a XVI, cujos remanescentes ósseos foram recuperados da Necrópole Cristã dessa região, em escavações decorridas em 1998 e 2001. Foram analisados catorze ossos, respeitantes a indivíduos diferentes, sendo que nove eram do sexo masculino, quatro do sexo feminino e um indefinido, e que treze eram adultos, havendo apenas um indivíduo não adulto.

Não foram detetados valores anormais de metais pesados nas amostras de tecido ósseo estudadas, pelo que a exposição *in vivo* aos mesmos seria reduzida. Deste modo, não foi possível analisar a sua distribuição ao longo dos ossos, nem a toxicocinética dos mesmos.

Embora vivessem perto do mar e tivessem contacto com animais domésticos, a dieta destes indivíduos seria maioritariamente pobre em proteína de origem animal, incluindo carnes, peixes e moluscos, e bastante rica em vegetais.

A proximidade ao mar explica a possível contaminação do solo com bromo e, consequentemente, as contaminações *post-mortem* detetadas na superfície externa dos ossos analisados. Registaram-se ainda contaminações *post-mortem* por parte dos elementos alumínio, potássio, ferro, cobre e zinco, possivelmente ligadas aos materiais exumados juntamente com os remanescentes esqueléticos (fragmentos cerâmicos, pregos, tachas, alfinetes e argolas de cobre) e ao tipo de rochas que esteve na origem dos sedimentos constituintes do solo do local de exumação.

No que toca à qualidade do tecido ósseo das amostras analisadas, foi possível concluir que a amostra B apresentava um maior grau de mineralização face às restantes;

que a R apresentava uma maior substituição do fosfato por carbonato; e que a I apresentava uma maior cristalinidade mineral.

2. Perspetivas Futuras

Para reiterar os resultados encontrados para as amostras estudadas no presente trabalho, bem como alargar os conhecimentos relativos ao *ethos* desta população, seria importante fazer a análise de um maior número de indivíduos da mesma. Além disso, a análise de mais ossos de um mesmo indivíduo poderia trazer informações novas relativas, por exemplo, às práticas medicinais, na eventualidade de se fazerem tratamentos locais com algum elemento tóxico, como o Hg, informações essas que este trabalho não conseguiu obter, em parte, por se ter analisado apenas um osso por indivíduo.

Por forma a confirmar os resultados obtidos na análise em profundidade, posteriormente confirmados pelo mapeamento das fatias, relativos a possíveis contaminações externas, seria relevante analisar-se amostras de solo do local de exumação.

No que toca aos hábitos alimentares, o estudo do rácio Mg/Ca seria de extrema importância para avaliar a prevalência dos cereais na dieta desta população. Assim sendo, no futuro, seria importante associar à metodologia usada neste trabalho uma técnica complementar capaz de detetar Mg, como, por exemplo, a técnica PIGE (*Particle Induced Gamma-ray Emission*)[101].

Por último, pensa-se que seria pertinente atribuir classes etárias mais detalhadas aos indivíduos, ao invés de os classificar apenas enquanto adultos e não adultos, para, posteriormente, se estabelecer a relação entre as concentrações dos elementos estudados e a idade dos mesmos, uma vez que é usual verificar-se diferenças significativas nas concentrações de Zn, Sr e Pb em indivíduos mais velhos, quando comparados com indivíduos jovens[3].



Bibliografia

- [1] A. A. Dias, M. Carvalho, M. L. Carvalho, and 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," *J. Anal. At. Spectrom.*, vol. 30, no. 12, pp. 2488–2495, 2015.
- [2] T. Almeida, "Estudo da Distribuição de Elementos Vestigiais em Tecidos Humanos Saudáveis e com Carcinoma por Espectrometria de Raios-X," (Tese de Doutoramento), DF, UL, Lisboa, PT, 2007.
- [3] M. L. Carvalho, J. Brito, and M. A. Barreiros, "Study of Trace Element Concentrations in Human Tissues by EDXRF Spectrometry," *X-Ray Spectrom.*, vol. 27, no. 3, pp. 198–204, 1998.
- [4] S. Pessanha, M. Carvalho, M. L. Carvalho, and A. Dias, "Quantitative analysis of human remains from 18th-19th centuries using X-ray fluorescence techniques: The mysterious high content of mercury in hair," *J. Trace Elem. Med. Biol.*, vol. 33, pp. 26–30, 2016.
- [5] D. Guimarães *et al.*, "Quantitative determinations and imaging in different structures of buried human bones from the XVIII-XIXth centuries by energy dispersive X-ray fluorescence - Postmortem evaluation," *Talanta*, vol. 155, pp. 107–115, 2016.
- [6] L. Imbert *et al.*, "Dynamic structure and composition of bone investigated by nanoscale infrared spectroscopy," *PLoS One*, vol. 13, no. 9, pp. 1–16, 2018.
- [7] F. Santos, "Estudo espectral de estruturas ósseas para avaliação da contaminação por metais pesados," (Dissertação de Mestrado), DF, FCT/UNL, Caparica, PT, 2020.
- [8] S. Viguier-Carrin, P. Garnero, and P. D. Delmas, "The role of collagen in bone strength," *Osteoporos. Int.*, vol. 17, no. 3, pp. 319–336, 2006.

- [9] J. Belinha, "Bone Tissue Remodelling Analysis," in *Meshless Methods in Biomechanics*, Springer, Cham, 2014, pp. 251–316.
- [10] X. Wang, J. S. Nyman, X. Dong, H. Leng, and M. Reyes, "Fundamental Biomechanics in Bone Tissue Engineering," in *Synthesis Lectures on Tissue Engineering*, vol. 2, no. 1, Morgan & Claypool, 2010, pp. 1–225.
- [11] J. Y. Rho, L. Kuhn-Spearing, and P. Zioupos, "Mechanical properties and the hierarchical structure of bone," *Med. Eng. Phys.*, vol. 20, no. 2, pp. 92–102, 1998.
- [12] M. Walden, "Bone Structure," *Teach PE*, 2021. [Online]. Available: <https://www.teachpe.com/anatomy-physiology/structure-of-bones>. [Accessed: 04-Feb-2021].
- [13] M. E. Ruppel, L. M. Miller, and D. B. Burr, "The effect of the microscopic and nanoscale structure on bone fragility," *Osteoporos. Int.*, vol. 19, no. 9, pp. 1251–1265, 2008.
- [14] C. da Silva Madaleno, J. Jatzlau, and P. Knaus, "BMP signalling in a mechanical context – Implications for bone biology," *Bone*, vol. 137, no. Maio, p. 115416, 2020.
- [15] M. L. Carvalho, A. F. Marques, M. T. Lima, and U. Reus, "Trace elements distribution and post-mortem intake in human bones from Middle Age by total reflection X-ray fluorescence," *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.*, vol. 59, no. 8, pp. 1251–1257, 2004.
- [16] Y. Yin, Q. Tang, M. Xie, L. Hu, and L. Chen, "Insights into the mechanism of vascular endothelial cells on bone biology," *Biosci. Rep.*, vol. 41, no. 1, pp. 1–15, 2021.
- [17] J. Rebôcho, M. L. Carvalho, A. F. Marques, F. R. Ferreira, and D. R. Chettle, "Lead post-mortem intake in human bones of ancient populations by 109Cd-based X-ray fluorescence and EDXRF," *Talanta*, vol. 70, no. 5, pp. 957–961, 2006.
- [18] W. Mertz, "The essential trace elements," *Science*, vol. 213, no. 4514, pp. 1332–1338, 1981.
- [19] C. G. Fraga, "Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health," *Mol. Aspects Med.*, vol. 26, no. 4-5 SPEC. ISS., pp. 235–244, 2005.
- [20] O. Wada, "What are Trace Elements ? — Their deficiency and excess states," *Jpn Med Assoc J*, vol. 47, no. 5, p. 351, 2004.
- [21] S. Strachan, "Trace elements," *Curr. Anaesth. Crit. Care*, vol. 21, no. 1, pp. 44–48,

- 2010.
- [22] F. S. Al-Fartusie and S. N. Mohssan, "Essential Trace Elements and Their Vital Roles in Human Body," *Indian J. Adv. Chem. Sci.*, vol. 5, no. 3, pp. 127–136, 2017.
- [23] R. Chitturi, V. R. Baddam, L. Prasad, L. Prashanth, and K. Kattapagari, "A review on role of essential trace elements in health and disease," *J. Dr. NTR Univ. Heal. Sci.*, vol. 4, no. 2, p. 75, 2015.
- [24] Y. İzci *et al.*, "Paleodietary Analysis of Human Remains from a Hellenistic-Roman Cemetery at Camihöyük, Turkey," *J. Anthropol.*, vol. 2013, no. September 2014, pp. 1–7, 2013.
- [25] A. E. Dolphin, S. J. Naftel, A. J. Nelson, R. R. Martin, and C. D. White, "Bromine in teeth and bone as an indicator of marine diet," *J. Archaeol. Sci.*, vol. 40, no. 4, pp. 1778–1786, 2013.
- [26] M. Carvalho, "Fluorescência de raios-X aplicada ao estudo de ossadas humanas," (Dissertação de Mestrado), DF, FCT/UNL, Caparica, PT, 2015.
- [27] R. Allmäe, J. Limbo-Simovart, L. Heapost, and E. Verš, "The content of chemical elements in archaeological human bones as a source of nutrition research," *Pap. Anthropol.*, vol. 21, p. 27, 2012.
- [28] V. Höllriegl and H. Z. München, "Strontium in the Environment and Possible Human Health Effects," *Encycl. Environ. Heal.*, pp. 268–275, 2011.
- [29] F. H. Nielsen, "Ultratrace elements in nutrition: Current knowledge and speculation," *J. Trace Elem. Exp. Med.*, vol. 11, no. 2–3, pp. 251–274, 1998.
- [30] P. B. Tchounwou, C. G. Yedjou, A. K. Patlolla, and D. J. Sutton, "Heavy Metal Toxicity and the Environment," *Mol. Clin. Environ. Toxicol.*, no. 101, pp. 133–164, 2012.
- [31] J. Swift *et al.*, "Skeletal arsenic of the pre-Columbian population of Caleta Vitor, northern Chile," *J. Archaeol. Sci.*, vol. 58, pp. 31–45, 2015.
- [32] M. Busetto, L. Giordani, A. Brandone, C. Cattaneo, and A. Mazzucchi, "Dietary investigation by trace element content in bones of ancient inhabitants of Northern Italy," *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, vol. 275, no. 2, pp. 355–363, 2008.
- [33] M. L. Carvalho, S. Santiago, and M. L. Nunes, "Assessment of the essential element and heavy metal content of edible fish muscle," pp. 426–432, 2005.
- [34] J. Rodríguez and P. M. Mandalunis, "A review of metal exposure and its effects on

- bone health," *J. Toxicol.*, vol. 2018, pp. 1–11, 2018.
- [35] W. M. B. Roberts, "Estimation of Strontium in Animal Bone using X-ray Fluorescence Analysis," *Nature*, vol. 183, no. 4665, pp. 887–888, 1959.
- [36] D. L. Thurber, J. L. Kulp, E. Hodges, P. W. Gast, and J. M. Wampler, "Common Strontium Content of the Human Skeleton," *Science*, vol. 128, no. 3318, pp. 256–257, 1958.
- [37] G. E. Harrison, "Estimation of Strontium in Biological Materials by means of a Flame Spectrophotometer," *Nature*, vol. 182, no. 4638, pp. 792–793, 1958.
- [38] N. Zoeger *et al.*, "Determination of the elemental distribution in human joint bones by SR micro XRF," *X-Ray Spectrom.*, vol. 37, no. 1, pp. 3–11, 2007.
- [39] P. Roschger *et al.*, "Bone Material Quality in Transiliac Bone Biopsies of Postmenopausal Osteoporotic Women After 3 Years of Strontium Ranelate Treatment," *J. Bone Miner. Res.*, vol. 25, no. 4, pp. 891–900, 2010.
- [40] D. J. Bellis, D. Li, Z. Chen, W. M. Gibson, and P. J. Parsons, "Measurement of the microdistribution of strontium and lead in bone via benchtop monochromatic microbeam X-ray fluorescence with a low power source," *J. Anal. At. Spectrom.*, vol. 24, no. 5, pp. 622–626, 2009.
- [41] M. L. Carvalho, C. Casaca, T. Pinheiro, J. P. Marques, P. Chevallier, and A. S. Cunha, "Analysis of human teeth and bones from the chalcolithic period by X-ray spectrometry," *Nucl. Instruments Methods Phys.*, vol. 168, no. 4, pp. 559–565, 2000.
- [42] M. L. Carvalho, A. F. Marques, and J. Brito, "Synchrotron Radiation and Energy Dispersive X-Ray Fluorescence Applications on Elemental Distribution in Human Hair and Bones," *AIP Conf. Proc.*, vol. 652, no. 1, pp. 522–528, 2003.
- [43] M. L. Carvalho and A. F. Marques, "Diagenesis evaluation in Middle Ages human bones using EDXRF," *X-Ray Spectrom.*, vol. 37, no. 1, pp. 32–36, 2008.
- [44] C. V. Raman and K. S. Krishnan, "A new type of secondary radiation," *Nature*, vol. 121, no. 3048, pp. 501–502, 1928.
- [45] H. J. Byrne, G. D. Sockalingum, and N. Stone, "Raman microscopy: Complement or competitor?," *RSC Anal. Spectrosc. Ser.*, no. 11, pp. 105–143, 2011.
- [46] M. Schmitt and J. Popp, "Raman spectroscopy at the beginning of the twenty-first century," *J. Raman Spectrosc.*, vol. 37, no. 1–3, pp. 20–28, 2006.

- [47] H. Cui, A. Glidle, and J. M. Cooper, "Highly Efficient Spatially Offset Raman Spectroscopy to Profile Molecular Composition in Bone," *IEEE Access*, vol. 8, pp. 62905–62911, 2020.
- [48] M. D. Morris and G. S. Mandair, "Raman assessment of bone quality," *Clin. Orthop. Relat. Res.*, vol. 469, no. 8, pp. 2160–2169, 2011.
- [49] J. A. Inzana, J. R. Maher, M. Takahata, E. M. Schwarz, A. J. Berger, and H. A. Awad, "Bone fragility beyond strength and mineral density: Raman spectroscopy predicts femoral fracture toughness in a murine model of rheumatoid arthritis," *J. Biomech.*, vol. 46, no. 4, pp. 723–730, 2013.
- [50] B. Busse *et al.*, "Vitamin D deficiency induces early signs of aging in human bone, increasing the risk of fracture," *Sci. Transl. Med.*, vol. 5, no. 193, pp. 1–11, 2013.
- [51] T. Pascart *et al.*, "Region specific Raman spectroscopy analysis of the femoral head reveals that trabecular bone is unlikely to contribute to non-traumatic osteonecrosis," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–9, 2017.
- [52] M. Khalid, T. Bora, A. Al Ghaithi, S. Thukral, and J. Dutta, "Raman spectroscopy detects changes in bone mineral quality and collagen cross-linkage in staphylococcus infected human bone," *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–9, 2018.
- [53] L. Imbert, J. C. Aurégan, K. Pernelle, and T. Hoc, "Mechanical and mineral properties of osteogenesis imperfecta human bones at the tissue level," *Bone*, vol. 65, pp. 18–24, 2014.
- [54] Y. Ishimaru *et al.*, "Raman spectroscopic analysis to detect reduced bone quality after sciatic neurectomy in mice," *Molecules*, vol. 23, no. 12, pp. 1–14, 2018.
- [55] G. S. Mandair and M. D. Morris, "Contributions of Raman spectroscopy to the understanding of bone strength," *Bonekey Rep.*, vol. 4, no. January, pp. 1–8, 2015.
- [56] S. R. Goodyear and R. M. Aspden, "Raman Microscopy and Bone," in *Bone Research Protocols*, vol. 1914, 2019, pp. 755–763.
- [57] M. Raghavan *et al.*, "Quantitative polarized Raman spectroscopy in highly turbid bone tissue," *J. Biomed. Opt.*, vol. 15, no. 3, pp. 1–7, 2010.
- [58] J. S. Nyman *et al.*, "Measuring differences in compositional properties of bone tissue by confocal raman spectroscopy," *Calcif. Tissue Int.*, vol. 89, no. 2, pp. 111–122, 2011.
- [59] F. A. Shah, "Towards refining Raman spectroscopy-based assessment of bone

- composition,” *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–8, 2020.
- [60] J. Als-Nielsen and D. McMorrow, *Elements of Modern X-ray Physics*, 2^a. Nova Jérésia: John Wiley & Sons, Ltd, 2011.
- [61] R. Van Grieken and A. Markowicz, *Handbook of X-Ray Spectrometry*, 2^a. CRC Press, 2001.
- [62] S. Cherry, J. Soreson, and M. Phelps, *Physics in Nuclear Medicine*, 4^a. Filadélfia: Saunders, Elsevier Inc., 2012.
- [63] David, “Diferença entre a produção de radiação característica e por freamento (Bremsstrahlung).” [Online]. Available: <http://estudoradiografico.blogspot.com/2016/10/diferenca-entre-producao-de-radiacao.html>. [Accessed: 10-Feb-2021].
- [64] R. Jenkins, *X-Ray Fluorescence Spectrometry*, 2^a. Filadélfia: John Wiley & Sons, Ltd, 1999.
- [65] E. B. Podgorsak, *Radiation Physics for Medical Physicists*, 2^a. Berlim: Springer, 2010.
- [66] R. Serway and J. Jewett, *Physics for Scientists and Engineers*, 9^a. Boston: Cengage Learning, Inc., 2013.
- [67] S. Svanberg, *Atomic and Molecular Spectroscopy*, 4^a. Berlim: Springer, 2004.
- [68] L. Salgueiro and J. G. Ferreira, *Física Atômica e Nuclear*, 1^a. 1970.
- [69] P. Valério, M. F. Araújo, J. C. Senna-Martinez, and J. L. Inêz Vaz, “Caracterização química de produções metalúrgicas do Castro da Senhora da Guia de Baiões (Bronze Final),” *O Arqueólogo Port.*, vol. 24, pp. 289–319, 2006.
- [70] G. C. Almeida, “Impacto de Fótons e Elétrons em Moléculas Orgânicas Oxigenadas : Relevância,” (Tese de Doutorado), IQ, UFRJ, Rio de Janeiro, BR, 2015.
- [71] M. Ferretti and R. A. Tirello, “Princípios e aplicações de espectroscopia de fluorescência de raios X (FRX) com instrumentação portátil para estudo de bens culturais,” *Revista CPC*, São Paulo, pp. 74–98, 2009.
- [72] Bruker, “M4 Tornado,” 2015. [Online]. Available: www.bruker.com/m4tornado. [Accessed: 28-Jan-2021].
- [73] H. Günzler and A. Williams, *Handbook of Analytical Techniques*. Weinheim: WILEY-VCH, 2001.

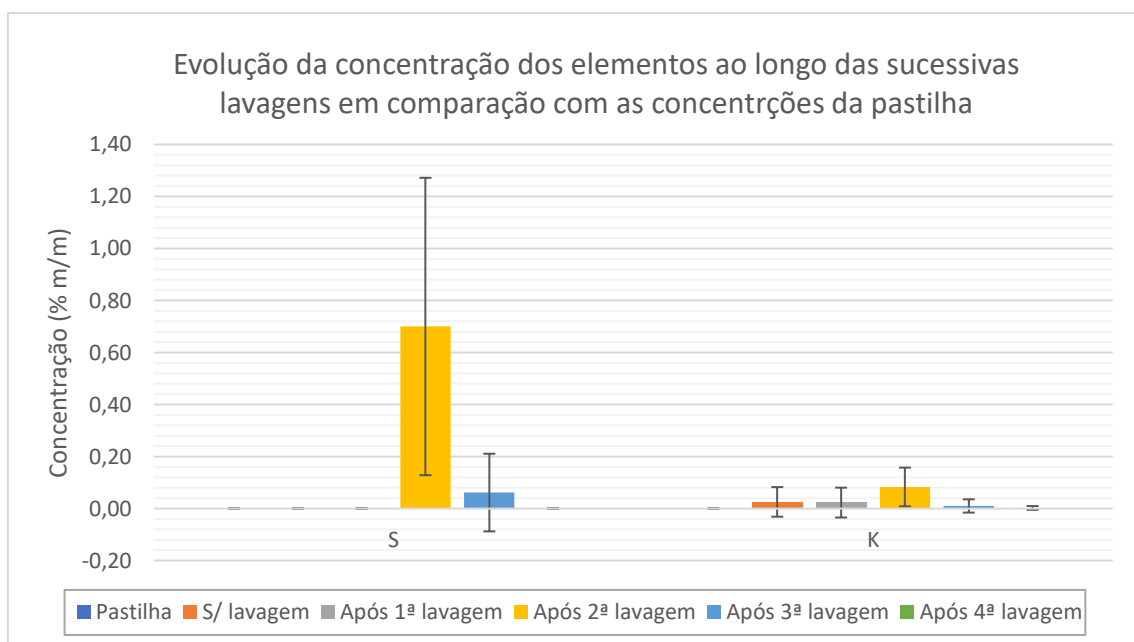
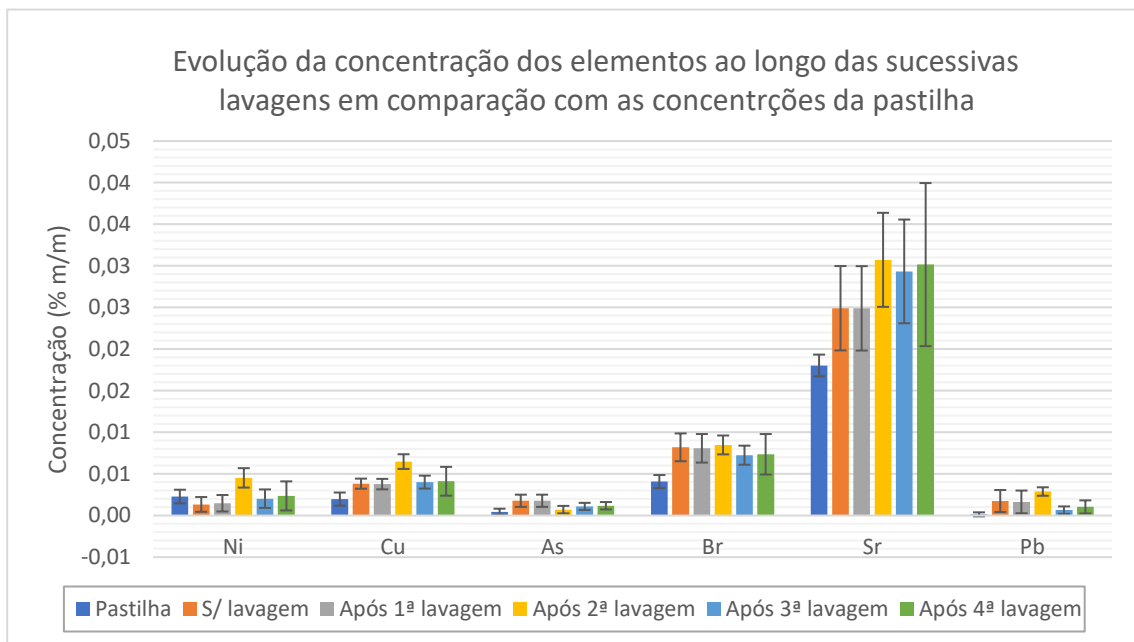
- [74] P. K. Nayak, T. R. Rautray, and V. Vijayan, "EDXRF: A non-destructive technique for multi-elemental analysis of coins," *Indian J. Pure Appl. Phys.*, vol. 42, no. 5, pp. 319–322, 2004.
- [75] D. N. Papadopoulou, G. A. Zachariadis, A. N. Anthemidis, N. C. Tsirliganis, and J. A. Stratis, "Development and optimisation of a portable micro-XRF method for in situ multi-element analysis of ancient ceramics," *Talanta*, vol. 68, no. 5, pp. 1692–1699, 2006.
- [76] M. Cândido, "Estudo da erosão dentária provocada pelo consumo de Coca-Cola utilizando espectroscopia Raman e de Fluorescência de raios-X," (Dissertação de Mestrado), DF, FCT/UNL, Caparica, PT, 2017.
- [77] G. S. Bumbrah and R. M. Sharma, "Raman spectroscopy – Basic principle, instrumentation and selected applications for the characterization of drugs of abuse," *Egypt. J. Forensic Sci.*, vol. 6, no. 3, pp. 209–215, 2016.
- [78] C. Krafft, "Raman and coherent anti-Stokes Raman scattering microspectroscopy for biomedical applications," *J. Biomed. Opt.*, vol. 17, no. 4, p. 040801, 2012.
- [79] M. Miyazaki, H. Onose, and B. K. Moore, "Analysis of the dentin-resin interface by use of laser Raman spectroscopy," *Dent. Mater.*, vol. 18, no. 8, pp. 576–580, 2002.
- [80] E. Smith and G. Dent, *Modern Raman Spectroscopy - A Practical Approach*, vol. 5. 2005.
- [81] P. Rostron, S. Gaber, and D. Gaber, "Raman Spectroscopy , a review," *Int. J. Eng. Tech. Res.*, vol. 6, no. 1, pp. 50–64, 2016.
- [82] A. D. G. Rodrigues and J. C. Galzerani, "Espectroscopia de IV, UV e Raman," *Rev. Bras. Ensino Física*, vol. 34, no. 4, p. 4309, 2012.
- [83] R. Hinrichs and M. A. Z. Vasconcellos, "Espectroscopia micro-Raman," in *Técnicas instrumentais não destrutivas aplicadas a gemas do Rio Grande do Sul*, B. G.-UFRGS, Ed. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 2014, pp. 145–157.
- [84] P. Larkin, "Introduction: Infrared and Raman Spectroscopy," in *Infrared and Raman Spectroscopy*, Elsevier, 2011, pp. 1–5.
- [85] N. B. Colthup, L. H. Daly, and S. E. Wiberley, *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*, 2^a. San Diego: Press, Academic, 1975.
- [86] R. P. Millen *et al.*, "Modelos para dispersão Raman em polímeros conjugados," vol. 28, no. 2, pp. 289–295, 2005.

- [87] W. Wang, H. McGregor, M. Short, and H. Zeng, "Clinical utility of Raman spectroscopy: current applications and ongoing developments," *Adv. Heal. Care Technol.*, p. 13, 2016.
- [88] A. Moreno, "Non-destructive characterization of artworks in paper support using spectroscopic techniques," (Tese de Doutoramento), DF, FCUL, Lisboa, PT, 2013.
- [89] M. Monteiro, "Espectroscopia Raman e técnicas complementares no diagnóstico e intervenção em lesões do tecido dentário," (Dissertação de Mestrado), DF, FCT/UNL, Caparica, PT, 2017.
- [90] F. Curate, "A brucelose em paleopatologia: um estudo de caso proveniente da necrópole Cristã de Cacela Velha," *Antropol. Port.*, vol. 20/21, pp. 209–235, 2004.
- [91] C. A. Tété Garcia, "Cacela-a-Velha no contexto da Actividade Marítima e do Povoamento Rural do Sudoeste Peninsular nos séculos XII-XIV," (Dissertação de Mestrado), DH I, Universidad de Huelva, Huelva, Espanha, 2015.
- [92] R. Sitko and B. Zawisza, "Quantification in X-Ray Fluorescence Spectrometry," in *X-Ray Spectroscopy*, 2012, pp. 137–162.
- [93] A. Rindby, "Software for Energy-Dispersive X-Ray Fluorescence," *X-Ray Spectrom.*, vol. 18, no. October 1988, pp. 113–118, 1989.
- [94] M. L. Carvalho and A. F. Marques, "X-ray fluorescence spectrometry: Applications in trace elements studies in human tissues from patients with cirrhosis," *X-Ray Spectrom.*, vol. 30, no. 6, pp. 397–402, 2001.
- [95] P. J. Custódio, S. Pessanha, C. Pereira, M. L. Carvalho, and M. L. Nunes, "Comparative study of elemental content in farmed and wild life Sea Bass and Gilthead Bream from four different sites by FAAS and EDXRF," *Food Chem.*, vol. 124, no. 1, pp. 367–372, 2011.
- [96] J. Machado *et al.*, "Accuracy improvement in XRF analysis for the quantification of elements ranging from tenths to thousands $\mu\text{g/g}$ in human tissues using different matrix reference materials," *J. Anal. At. Spectrom.*, vol. 35, no. 12, pp. 2920–2927, 2020.
- [97] C. Corti, L. Rampazzi, C. Ravedoni, and 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," *Microchem. J.*, vol. 110, pp. 614–623, 2013.
- [98] P. Schober and L. A. Schwarte, "Correlation coefficients: Appropriate use and

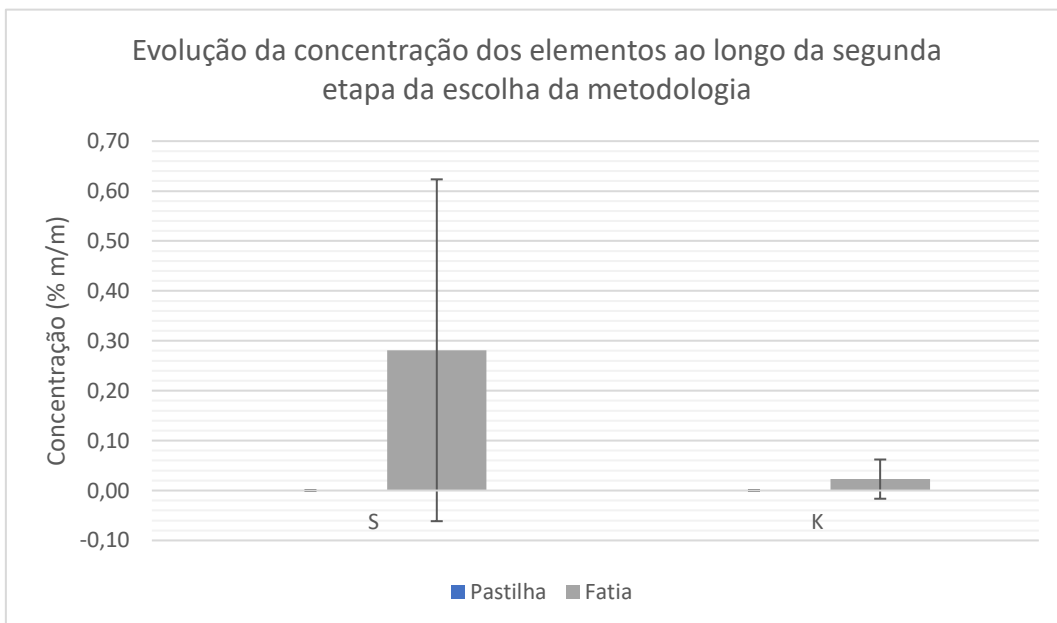
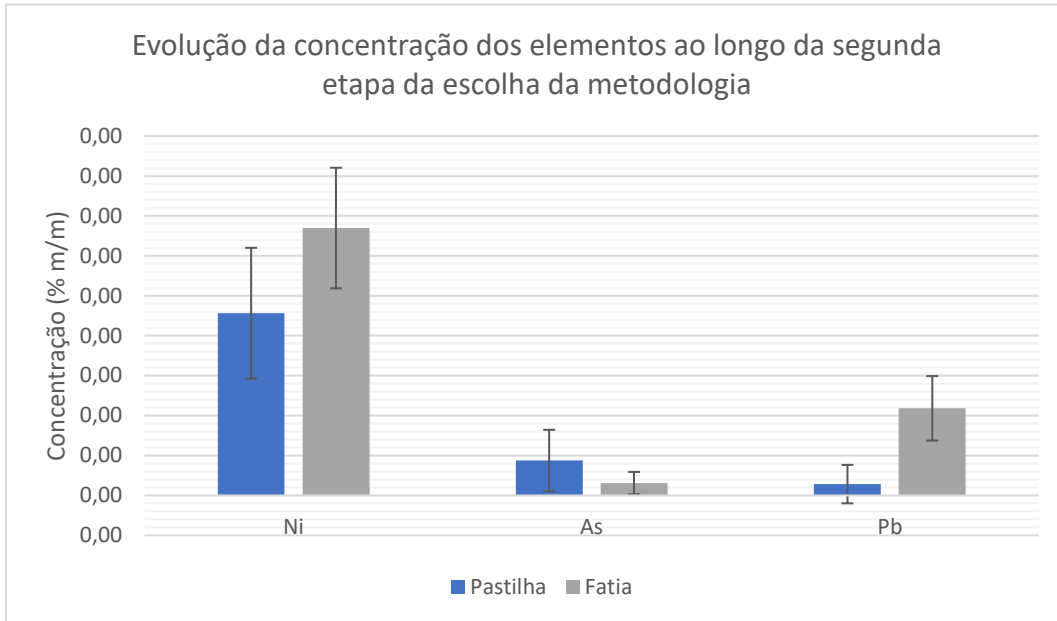
- interpretation," *Anesth. Analg.*, vol. 126, no. 5, pp. 1763–1768, 2018.
- [99] I. János, L. Szathmáry, E. Nádas, A. Béni, Z. Dinya, and E. Máthé, "Evaluation of elemental status of ancient human bone samples from Northeastern Hungary dated to the 10th century AD by XRF," *Nucl. Instruments Methods Phys.*, vol. 269, no. 21, pp. 2593–2599, 2011.
- [100] F. Giorgi, F. Bartoli, P. Iacumin, and F. Mallegni, "Oligoelements and isotopic geochemistry: A multidisciplinary approach to the reconstruction of the paleodiet," *Hum. Evol.*, vol. 20, no. 1, pp. 55–81, 2005.
- [101] D. L. Samudralwar and L. D. Robertson, "Determination of major and trace elements in bones by simultaneous PIXE/PIGE analysis," *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, vol. 169, no. 1, pp. 259–267, 1993.

Apêndices

Apêndice 1 – Gráficos da evolução das concentrações dos elementos ao longo da primeira etapa da escolha da metodologia, acompanhados da respetiva incerteza, obtida pelo método da propagação das incertezas.



Apêndice 2 – Gráficos da evolução das concentrações dos elementos ao longo da segunda etapa da escolha da metodologia, acompanhados da respectiva incerteza, obtida pelo método da propagação das incertezas.



Apêndice 3 – Valores médios (% m/m) e desvios-padrão da quantificação de cada elemento para as duas fatias de cada osso.

	Al	$\sigma(\text{Al})$	Si	$\sigma(\text{Si})$	P	$\sigma(\text{P})$	S	$\sigma(\text{S})$	K	$\sigma(\text{K})$	Ca	$\sigma(\text{Ca})$
A	2,7	0,6	2	2	16,8	0,2	0,3	0,3	0,02	0,04	36,2	0,4
B	3,1	0,8	2	2	16,8	0,2	0,2	0,3	0,02	0,03	36,1	0,4
C	3,2	0,7	2	2	16,7	0,2	0,2	0,3	0,02	0,03	36,1	0,4
D	2,8	0,7	2	2	16,8	0,2	0,2	0,3	0,02	0,03	36,2	0,5
E	3,1	0,7	2	2	16,7	0,2	0,2	0,3	0,02	0,03	36,1	0,5
H	3,0	0,7	2	2	16,7	0,2	0,2	0,3	0,02	0,04	36,1	0,5
I	3,1	0,8	2	2	16,8	0,2	0,2	0,3	0,01	0,02	36,2	0,4
K	3,1	0,7	2	2	16,7	0,2	0,2	0,3	0,02	0,03	36,1	0,4
L	3,1	0,9	2	2	16,7	0,3	0,2	0,3	0,02	0,03	36,0	0,6
M	2,9	0,8	2	2	16,8	0,2	0,2	0,3	0,02	0,03	36,2	0,4
N	3,0	0,5	2	2	16,8	0,2	0,2	0,3	0,01	0,02	36,1	0,4
O	2,7	0,7	2	2	16,8	0,2	0,2	0,3	0,02	0,03	36,2	0,4
P	2,9	0,8	2	2	16,8	0,2	0,2	0,3	0,02	0,03	36,2	0,4
R	3,0	0,6	2	2	16,8	0,2	0,3	0,4	0,01	0,02	36,2	0,4

	Ti	$\sigma(\text{Ti})$	Cr	$\sigma(\text{Cr})$	Mn	$\sigma(\text{Mn})$	Fe	$\sigma(\text{Fe})$	Ni	$\sigma(\text{Ni})$	Cu	$\sigma(\text{Cu})$
A	0,01	0,01	0,006	0,003	0,005	0,003	0,03	0,05	0,003	0,001	0,004	0,003
B	0,02	0,01	0,006	0,002	0,004	0,002	0,01	0,01	0,003	0,001	0,003	0,001
C	0,02	0,02	0,007	0,002	0,005	0,003	0,02	0,01	0,003	0,001	0,003	0,001
D	0,02	0,01	0,007	0,005	0,004	0,002	0,02	0,03	0,004	0,001	0,003	0,001
E	0,01	0,01	0,007	0,003	0,004	0,002	0,01	0,01	0,003	0,001	0,003	0,001
H	0,02	0,01	0,006	0,002	0,006	0,004	0,01	0,02	0,003	0,001	0,003	0,001
I	0,01	0,01	0,006	0,002	0,006	0,003	0,007	0,004	0,003	0,001	0,003	0,001
K	0,02	0,01	0,006	0,003	0,006	0,003	0,02	0,01	0,003	0,001	0,003	0,001
L	0,01	0,01	0,006	0,002	0,004	0,001	0,01	0,01	0,004	0,001	0,003	0,001
M	0,01	0,01	0,006	0,002	0,004	0,002	0,01	0,01	0,003	0,001	0,003	0,001
N	0,02	0,01	0,006	0,003	0,004	0,002	0,01	0,01	0,003	0,001	0,003	0,001
O	0,02	0,01	0,005	0,002	0,005	0,003	0,01	0,01	0,003	0,001	0,003	0,001
P	0,02	0,01	0,006	0,002	0,004	0,001	0,01	0,01	0,003	0,001	0,003	0,001
R	0,01	0,01	0,006	0,002	0,003	0,001	0,008	0,004	0,003	0,001	0,003	0,001

	Zn	$\sigma(\text{Zn})$	As	$\sigma(\text{As})$	Br	$\sigma(\text{Br})$	Rb	$\sigma(\text{Rb})$	Sr	$\sigma(\text{Sr})$	Pb	$\sigma(\text{Pb})$
A	0,013	0,002	0,0002	0,0001	0,007	0,002	0,001	0,001	0,03	0,01	0,0011	0,0004
B	0,012	0,003	0,0002	0,0002	0,005	0,003	0,001	0,001	0,04	0,01	0,0011	0,0004
C	0,012	0,002	0,0004	0,0003	0,008	0,003	0,001	0,001	0,03	0,01	0,0013	0,0004
D	0,013	0,004	0,0002	0,0002	0,010	0,003	0,001	0,001	0,03	0,01	0,0011	0,0004
E	0,012	0,003	0,0002	0,0002	0,006	0,003	0,001	0,001	0,04	0,01	0,0013	0,0004
H	0,012	0,002	0,0003	0,0002	0,008	0,003	0,001	0,001	0,03	0,01	0,0012	0,0004
I	0,013	0,003	0,0001	0,0001	0,007	0,003	0,001	0,001	0,02	0,01	0,0013	0,0004
K	0,013	0,004	0,0002	0,0002	0,007	0,003	0,001	0,001	0,03	0,01	0,0011	0,0004
L	0,013	0,003	0,0003	0,0003	0,005	0,002	0,001	0,001	0,02	0,01	0,0012	0,0004
M	0,012	0,004	0,0003	0,0002	0,007	0,003	0,001	0,001	0,03	0,01	0,0012	0,0004

N	0,011	0,003	0,0003	0,0002	0,010	0,004	0,001	0,001	0,03	0,01	0,001	0,001
O	0,013	0,003	0,0001	0,0002	0,008	0,003	0,001	0,001	0,03	0,01	0,0010	0,0004
P	0,013	0,002	0,0003	0,0003	0,007	0,003	0,001	0,001	0,03	0,01	0,0010	0,0004
R	0,013	0,003	0,0002	0,0002	0,006	0,002	0,0009	0,0005	0,03	0,01	0,0012	0,0004

Apêndice 4 – Matriz de correlação de Pearson para os elementos estudados.

	Al	Si	P	S	K	Ca	Ti	Cr	Mn	Fe	Ni	Cu	Zn	As	Br	Rb	Sr	Pb		
Al	Pearson Corr.																			
Al	p-value																			
Si	Pearson Corr.	1																		
Si	p-value																			
P	Pearson Corr.	-0,70928	1																	
P	p-value	0,0045																		
S	Pearson Corr.	-0,24671	-0,08219	1																
S	p-value	0,39517	0,78																	
K	Pearson Corr.	-0,08155	0,47727	-0,35087	1															
K	p-value	0,78166	0,08439	0,21869																
Ca	Pearson Corr.	-0,70928	-0,9471	1	0,0319	-0,35087	1													
Ca	p-value	0,0045	0,0000003		0,91378	0,21869														
Ti	Pearson Corr.	0,19945	0,22164	-0,19542	0,63011	0,30127	-0,19542	1												
Ti	p-value	0,49423	0,44635	0,50317	0,01572	0,29523	0,50317													
Cr	Pearson Corr.	0,03545	0,0732	-0,06413	-0,14697	0,07794	-0,06413	0,0672	1											
Cr	p-value	0,90425	0,80361	0,82759	0,6161	0,79113	0,82759	0,81946												
Mn	Pearson Corr.	0,17367	0,14216	-0,20442	0,17804	-0,03271	-0,20442	-0,14264	-0,11843	1										
Mn	p-value	0,55268	0,62781	0,4833	0,54256	0,91116	0,4833	0,62666	0,68678											
Fe	Pearson Corr.	-0,36055	0,16393	-0,0661	0,34095	0,59354	-0,0661	0,03096	0,31408	0,22551	1									
Fe	p-value	0,20536	0,57548	0,82237	0,23289	0,02524	0,82237	0,91632	0,27414	0,43824										
Ni	Pearson Corr.	0,07395	0,44655	-0,33862	-0,19422	0,30528	-0,33862	-0,25234	0,34075	0,10983	0,11802	1								
Ni	p-value	0,80164	0,10946	0,23631	0,50583	0,28853	0,23631	0,38411	0,23318	0,70859	0,68781									
Cu	Pearson Corr.	-0,49766	-0,20172	0,27363	0,44402	0,19789	0,27363	-0,41811	0,50914	0,23413	0,17085	1								
Cu	p-value	0,07017	0,48922	0,34384	0,11172	0,49768	0,34384	0,13682	0,06296	0,42044	0,55922									
Zn	Pearson Corr.	-0,36868	-0,17346	0,18923	0,72814	0,00353	0,18923	-0,67394	-0,11866	0,00346	0,25828	0,19279	1							
Zn	p-value	0,19458	0,55315	0,51704	0,00315	0,99043	0,51704	0,00822	0,68619	0,99062	0,37263	0,50903								
As	Pearson Corr.	0,37363	0,30738	-0,33606	-0,43204	0,41559	-0,33606	0,38771	0,03409	-0,09761	0,03235	-0,00706	-0,20017	1						
As	p-value	0,18819	0,28505	0,24009	0,12129	0,13945	0,24009	0,17077	0,9079	0,79991	0,91259	0,98088	0,49264							
Br	Pearson Corr.	-0,31287	-0,13183	0,26315	-0,41805	-0,09952	0,26315	0,21428	0,56755	0,11473	0,238	0,27686	0,36359	-0,35538	1					
Br	p-value	0,27609	0,65325	0,36336	0,13689	0,89328	0,36336	0,46196	0,03427	0,69614	0,41259	0,33794	0,2013	0,21242						
Rb	Pearson Corr.	0,55259	0,83383	-0,81703	-0,34374	0,36503	-0,81703	0,52193	0,04173	0,01174	0,02339	0,27046	-0,47681	-0,33396	0,47099	1				
Rb	p-value	0,04044	0,0002	0,0004	0,22884	0,19938	0,0004	0,05557	0,88736	0,96822	0,93673	0,34969	0,08474	0,24322	0,08915					
Sr	Pearson Corr.	0,19388	0,27422	-0,28318	-0,20478	0,16476	-0,28318	0,74516	-0,08766	-0,05623	-0,12962	-0,41121	-0,42453	-0,43841	0,12801	-0,10709	1			
Sr	p-value	0,50659	0,34276	0,32656	0,48251	0,57351	0,32656	0,00222	0,76571	0,84859	0,65875	0,1441	0,13028	0,11687	0,66275	0,71557				
Pb	Pearson Corr.	0,53933	0,27965	-0,40203	-0,06614	-0,29795	-0,40203	-0,02149	0,47228	0,14829	-0,22645	0,12982	0,05773	-0,42654	0,25868	0,17188	0,28966	1		
Pb	p-value	0,04655	0,3329	0,15417	0,82226	0,30085	0,15417	0,94186	0,08816	0,6129	0,43627	0,65824	0,84458	0,12828	0,37186	0,55683	0,31514			

Apêndice 5 – Quantificação de cada elemento para a linha 3 da fatia B_1, com respectivas médias e desvios-padrão.

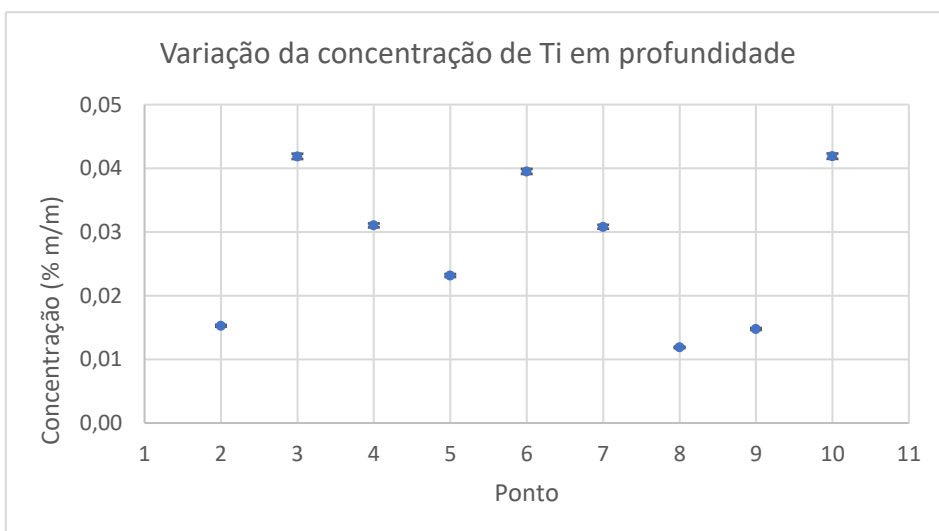
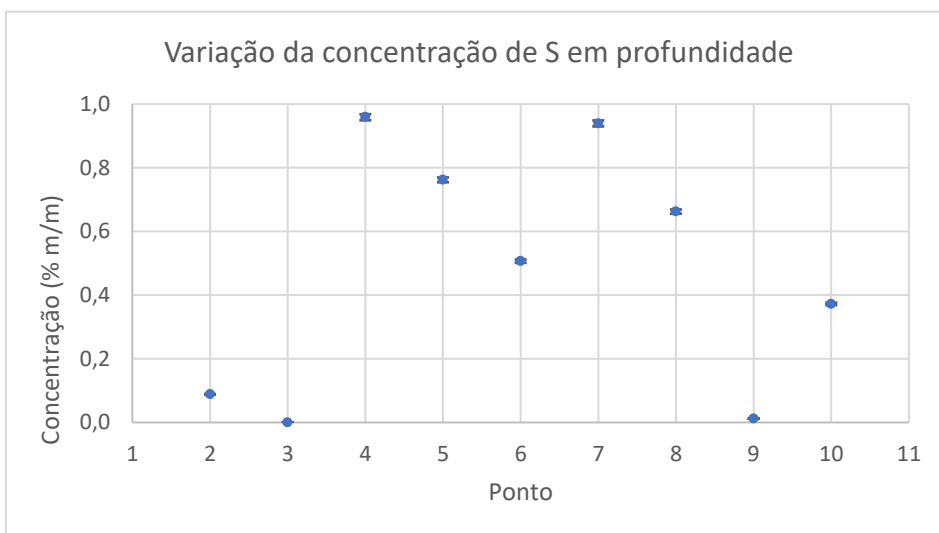
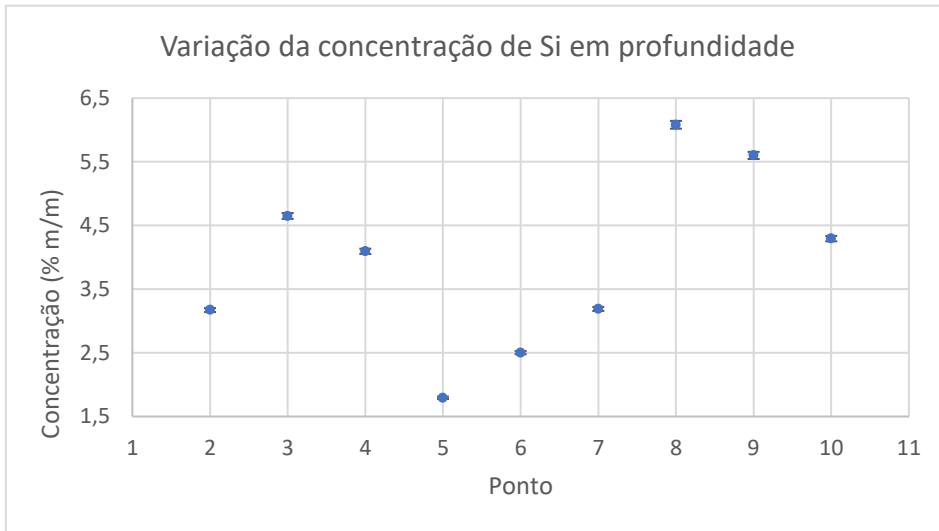
Ponto	Ca	Si	S	K	Ti	Cr	Mn
2	35,7	3	0,1	0,02	0,02	0,006	0,002
3	35,4	5	0,0	0,03	0,04	0,004	0,005
4	34,9	4	1,0	0,00	0,03	0,002	0,004
5	35,9	2	0,8	0,03	0,02	0,008	0,004
6	36,3	3	0,5	0,03	0,04	0,009	0,003
7	36,5	3	0,9	0,02	0,03	0,003	0,001
8	35,6	6	0,7	0,02	0,01	0,002	0,004
9	35,7	6	0,0	0,03	0,01	0,006	0,006
10	36,2	4	0,4	0,09	0,04	0,008	0,004

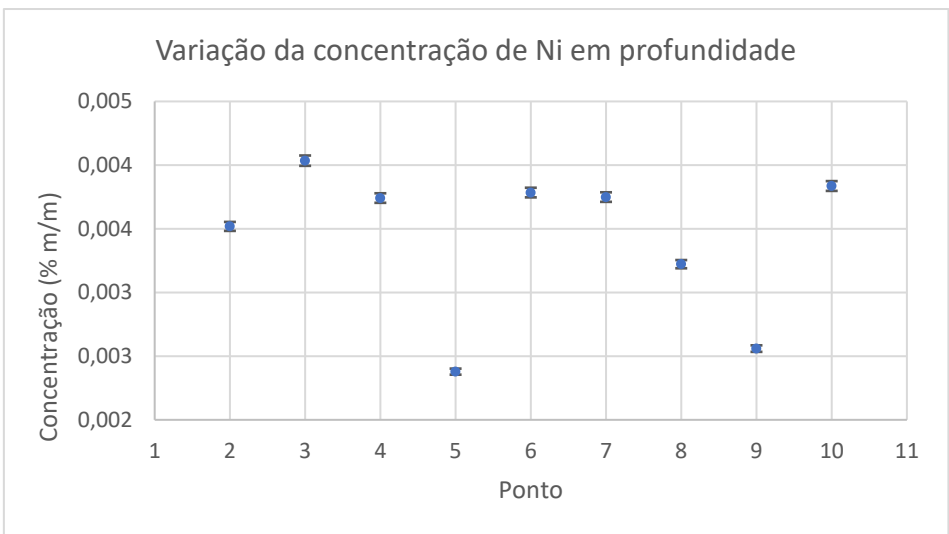
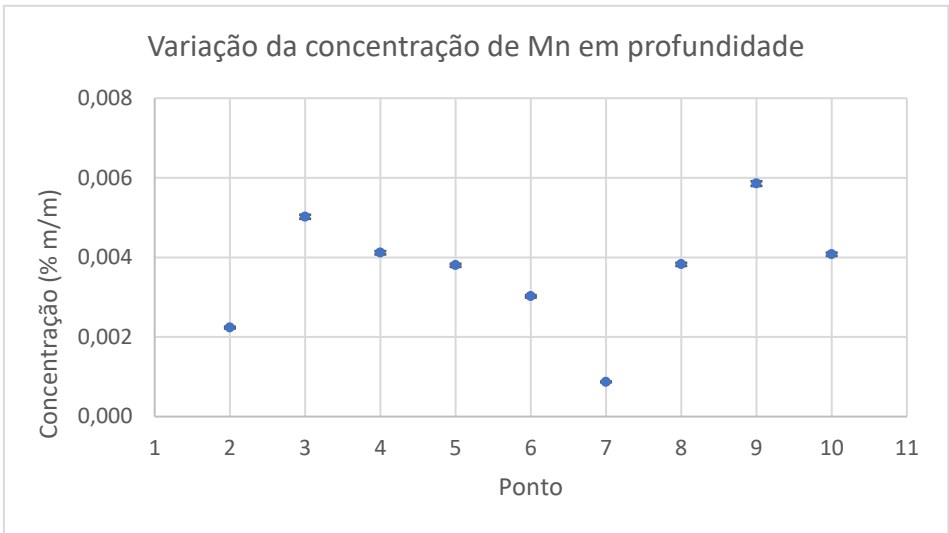
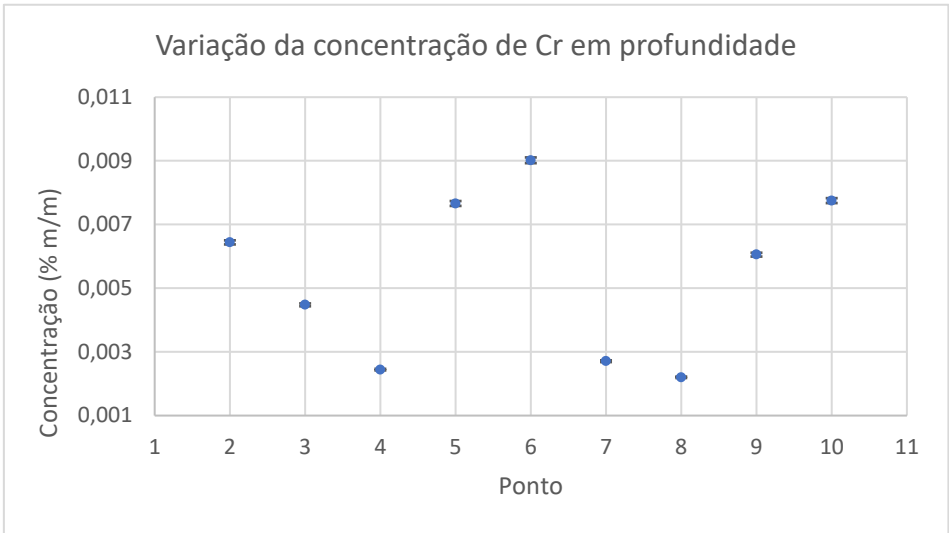
Média	35,8	4	0,5	0,03	0,03	0,005	0,004
σ	0,5	1	0,4	0,02	0,01	0,002	0,001

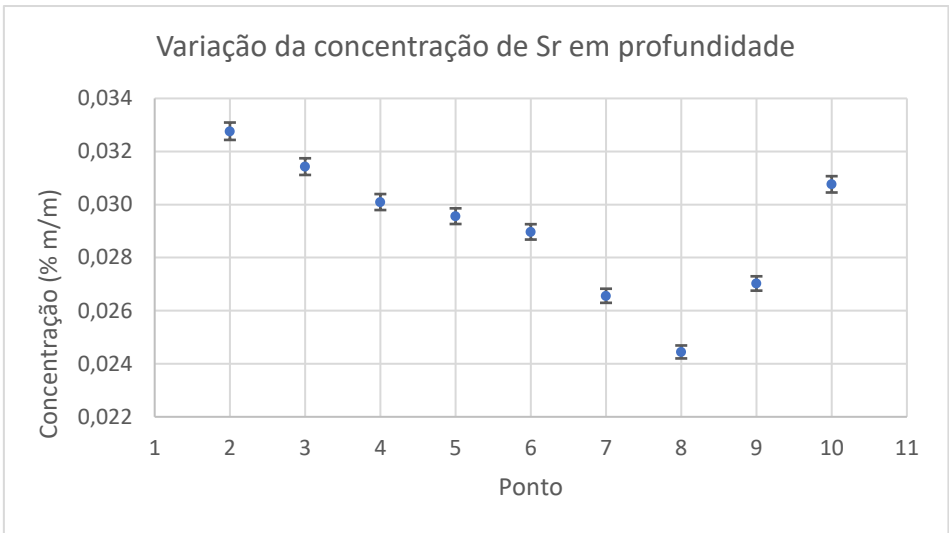
Ponto	Fe	Ni	Cu	Zn	Br	Sr	Al
2	0,01	0,0035	0,0041	0,017	0,008	0,033	5,3
3	0,01	0,0040	0,0030	0,014	0,006	0,031	3,0
4	0,00	0,0037	0,0029	0,012	0,003	0,030	2,7
5	0,00	0,0024	0,0025	0,010	0,002	0,030	2,4
6	0,01	0,0038	0,0021	0,010	0,002	0,029	3,8
7	0,01	0,0037	0,0035	0,010	0,002	0,027	2,6
8	0,01	0,0032	0,0036	0,014	0,002	0,024	3,3
9	0,03	0,0026	0,0034	0,011	0,002	0,027	3,1
10	0,05	0,0038	0,0030	0,015	0,004	0,031	4,7

Média	0,02	0,0034	0,0031	0,013	0,003	0,029	3,4
σ	0,02	0,0006	0,0006	0,002	0,002	0,002	0,9

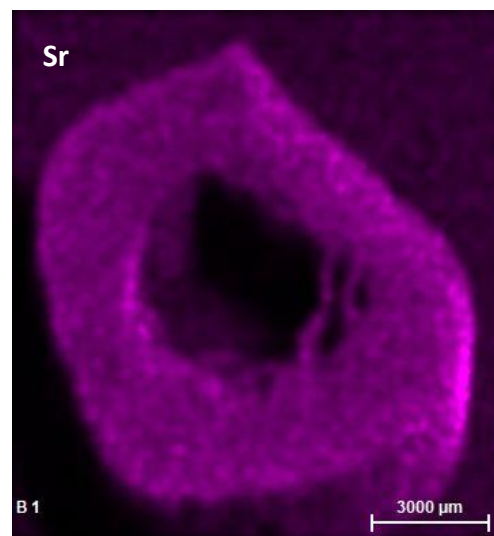
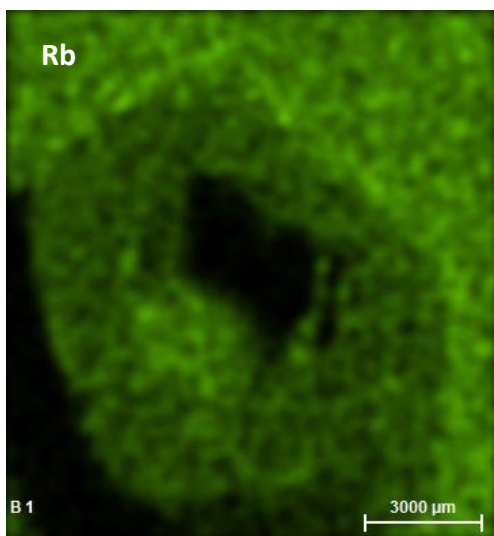
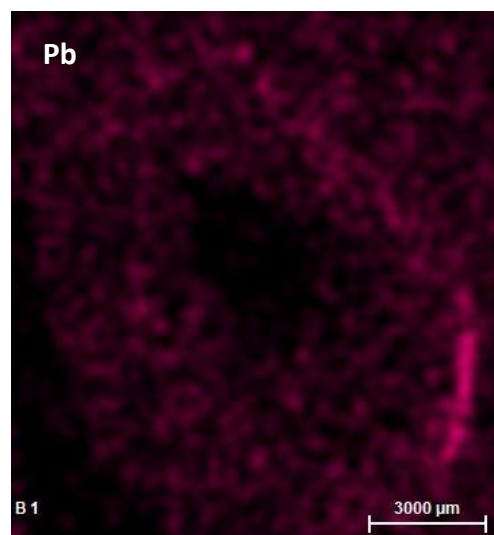
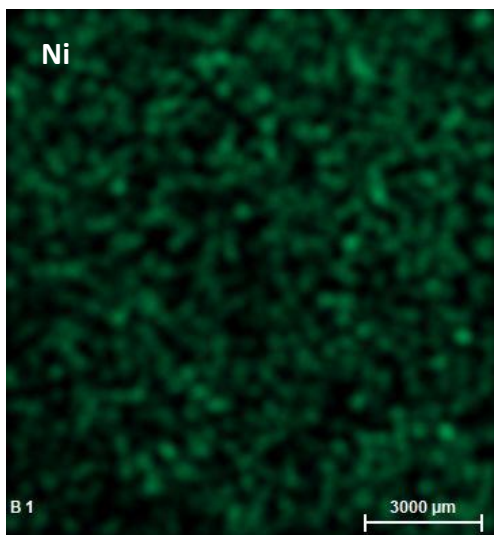
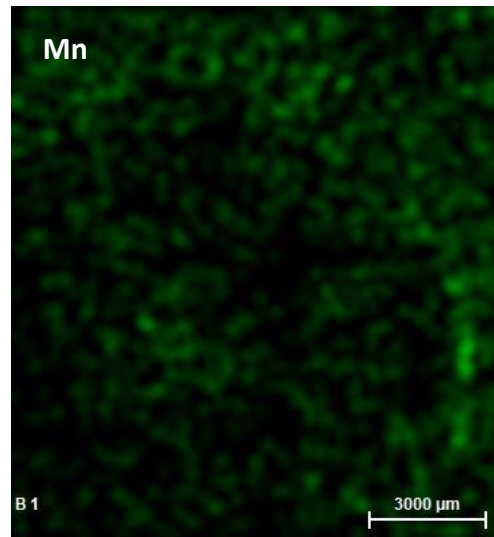
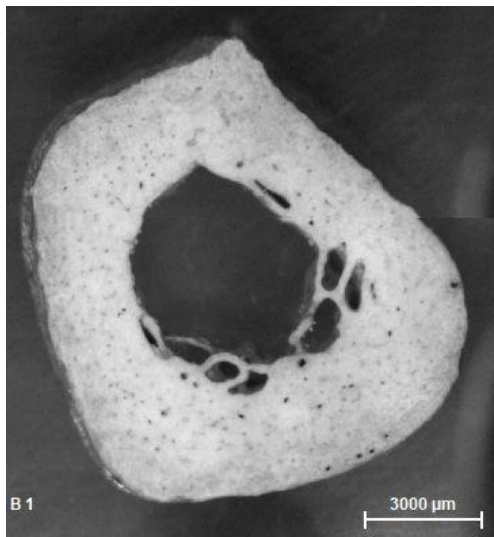
Apêndice 6 – Gráficos da variação das concentrações em profundidade, para a linha 3 da fatia B_1, dos elementos Si, S, Ti, Cr, Mn, Ni e Sr, acompanhados da respectiva incerteza, obtida pelo método da propagação das incertezas.







Apêndice 7 – Mapeamento dos elementos Mn, Ni, Pb e Sr na superfície de corte da fatia B_1.



Apêndice 8 – Valores médios e desvios-padrão das áreas dos picos de interesse.

	v2 PO₄³⁻	σ(v2 PO₄³⁻)	v4 PO₄³⁻	σ(v4 PO₄³⁻)	v1 PO₄³⁻	σ(v1 PO₄³⁻)
A	9000	1000	9000	1000	16000	2000
B	7100	300	5900	500	19000	2000
C	8000	1000	8000	2000	16000	2000
D	7600	500	7900	600	15000	1000
E	6500	800	6500	700	15000	2000
H	5300	600	5100	500	12000	2000
I	8000	500	8500	600	15000	1000
K	5300	800	4900	700	12000	2000
L	6100	700	6100	600	13000	1000
M	5600	900	5300	700	12000	2000
N	9000	1000	10000	1000	16000	2000
O	7000	600	7000	900	14900	900
P	6500	700	6000	600	15000	2000
R	6600	800	6400	800	14000	2000

	CO₃²⁻	σ(CO₃²⁻)	Amida I	σ(Amida I)
A	2400	500	11000	2000
B	3300	300	6000	800
C	2300	300	10000	1000
D	2700	400	10100	800
E	2300	400	9000	1000
H	2200	300	5800	600
I	2000	200	10200	900
K	2100	500	6300	900
L	2400	300	7200	800
M	1800	300	6100	700
N	2800	400	11000	2000
O	2300	400	8000	2000
P	2100	200	7000	500
R	2600	400	7900	900

Apêndice 9 – Valores experimentais dos rácios Mineral/Matriz e Carbonato/Fosfato, e da Largura a Meia Altura do $\nu_1 \text{PO}_4^{3-}$, com as respetivas incertezas, obtidas pelo método da propagação das incertezas.

	Mineral/Matriz	σ	Carbonato/Fosfato	σ
A	1,4	0,3	0,15	0,04
B	3,2	0,5	0,17	0,02
C	1,5	0,3	0,15	0,03
D	1,5	0,2	0,18	0,03
E	1,7	0,3	0,16	0,03
H	2,1	0,3	0,18	0,03
I	1,5	0,2	0,13	0,02
K	2,0	0,5	0,17	0,05
L	1,8	0,3	0,18	0,03
M	2,0	0,4	0,14	0,03
N	1,5	0,2	0,17	0,03
O	1,9	0,4	0,16	0,03
P	2,1	0,3	0,14	0,03
R	1,7	0,3	0,19	0,04

	<i>FWHM</i> (cm^{-1})	σ
A	15,8	0,3
B	17,6	0,1
C	16,6	0,1
D	16,8	0,3
E	16,2	0,3
H	17,3	0,3
I	14,1	0,2
K	16,6	0,2
L	16,5	0,2
M	15,9	0,2
N	16,4	0,2
O	16,2	0,3
P	15,7	0,1
R	16,9	0,2



2021

BEATRIZ HELENA ALMEIDA MORAIS

ESTUDO ESPECTROSCÓPICO DE ESTRUTURAS ÓSSEAS DO
PERÍODO MEDIEVAL PARA AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO
POR METAIS PESADOS