

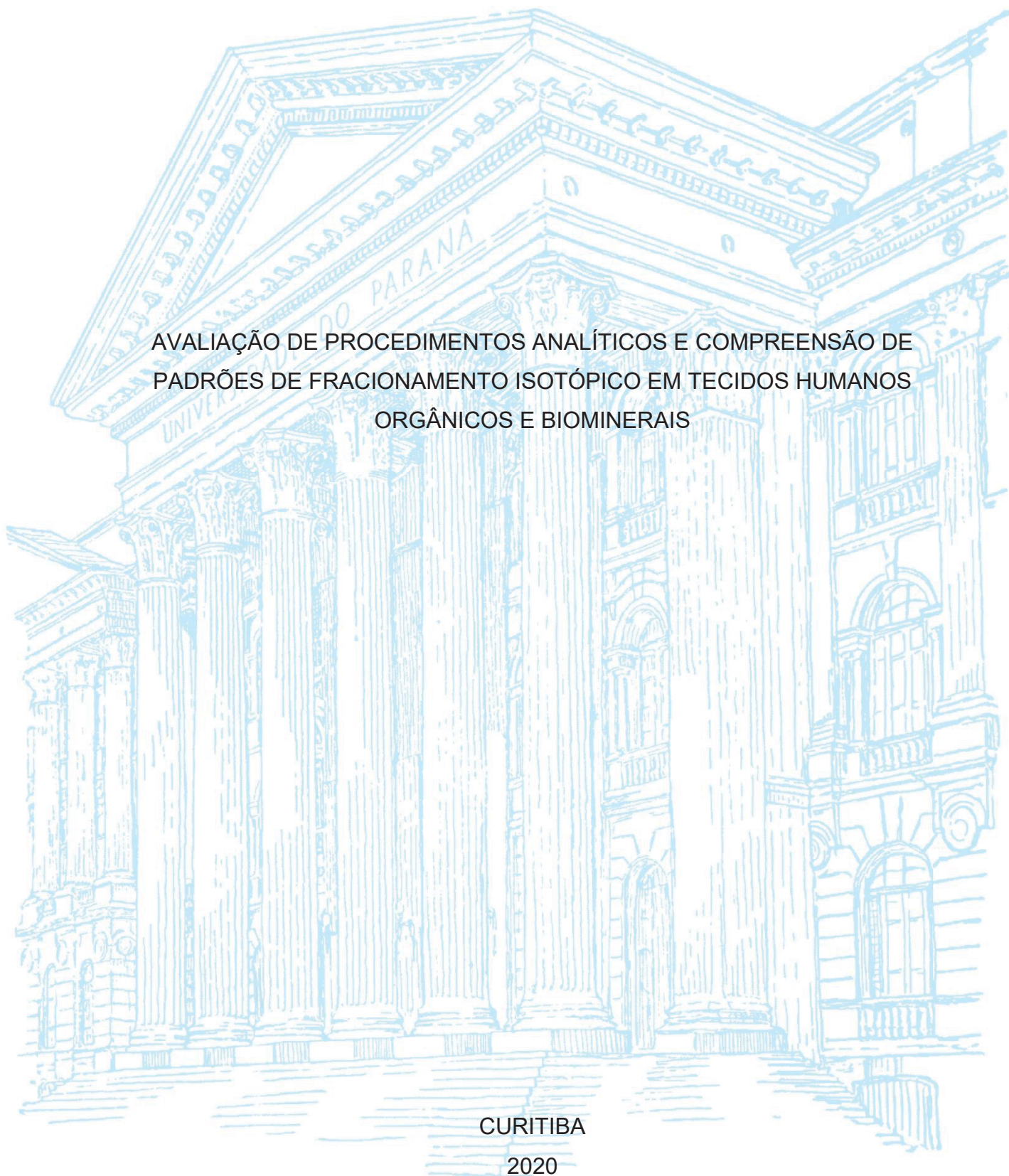
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

TAÍS RIBEIRO MUNIZ

AVALIAÇÃO DE PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS E COMPREENSÃO DE
PADRÕES DE FRACIONAMENTO ISOTÓPICO EM TECIDOS HUMANOS
ORGÂNICOS E BIOMINERAIS

CURITIBA

2020



TAÍS RIBEIRO MUNIZ

AVALIAÇÃO DE PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS E COMPREENSÃO DE
PADRÕES DE FRACIONAMENTO ISOTÓPICO EM TECIDOS HUMANOS
ORGÂNICOS E BIOMINERAIS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Geologia, Setor de Ciências da Terra, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Geologia.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Anelize Manuela Bahniuk Rumbelsperger.

CURITIBA

2020

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Muniz, Taís Ribeiro

Avaliação de procedimentos analíticos e compreensão de padrões de fracionamento isotópico em tecidos humanos orgânicos e biominerais / Taís Ribeiro Muniz. – Curitiba, 2020.

1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências da Terra, Programa de Pós-Graduação em Geologia.

Orientador: Anelize Manuela Bahniuk Rumbelsperger

1. Isótopos estáveis. 2. Geoquímica. I. Universidade Federal do Paraná. II. Programa de Pós-Graduação em Geologia. III. Rumbelsperger, Anelize Manuela Bahniuk. IV . Título.

Bibliotecário: Leticia Priscila Azevedo de Sousa CRB-9/2029



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA TERRA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO GEOLOGIA -
40001016028P5

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em GEOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **TAÍS RIBEIRO MUNIZ** intitulada: **AValiação de Procedimentos Analíticos e Compreensão de Padrões de Fracionamento Isotópico em Tecidos Humanos Orgânicos e Biominerais**, sob orientação da Profa. Dra. ANELIZE MANUELA BAHNIUK RUMBELSPERGER, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 24 de Março de 2020.


ANELIZE MANUELA BAHNIUK RUMBELSPERGER

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)


VLADIMIR ELIODORO COSTA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE EST. PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO/BOTUCATU)


SANDRO JOSÉ FROEHNER

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Prof^a Dr^a Anelize Manuela Bahniuk Rumbelsperger e à equipe do Laboratório de Análise de Minerais e Rochas da Universidade Federal do Paraná (LAMIR/UFPR), em especial ao técnico Diego Portela;

Ao Prof. Dr. Vladimir Eliodoro Costa e à equipe do Centro de Isótopos Estáveis Prof. Dr. Carlos Ducatti da Universidade Estadual Paulista (CIE/UNESP), em especial às servidoras MSc. Cibeles de Souza Krulski e Dr^a. Nádia dos Reis Carvalho e aos alunos Consta e Aninha;

Ao MSc. Ricardo de Oliveira Mascarenhas e todos os alunos do programa de pós-graduação em Geologia;

Ao Prof. Dr. Ricardo Luiz Vieira e Idalina Marly, do Banco de Dentes da Faculdade de Odontologia da UFPR;

Aos doadores das amostras utilizadas nesta pesquisa;

Aos meus amigos Jana Duarte, Luiz Mota, Jéssica Miranda, Thamy Soares e Marcel Tardelli.

À minha família, com menção especial à minha irmã Clara, aos meus pais Jonas e Marize, à minha avó Jessie, a Rafael Coelho por todo o amor e carinho, e à minha filha Íris, que com o mais singelo dos sorrisos, dá cores à minha vida mesmo nos dias mais cinzentos.

Ao meu gato Busanfa e às minhas cachorrinhas Suri e Manteiga.

Aos meus colegas de trabalho da Polícia Federal, que orgulhosamente posso chamar de amigos, e que sempre tanto me apoiaram e apoiam na minha jornada profissional.

RESUMO

A análise de isótopos estáveis para determinação de razões isotópicas (AIE) é uma técnica que pode ser utilizada para os mais diversos fins, incluindo a identificação humana, no âmbito da antropologia forense. Neste contexto, possibilita a determinação de uma possível origem geográfica e características de hábitos de vida de cadáveres e restos humanos, informações extremamente valiosas em circunstâncias nas quais as técnicas clássicas de identificação, como a determinação de perfil genético e identificação por meio de impressões digitais, se mostram insatisfatórias. Os isótopos estáveis presentes nos diversos tecidos que compõem o corpo humano derivam de fontes de nutrição e hidratação e são assimilados pelo organismo de indivíduos através de processos bioquímicos. A assimilação permite, a partir da interpretação das razões isotópicas de tecidos humanos (obtidas após análise em espectrômetro de massa), a correlação geográfica destes valores e a determinação de especificidades dos hábitos de vida do indivíduo, o que pode vir a auxiliar no processo de identificação deste. Existem registros na literatura internacional de investigações criminais solucionadas em parte devido à contribuição de resultados obtidos a partir da espectrometria de massa de razões isotópicas. Porém, são poucos os trabalhos que apresentam de maneira clara os protocolos ideais para aplicação da técnica em Criminalística e que discutem as diversas variáveis que podem influenciar o processo de assimilação dos isótopos de um elemento pelo corpo humano, assim como aspectos intrínsecos aos procedimentos analíticos que podem alterar a composição isotópica original de amostras analisadas. A plena compreensão e mitigação dos efeitos dessas variáveis é passo de suma importância para a correta interpretação deste tipo de dado no contexto forense, e, portanto, representam um desafio no estabelecimento de protocolos para determinação da origem geográfica e hábitos de vida de tecidos humanos a partir da AIE. O presente trabalho busca contribuir para a consolidação de métodos de utilização da desta técnica por peritos criminais no Brasil, estabelecendo procedimentos analíticos mais viáveis a partir da realização de experimentos com amostras de tecido humano, alvo de investigações em antropologia forense. O estudo foi desenvolvido com o objetivo geral de compreensão de padrões de fracionamento induzido dos isótopos de carbono, oxigênio e/ou nitrogênio em cabelos e dentes humanos, de modo a definir maneiras de impedir que estes fracionamentos sejam desencadeados ocasionalmente quando da análise de amostras no contexto criminal. A proposta inclui a análise de três matrizes diferentes de tecidos humanos: cabelos, unhas e dentes. Para as amostras de dente, especificamente, foram obtidas as assinaturas isotópicas do carbono e do oxigênio, avaliando a influência de diferentes métodos de pulverização. O experimento foi proposto partindo-se da premissa de que a adoção de diferentes métodos poderia influenciar o resultado final obtido. Para as amostras de cabelo, busca-se avaliar a possibilidade de interferência de procedimentos estéticos como tintura e descoloração que, a princípio, pensava-se que poderiam alterar as razões isotópicas originais das amostras. Por fim, as amostras de unha foram analisadas com o objetivo de observar a variação das assinaturas isotópicas de carbono e nitrogênio de crianças com idades conhecidas.

Palavras-chave: isótopos estáveis; geoquímica forense; fracionamento isotópico.

ABSTRACT

The stable isotope analysis (SIA) is a technique that can be used for a series of purposes, including human identification, within the scope of forensic anthropology. In this context, it allows investigators to determine a possible geographical origin of human corpses and remains, as well as specific life habits, information that is extremely valuable in circumstances in which classical identification techniques, such as DNA profiling and fingerprint identification, are unsatisfactory. The stable isotope composition of human tissues derives from sources of nutrition and hydration and are assimilated by the body of individuals through biochemical processes. Assimilation allows, based on the interpretation of isotopic ratios of human tissues (obtained after analysis in a mass spectrometer), the geographic correlation of these values and the determination of particularities of the individual's life habits, which may come to assist in the process of identification. There are records in the international literature of solved criminal investigations due to the contribution of results obtained through isotope ratio mass spectrometry. However, there are few studies that clearly present the ideal protocols for applying the technique in Criminalistics and that discuss the several variables that can influence the process of assimilation of the isotopes of an element to the human body, as well as intrinsic aspects related to the analytical procedures that can alter the original isotopic composition of samples. The full understanding and mitigation of the effects of these variables is an important step for the correct interpretation of this type of data in a forensic context, and therefore represent a big challenge for the correct establishment of protocols to determine the geographical origin of human tissues and nutritional habits using SIA. This study seeks to contribute to the consolidation of methods of using SIA by forensic experts in Brazil, determining more viable analytical procedures based on the results of experiments with samples of human tissues, the target of investigations in forensic anthropology. The study was developed with the general aim of understanding patterns of induced fractionation of carbon, oxygen and / or nitrogen isotopes in human hair and teeth, in order to identify ways to prevent these fractionations from being occasionally triggered when analyzing samples in the criminal context. The proposal includes the analysis of three different matrices of human tissues: hair, nails and teeth. For tooth samples, specifically, isotopic carbon and oxygen signatures have been obtained, evaluating the influence of different pulverization methods. The experiment was proposed based on the assumption that the adoption of different methods could influence the final result. For hair samples, we sought to assess the possibility of interference from aesthetic procedures such as dyeing and discoloration, which, at first, was thought that could change the original isotopic ratios of the samples. At last, nail samples were analyzed in order to check if the signatures for carbon and nitrogen isotopes would vary for different, yet kindred, infant individuals with known and controlled dietary habits, which was confirmed.

Keywords: Stable isotopes; forensic geochemistry; isotopic fractioning.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Esquema simplificado dos mecanismos internos presentes em um espectrômetro de massa. Observa-se que átomos ou moléculas mais pesadas apresentam desvio menor de sua trajetória do que moléculas mais leves. Fonte: Mascarenhas (2019), adaptado de Brand (1996).	28
FIGURA 2 – Variação das assinaturas isotópicas do carbono em plantas de ciclo fotossintético C3 (-35‰ a -22‰) e C4 (-17‰ e -9‰). As plantas CAM, se representadas neste gráfico, ocupariam um range de -34 ‰ a -10‰. Adaptado de Vogel (1980).	30
FIGURA 3 – Variação da assinatura isotópica do ^{13}C nos tecidos de animais herbívoros com dieta baseada em 50% de plantas C3 e 50% de plantas C4. Adaptada de Ferreira (2008).	31
FIGURA 4 – Ilustração do aumento do valor da assinatura isotópica do ^{15}N em animais marinhos, de acordo com sua posição na cadeia alimentar. O mesmo comportamento é observado em animais carnívoros terrestres, quanto mais no topo da cadeia trófica estiverem. Adaptada de O'Brien (2015).	32
FIGURA 5 – Variação da assinatura isotópica de oxigênio em diferentes ambientes na natureza segundo os parâmetros de continentalidade, sazonalidade e altitude. Adaptado de Pederzani e Britton (2018).	33
FIGURA 6 – Variação da assinatura isotópica de águas meteóricas no planeta. Mapa global de distribuição média de razões isotópicas de oxigênio-18 segundo dados do GNIP de 2017. IAEA/WMO. De Pederzani e Britton (2018).	34
FIGURA 7 – Ilustração da morfologia de um dente humano, com indicação de cada componente. Adaptado de Blausen.com staff (2014). "Medical gallery of Blausen Medical 2014". WikiJournal of Medicine 1 (2). DOI:10.15347/wjm/2014.010. ISSN 2002-4436.	36
FIGURA 8 – Anatomia do fio de cabelo humano. (a) Ilustração com principais elementos: MF: microfibras; Co: Córtex; Md: Medula; Cu: Cutícula. (b) Vista longitudinal em microscópio. (c) Seção transversal em microscópio, por Tobin (2006).	39
FIGURA 9 – Anatomia da lâmina ungueal humana. A matriz constitui a parte da unha a partir da qual células mortas queratinizadas são compactadas, adquirindo a estrutura foliar que compõe as unhas. Adaptado de Openstax CNX por Boaventura (2016).	39

STABLE ISOTOPE ANALYSIS OF HUMAN TEETH AND HAIR: ANALYTICAL PROCESSES AND INTERPRETATIONS

FIGURE 1 – Scheme indicating the selected site for tooth sampling. ED samples were obtained with microdrill at the crown end. DDI samples are from distal dentin, adjacent to the enamel. DDA samples were obtained with microdrill from proximal dentin, at the root portion, in the apical area. The DC samples comprise those obtained by pulverizing the entire dentin, after enamel removal with microdrill (bulk dentin). Teeth image captured with a SkyScan Micro-CT.....	47
FIGURE 2 – A: Scatterplot representing the results for samples from individual H20. B: HCA resulting dendrogram.....	48
FIGURE 3 – A: Graph showing the results obtained from the analysis of teeth samples from individual H21. B: HCA resulting dendrogram.	49
FIGURE 4 – A: Result obtained from three teeth of individual M25. B: HCA resulting dendrogram.	50
FIGURE 5 – (A): Boxplots presenting variations in carbon isotopic signatures of teeth samples from three individuals. Individual H21 showed the greatest variation, indicating a possible change in diet. (B): Boxplots presenting variations in oxygen isotopic signatures. It is noticeable that the results of individual H20 overlap, indicating a probable fixed location of residence from childhood until teeth extractions in adulthood.....	52

STABLE ISOTOPE ANALYSIS OF HUMAN HAIR: EVALUATING THE INFLUENCE OF ARTIFICIAL PIGMENTS

FIGURE 1 – A: Carbon and nitrogen results for natural and dyed hair samples. It can be observed that the isotopic signatures of the dyes present a difference of -10‰ for carbon in relation to hair strands. HB: hair dyed with code B brand dyes; HK: strand dyed with K code brand dyes; HG: strands dyed with G code brand dyes; HP: bleached samples. HCTRL: sample with strands kept natural. B: HCA resulting dendrogram. 61	
FIGURE 2 – Boxplots representing the results obtained from the analysis of natural hair samples, dyed hair strands and bleached ones. A: $\delta^{13}\text{C}$; B: $\delta^{15}\text{N}$	63

VARIAÇÕES DAS ASSINATURAS ISOTÓPICAS DE AMOSTRAS DE UNHA E CABELOS DE CRIANÇAS COM DIFERENTES HÁBITOS ALIMENTARES

FIGURA 1 – Assinaturas isotópicas de carbono e nitrogênio obtidas a partir da análise de unhas (círculos) e cabelos (triângulos) de crianças com dieta e origem conhecidas.....70

FIGURA 2 – Boxplots das assinaturas de carbono e nitrogênio das amostras, evidenciando o padrão dos resultados para o carbono, de onívoros e de nitrogênio, para crianças que ainda contam com leite materno em sua dieta.....71

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Elementos predominantes no corpo humano e seus isótopos26

TABELA 2 – Idade de formação da dentição permanente em humanos.....38

STABLE ISOTOPE ANALYSIS OF HUMAN TEETH AND HAIR: ANALYTICAL PROCESSES AND INTERPRETATIONS

TABLE 1 – ANOVA and MANOVA results of teeth samples data analysis51

STABLE ISOTOPE ANALYSIS OF HUMAN HAIR: EVALUATING THE INFLUENCE OF ARTIFICIAL PIGMENTS

TABLE 1 – Number of samples and respective procedures59

TABLE 2 – ANOVA and MANOVA results of hair samples data analysis63

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS E SÍMBOLOS

UFPR	- Universidade Federal do Paraná
LAMIR	- Laboratório de Análise de Minerais e Rochas
CIE	- Centro de Isótopos Estáveis
IRMS	- Isotope Ratio Mass Spectrometry
C	- Carbono
O	- Oxigênio
N	- Nitrogênio
H	- Hidrogênio
AIE	- Análise de Isótopos estáveis
‰	- Permil ou partes por mil
δ	- Delta (notação de assinaturas isotópicas)
V-SMOW	- <i>Vienna Standard Mean Ocean Water</i>
VPDB	- <i>Vienna Pee Dee Belemnite</i>
CAM	- Ciclo fotossintético de plantas de clima árido
C3	- Ciclo fotossintético de plantas de clima temperado
C4	- Ciclo fotossintético de plantas de clima tropical

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	16
1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Justificativa	21
1.2 Objetivo geral	21
1.3 Objetivos específicos	21
1.4 Métodos analíticos empregados	22
1.5 Métodos estatísticos empregados	22
1.5.1 ANÁLISE HIERÁRQUICA DE CLUSTERS (HCA)	22
1.5.2 ANOVA E MANOVA	23
1.5.3 IMPORTÂNCIA DA ESTATÍSTICA MULTIVARIADA	24
2 REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1 Isótopos estáveis e espectrometria de massa de razão isotópica	25
2.2 Variação da composição isotópica de C, O e N na natureza	28
2.2.1 O CICLO DO CARBONO	28
2.2.2 O CICLO DO NITROGÊNIO	31
2.2.3 O CICLO DO OXIGÊNIO	32
2.3 Espectrometria de massa de razão isotópica e ciência forense	34
2.4 Espectrometria de massa de razão isotópica aplicada à antropologia	35
2.4.1 DENTES HUMANOS	35
2.4.2 CABELOS E UNHAS HUMANAS	38
2.4.3 TRABALHOS ANTERIORES	39
CAPÍTULO II	41
3 MATERIAIS E MÉTODOS	41
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	43
<i>STABLE ISOTOPE ANALYSIS OF HUMAN TEETH AND HAIR: ANALYTICAL PROCESSES AND INTERPRETATIONS.</i>	43
ABSTRACT	43
KEYWORDS	43
1 INTRODUCTION	44
2 MATERIAL AND METHODS	45
3 RESULTS	48
4 DISCUSSIONS	51

5 CONCLUSIONS.....	53
ACKNOWLEDGEMENTS	53
REFERENCES.....	53
<i>STABLE ISOTOPE ANALYSIS OF HUMAN HAIR: EVALUATING THE INFLUENCE OF ARTIFICIAL PIGMENTS.....</i>	<i>56</i>
ABSTRACT.....	56
KEYWORDS	56
1 INTRODUCTION.....	57
1.2 Human hair analysis.....	58
2 MATERIAL AND METHODS	59
3 RESULTS.....	60
4 DISCUSSIONS.....	62
5 CONCLUSIONS.....	63
ACKNOWLEDGEMENTS	64
REFERENCES.....	64
<i>VARIAÇÕES DAS ASSINATURAS ISOTÓPICAS DE AMOSTRAS DE UNHA E CABELOS DE CRIANÇAS COM DIFERENTES HÁBITOS ALIMENTARES</i>	<i>67</i>
RESUMO.....	67
PALAVRAS-CHAVE	67
1 INTRODUÇÃO	67
2 MATERIAIS E MÉTODOS	69
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	70
4 CONCLUSÕES	72
AGRADECIMENTOS.....	72
REFERÊNCIAS.....	72
CAPÍTULO III.....	73
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E RECOMENDAÇÕES	73
REFERÊNCIAS.....	75
ANEXO 1 – RESULTADOS ANALÍTICOS	81

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

Desenvolvidas a partir da necessidade de sistematização de procedimentos e técnicas para deslinde de casos no âmbito do direito civil e penal, as Ciências Forenses, caracterizadas pela utilização, no contexto jurídico, de técnicas das mais diversas áreas das Ciências Naturais de maneira sistematizada e reprodutível (Khandasammy et al., 2018), ampliaram as fronteiras do processo de elucidação de crimes a partir do século XIX com a divulgação de obras voltadas especificamente para a descrição de métodos e protocolos a serem utilizados pelos agentes da lei.

Muito antes da publicação, em 1893, do *Magnum Opus* do criminalista austríaco Hans Groß “*Handbuch für Untersuchungsrichter als System der Kriminalistik*”, um então guia prático para profissionais envolvidos no processo de juntada de corpo probatório¹ no âmbito de um processo judicial, algumas obras já haviam sido publicadas com intuito de tornar mais justa a apreciação de infrações penais e o decorrente julgamento de infratores, sendo uma destas obras a “*Xi Yuan Lu*” de Song Ci, publicada em 1248 na China e traduzida para o inglês com o título “*Washing Away of Wrongs – Collected Cases of Injustice Rectified*”, que é considerada a primeira obra escrita de Ciência Forense do mundo (Needham et al., 1981). Entretanto, a despeito da existência de trabalhos do gênero antes do século XIX, a confissão e as provas testemunhais comumente apresentavam maior peso para a decisão do juiz nos sistemas de apreciação probatória preponderantes até a Revolução Francesa (Brum, 1980), período a partir do qual o ordenamento jurídico de diversos países europeus passou por um processo de reformulação com a prerrogativa de um viés mais democrático, impactando a formulação dos códigos de processo penal de todo o mundo. Diante deste cenário, as provas periciais passaram a representar um dos sustentáculos dos inquéritos policiais brasileiros, por serem produzidas a partir da adoção de métodos de natureza científica e, em decorrência disto, serem consideradas em grande parte pela Doutrina Jurídica brasileira como um

¹ “(...) conjunto de atos praticados pelas partes, pelo juiz (CPP, arts. 156, I e II, 209 e 234) e por terceiros (p. ex., peritos), destinados a levar o magistrado a convicção acerca da existência ou inexistência de um fato, da falsidade ou veracidade de uma afirmação. Trata-se, portanto, de todo e qualquer meio de percepção empregado pelo homem com a finalidade de comprovar a verdade de uma alegação.” Capez, F. (2015).

dos meios probatórios de maior confiabilidade, por permitir uma maior aproximação da reconstituição de fatos de maneira imparcial. Diante disto, ficou estabelecida como regra, pelo Código de Processo Penal Brasileiro (1942) Art. 158, a obrigatoriedade da execução do exame de corpo de delito em todos os crimes que deixam vestígio, tendo como base um dos princípios das Ciências Forenses, formulado pelo criminalista francês Edmond Locard: *“Every contact leaves a trace”*².

Neste contexto, a análise de isótopos estáveis, uma técnica comumente utilizada pelos profissionais da geoquímica, biologia, ecologia, entre outras áreas, vem se mostrando promissora também para análise de vestígios encontrados em locais de crime das mais diversas naturezas, desde os relacionados a crimes ambientais àqueles contra a vida.

Isótopos estáveis são átomos que por apresentarem um mesmo número de prótons (Z) caracterizam um mesmo elemento químico, porém, contando com diferentes números de nêutrons (N) em seu núcleo, apresentam massas atômicas (A) diferentes ($A=Z+N$). A diferença de massa atômica faz com que, ainda que de um mesmo elemento e com mesmas propriedades químicas, estes diferentes isótopos apresentem diferentes predominância e distribuição na natureza (Meier-Augenstein, 2018).

Dos 92 elementos químicos de ocorrência natural, 61 apresentam mais de uma forma isotópica estável e encontram-se na natureza em uma abundância global específica que foi fixada com a formação do planeta Terra. Entretanto, a depender de processos biológicos, químicos e bioquímicos, a abundância relativa (razão) de um isótopo mais pesado de um elemento, geralmente menos abundante, e sua versão mais leve, poderá ser modificada em diferentes ambientes na natureza (Meier-Augenstein, 2018). Ou seja, diferentes amostras dos mais diversos materiais presentes no meio ambiente, orgânicos ou inorgânicos, apresentarão razões isotópicas diversas que são reflexo dos processos supracitados, onde moléculas com elementos mais leves ou mais pesados serão favorecidas em reações químicas, desencadeando essa variação da predominância de um isótopo em relação ao outro. Estas razões isotópicas, então, variáveis, permitem a correlação com fontes e origens, a partir do momento em que o profissional que obtém e trabalha com este tipo de dado conhece os padrões de variação destes valores no meio ambiente, podendo então

² “Todo contato deixa um vestígio”, em tradução livre.

interpretar estas informações com a acurácia necessária para realização deste tipo de correlação. Esta peculiaridade da composição isotópica de componentes da natureza permitiu a aplicação da técnica analítica de isótopos estáveis nas mais diversas áreas do conhecimento. Na geologia, por exemplo, a análise de isótopos estáveis (AIE) é muito utilizada no estudo da contribuição de fluidos de origem mantélica na formação de rochas estudadas em petrologia metamórfica, assim como pode ser utilizada na reconstrução de paleoambientes de formação de rochas sedimentares como os carbonatos (Sharp, 2017). Estes são apenas dois exemplos simples de aplicação da técnica no contexto das geociências, mas esta é aplicável às mais diversas áreas, sendo considerada, portanto, uma técnica analítica bastante versátil. Esta versatilidade foi responsável por atrair a atenção de cientistas forenses em todo o mundo, diante da possibilidade de aplicação da técnica com os mais diferentes materiais, permitindo, por exemplo, determinar a origem de narcóticos, produtos contrabandeados, explosivos, assim como determinar a origem e especificidades de hábitos de vida de indivíduos a partir de amostras dos tecidos que compõem o seu corpo, no âmbito da antropologia forense.

Como supracitado, a AIE aplicada à antropologia forense, que se dedica ao processo de descrição, caracterização e identificação de pessoas, contexto de aplicação do presente trabalho, permite determinar possíveis origens de restos humanos analisados, assim como obter informações acerca de hábitos alimentares de um indivíduo, informações extremamente úteis em investigações criminais (Klepinger e Mintel, 1986; Tykot, 2004; Roy et al., 2005; Chesson et al., 2014;). Estes dados podem ser obtidos a partir da determinação das razões isotópicas de elementos como carbono (C), nitrogênio (N), oxigênio (O) e hidrogênio (H), presentes em abundância no corpo humano. Cada um destes elementos apresenta uma variação de razões isotópicas característica, que é reflexo de processos ambientais e biológicos específicos, permitindo o levantamento de informações diversas que só podem ser conseguidas a partir da obtenção de uma assinatura isotópica da amostra de interesse, estabelecida a partir da comparação da razão da amostra com a razão de um material padrão, cujo valor é conhecido. Estes padrões variam de acordo com o elemento em questão e são utilizados por todos os laboratórios de análise isotópica, sendo essenciais para eficiência do método e consequente possibilidade de interpretação dos dados (Meier-Augenstein, 2018). Os padrões e suas especificidades serão apresentados mais adiante.

O processo de assimilação dos isótopos de carbono e de nitrogênio pelo corpo humano se dá a partir da digestão de tecidos vegetais e animais, em função das particularidades dos ciclos de distribuição destes elementos na biosfera. Assim, as assinaturas isotópicas destes dois elementos, obtidas a partir da análise dos tecidos de um indivíduo, são consequência das preferências nutricionais deste. Já as razões isotópicas de oxigênio e de hidrogênio são decorrentes das fontes de hidratação do indivíduo, intimamente relacionadas às características do abastecimento de água da região de onde é proveniente, aspecto este também intimamente relacionado a características geográficas e hidrológicas da região (Ehleringer et al., 2007; Bowen, 2010). Tendo isto em mente, é possível afirmar que as assinaturas isotópicas de C e N de um indivíduo permitem a obtenção de informações acerca de seus hábitos alimentares, enquanto as assinaturas de O e H permitem correlação com possíveis origens geográficas. Estes elementos, portanto, podem ser de extrema valia em estudos arqueológicos e antropológicos, e, consequentemente, também no contexto de investigações criminais relacionadas à antropologia forense.

A AIE é uma técnica analítica que vem sendo adotada por investigadores em diversos países, sobretudo da Europa e dos Estados Unidos (Dostie, 2007; Meier-Augenstein, 2007). Com o avanço da adoção da técnica por especialistas forenses, foi criada a *Forensic Isotope Ratio Mass Spectrometry Network* (FIRMS), uma rede de profissionais e pesquisadores dedicados à aplicação da AIE em contextos de persecução penal, voltada para a discussão de boas práticas e compartilhamento de informações para desenvolvimento de protocolos para utilização do método. No Brasil, levando em consideração as especificidades do ordenamento jurídico do país, trabalhos relacionados ao assunto são raros, assim como ainda podem ser consideradas escassas as publicações que trazem experimentos elaborados com a intenção de elucidar algumas das dúvidas que surgem acerca de procedimentos analíticos e confiabilidade de dados, considerando o volume total de produção científica relacionada ao tema.

O presente trabalho apresenta a descrição e resultados de experimentos que tiveram como objetivo observar e dirimir a influência de fatores intrínsecos ao procedimento de análise isotópica de amostras de tecidos humanos, que tenham um impacto negativo na confiabilidade de assinaturas isotópicas obtidas e na reprodutibilidade destas análises. Assim, foram observadas as variações das

assinaturas isotópicas de tecidos de indivíduos com origem e hábitos alimentares conhecidos. Foram três fatores avaliados:

1. A modificação das assinaturas isotópicas de carbono e oxigênio amostras de dentes humanos, em decorrência da adoção de diferentes métodos de pulverização;
2. O impacto da presença de pigmentos no processo de obtenção das assinaturas isotópicas de carbono e nitrogênio de cabelos humanos;
3. A variabilidade das assinaturas isotópicas de carbono e nitrogênio a partir da análise de unhas de indivíduos de mesma faixa etária, com hábitos alimentares diversos.

A partir de cada um dos experimentos, foram obtidos resultados que auxiliaram no processo de avaliação do procedimento analítico adotado e permitiram o estabelecimento de práticas mais objetivas e eficientes para obtenção, de maneira confiável, dos resultados necessários.

A estrutura do presente trabalho é dividida em três capítulos, o primeiro, de introdução e revisão de literatura, apresenta informações acerca dos isótopos estáveis e sua presença na natureza, a descrição da técnica analítica utilizada e sua importância em estudos forenses e antropológicos. No segundo capítulo, é feita a descrição dos materiais e métodos utilizados e apresentação dos resultados e discussões, divididos em três artigos científicos. Por fim, o terceiro capítulo conta com as considerações finais e recomendações.

Os artigos resultantes do trabalho são intitulados:

1. *"STABLE ISOTOPE ANALYSIS OF HUMAN TEETH: ANALYTICAL PROCESSES AND INTERPRETATIONS"*. Este conta com todos os resultados obtidos a partir da análise de dentes humanos, submetido à revista *Chemical Geology*.
2. *"STABLE ISOTOPE ANALYSIS OF HUMAN HAIR: EVALUATING THE INFLUENCE OF ARTIFICIAL PIGMENTS"*. Este conta com todos os resultados obtidos a partir da análise de cabelos humanos.
3. *"VARIAÇÕES DAS ASSINATURAS ISOTÓPICAS DE AMOSTRAS DE UNHA E CABELOS DE CRIANÇAS COM DIFERENTES HÁBITOS ALIMENTARES"*. Neste, são apresentados os resultados das análises de unhas e cabelos de indivíduos entre 0 e 5 anos de idade, com dietas conhecidas e controladas pelos pais e responsáveis.

1.1 Justificativa

A técnica de análise de isótopos estáveis vem ganhando espaço em investigações criminais em países da Europa e América do Norte. Diante deste avanço, diversas iniciativas em Ciências Forenses vêm promovendo o desenvolvimento da técnica para aplicação em perícia criminal no Brasil, fazendo-se necessária a avaliação de procedimentos analíticos para realização deste tipo de análise, o que demanda a realização de experimentos que permitam estabelecer os melhores protocolos para obtenção de assinaturas isotópicas em materiais de interesse pericial, como por exemplo tecidos humanos, levando em consideração o ordenamento jurídico do país e as características ambientais e culturais deste. Mesmo no exterior, os procedimentos de análise isotópica de remanescentes humanos apresentam inconsistências, o que torna difícil a determinação de quais podem ser consideradas as melhores práticas. Assim, os experimentos aqui relatados pretendem abordar algumas das incongruências observadas em alguns trabalhos da área, contribuindo para o avanço do uso da técnica no contexto forense.

1.2 Objetivo Geral

Avaliar a interferência de elementos extrínsecos e intrínsecos ao procedimento de análise de tecidos humanos para obtenção de razões isotópicas, para fins de correlação geográfica e determinação de hábitos alimentares de maneira confiável e reprodutível, assim como, a partir dos experimentos realizados, determinar as melhores práticas de preparação de amostras, descrevendo detalhadamente o procedimento analítico adotado.

1.3 Objetivos específicos

1. Avaliar o impacto de diferentes procedimentos de pulverização de amostras de dente humano na determinação das assinaturas isotópicas de carbono e oxigênio;
2. Avaliar a influência da presença de pigmentos estéticos em amostras de cabelo humano na obtenção das assinaturas de carbono e nitrogênio;

3. Identificar eventuais padrões isotópicos de carbono e nitrogênio em amostras de unhas de indivíduos de mesma faixa etária e origem conhecida, com diferentes hábitos alimentares;

4. Avaliar os procedimentos adotados para análise de tecidos humanos no âmbito do Laboratório de Análise de Minerais e Rochas da Universidade Federal do Paraná (LAMIR/UFPR) e do Centro de Isótopos Estáveis da Universidade Estadual Paulista (CIE/UNESP).

1.4 Métodos analíticos empregados

Para as amostras orgânicas (cabelos e unhas), foi adotado sistema de espectrometria de massa de razão isotópica por fluxo contínuo CF-IRMS (online), utilizando equipamentos da *Thermo Fisher Scientific*TM: um analisador elementar (EA) de CHN a combustão, modelo *Flash 2000*®, acoplado a um IRMS modelo *Delta V*® por meio de interface de fluxo contínuo *ConFlo IV*®, disponível no Centro de Isótopos Estáveis da Universidade Estadual Paulista.

Para amostras organominerais (dentes) foi utilizado o espectrômetro de Massa de Razão Isotópica *Delta V Advantage*® com preparador de gases e sistema de injeção *GasBench II*®, ambos da *Thermo Fisher Scientific*TM, e auto-amostrador GC PAL (*CTC Analytics*TM), equipado com banho térmico em bloco seco, disponível no Laboratório de Análise de Minerais e Rochas da Universidade Federal do Paraná. Detalhes sobre as técnicas podem ser consultados no Capítulo II Seção 3 - “Materiais e Métodos”.

1.5 Métodos estatísticos empregados

1.5.1 ANÁLISE HIERÁRQUICA DE CLUSTERS (HCA)

A Análise Hierárquica de Agrupamentos (HCA – *Hierarchical Cluster Analysis*) é um método quimiométrico (Meier-Augenstein, 2018) de análise de dados multivariados. Trata-se de uma análise não supervisionada, útil para reconhecimento de padrões e agrupamentos (clusters) de dados não direcionados antes da realização da análise, ou seja, para os quais não são estabelecidas pressuposições acerca da distribuição das variáveis. Neste método, as amostras são agrupadas e relacionadas

por similaridade (Miller e Miller, 2005) a partir de padrões observados nos dados. A distância Euclidiana é a mais comumente utilizada para determinação da proximidade dos agrupamentos.

Para aplicação do método, os resultados para cada uma das amostras são dispostos em uma matriz de similaridade onde uma distância 0 entre duas amostras indica que as mesmas apresentam características indistinguíveis. Posteriormente, as medidas são ligadas umas às outras, o que permite a individualização de grupos. Os critérios de ligação que podem ser adotados para relacionar as observações incluem a ligação pelo centroide, ligação individual (*single linkage*), ligação pela média, ligação pela mediana, método de Ward, entre outros. O produto da análise é um dendrograma onde o eixo vertical corresponde à distância entre os agrupamentos ou à porcentagem de similaridade entre eles. Quanto mais próxima de 0 (distância) ou de 100% (similaridade), mais parecidas as amostras, ou os grupos de amostras.

A análise é chamada de hierárquica porque assim que uma amostra é estabelecida em um grupo, o processo não pode ser revertido, ou seja, tendo a amostra uma posição, com suas coordenadas, em um espaço n-dimensional no qual são definidas as distâncias que permitirão individualizar os agrupamentos, a mesma será estabelecida na área de abrangência de seu cluster, segundo as menores distâncias calculadas, e sua “classificação” nos agrupamentos não será modificada em função da individualização de outros grupos nas adjacências, à medida que a análise avança.

1.5.2 ANOVA E MANOVA

A Análise de variância (ANOVA) pode ser definida como um conjunto de modelos estatísticos que permite avaliar se as médias de dois ou mais grupos de dados (populações) são iguais. A avaliação é feita através de teste de hipóteses (MINITAB SUPPORT, 2019a) onde a H_0 (hipótese nula) afirma que a média de todas as populações são iguais, enquanto a H_1 (hipótese alternativa) afirma que pelo menos uma das médias dos grupos de dados considerados é diferente. O nome “análise de variâncias” deriva do procedimento a partir do qual é estabelecido se as médias são diferentes ou não, que é baseado na comparação da variância entre as médias dos grupos e a variância entre os dados que compõem cada grupo, isoladamente. Esta abordagem permite determinar se os grupos avaliados pertencem todos a uma

mesma população, ou se correspondem a populações diferentes com características diversas. Por não se tratar de uma técnica multivariada, realiza a avaliação de dados para uma única variável, que deve ser contínua (como é o caso de dados isotópicos) e com ao menos um fator categórico em dois ou mais níveis (Glenn, 2021). Exemplo: dados de $\delta^{13}\text{C}$ (variável), de cabelos humanos (fator categórico), de amostras questionadas (1º nível) e amostras padrão (2º nível). Para aplicação desta técnica estatística, é necessário que as variâncias dos grupos sejam da mesma ordem de grandeza e que os dados possuam distribuição normal (ou aproximadamente normal), o que é avaliado submetendo os valores em questão a um teste de normalidade.

Os testes ANOVA são divididos em dois tipos: *One-way* e *two-way*, sendo o primeiro utilizado para avaliar a diferença entre dois ou mais grupos de dados, considerando-se apenas um fator categórico, enquanto a abordagem *two-way* envolve, necessariamente, ao menos dois fatores, possibilitando que a interação entre estes seja estudada (Miller e Miller, 2005).

Após a aplicação da técnica, analisa-se o *p-value* obtido como resultado. Adotando um intervalo de confiança de 95%, um valor de *p* inferior a 0,05 corrobora a hipótese alternativa de que ao menos uma das médias dos grupos é diferente, não sendo possível considerar todos os dados como pertencentes a uma mesma população.

MANOVA (análise multivariada de variância), por sua vez, é caracterizada como a ANOVA, porém, considerando duas ou mais variáveis dependentes, ou seja, a relação entre diversas variáveis dependentes e um preditor independente é analisada ao mesmo tempo (MINITAB SUPPORT, 2019b). Na MANOVA, diferentes variáveis dependentes são testadas através da criação de novas variáveis dependentes artificiais, de modo a maximizar a distinção entre os grupos analisados (Glen, 2021). As novas variáveis dependentes são combinações lineares das variáveis dependentes originalmente medidas.

1.5.3 IMPORTÂNCIA DA ESTATÍSTICA MULTIVARIADA

Conforme descrito por Sartori et al. (2012), tanto métodos estatísticos univariados como multivariados podem ser utilizados para avaliar a significância de diferenças ou compatibilidades entre grupos de dados. Entretanto os métodos de análise multivariada combinam observações, de modo que a relevância da diferença

entre grupos se torna maior. A análise das variáveis isoladamente, adotando um método como a ANOVA, aumenta consideravelmente a probabilidade de ocorrência de erro Tipo I, sobretudo em casos de variáveis que não são perfeitamente correlacionáveis, como a maioria das assinaturas isotópicas. A realização de testes estatísticos univariados isoladamente, portanto, impacta negativamente o controle do Perito sobre as taxas de erro associadas ao seu processo de interpretação de dados, além de impedir a avaliação mais segura da correlação entre as variáveis consideradas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Isótopos estáveis e espectrometria de massa de razão isotópica

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

Os isótopos, que podem ser classificados como estáveis ou não-estáveis, são definidos como elementos com diferentes massas atômicas, mas que ocupam a mesma posição na tabela periódica por apresentarem mesmo número de elétrons e de prótons, diferindo apenas no número de nêutrons. A massa atômica representada para cada elemento conhecido na tabela periódica é calculada a partir da média ponderada de cada isótopo do mesmo elemento, de acordo com sua abundância na natureza. Essa abundância é pré-fixada no meio-ambiente durante a formação de um planeta, a partir dos processos de fusão nuclear na estrela de origem do sistema planetário. Entretanto, a composição inicial de isótopos não-estáveis (radiogênicos) varia com os processos de decaimento radioativo que dão origem a elementos distintos, ao passo que os isótopos estáveis mantêm suas quantidades indefinidamente, porém passando por variações de abundância relativas devido a fracionamentos isotópicos desencadeados em processos físicos, químicos e

bioquímicos (Urey, 1947), ou seja, nesses processos há um enriquecimento ou empobrecimento de um isótopo em relação ao outro, variabilidade que só é possível devido a diferenças de comportamento físico-químico entre compostos contendo diferentes isótopos de um mesmo elemento. Moléculas com isótopos mais leves são favorecidas em reações químicas em detrimento às mais pesadas que, além de comumente formarem reações químicas mais estáveis (Coplen et al., 2002), também se movem mais lentamente, dificultando a colisão com outras moléculas.

Dos 92 elementos químicos de ocorrência natural, quase todos existem em mais de uma forma isotópica, a maioria estável. Destes, quatro elementos são mais abundantes no corpo humano e, portanto, são considerados mais interessantes para aplicação em casos relacionados a antropologia forense. A Tabela 1, a seguir, lista estes elementos, seus isótopos estáveis, sua abundância relativa na natureza e sua prevalência em tecidos humanos (Emsley, 2001; Benson et al., 2006).

TABELA 1 – Elementos predominantes no corpo humano e seus isótopos

Elemento (Símbolo)	Isótopos	Abundância relativa na natureza (%)	Abundância em tecidos humanos (%)
Carbono (C)	¹² C	98,892	67,0
	¹³ C	1,108	
Hidrogênio (H)	¹ H	99,984	9,3
	² H	0,0156	
Oxigênio (O)	¹⁶ O	99,759	16,0
	¹⁷ O	0,037	
	¹⁸ O	0,204	
Nitrogênio (N)	¹⁴ N	99,635	7,2
	¹⁵ N	0,365	

A variação da abundância relativa dos isótopos de um elemento no corpo humano, de acordo com sua origem geográfica (oxigênio e hidrogênio) e seus hábitos alimentares (carbono e nitrogênio) é a premissa básica para possibilidade da adoção

da técnica de análise de isótopos estáveis em antropologia forense. O instrumento utilizado para obtenção das razões isotópicas de um tecido, que vão permitir a determinação de possível proveniência ou dieta, é o espectrômetro de massa de razão isotópica. Trata-se do principal equipamento usado na medição de razões isotópicas de elementos leves, como o C, H, O e N. Nele, a amostra de interesse, em estado sólido, é transformada em gás através de analisadores acoplados ao espectrômetro, como por exemplo o *GasBench II*® da *Thermo Fisher Scientific*™, para amostras inorgânicas ou organominerais como dentes e ossos, e o *Flash2000 Organic Elemental Analyzer*® (OEA), da mesma fabricante, para amostras orgânicas como unhas e cabelos. No primeiro, o material pulverizado é exposto a ácido ortofosfórico para destruição da estrutura da hidroxiapatita que compõe estes organominerais e que contém aproximadamente 4% de carbonato em sua estrutura cristalina, que quando exposto a meio ácido é digerido, em um processo em que ocorre liberação de CO₂ que é captado pelo equipamento e conduzido e analisado pelo espectrômetro de massa, possibilitando a obtenção das razões isotópicas do carbono e do oxigênio. No segundo equipamento citado, a amostra é submetida a processo de combustão e redução para obtenção dos gases necessários para determinação das razões dos elementos de interesse. Após esse processo, em ambos os equipamentos, a amostra já em sua forma gasosa reduzida, segue para o interior do espectrômetro onde é ionizada (Dunn, 2007). Estes íons formados são acelerados em feixe, entrando em um tubo curvado (FIGURA 1) envolto por um eletroímã responsável pela deflexão desse feixe de íons de acordo com a razão de sua massa pela carga, portanto o feixe original deixa o setor magnético como diversos feixes separados com trajetórias de diferentes ângulos.

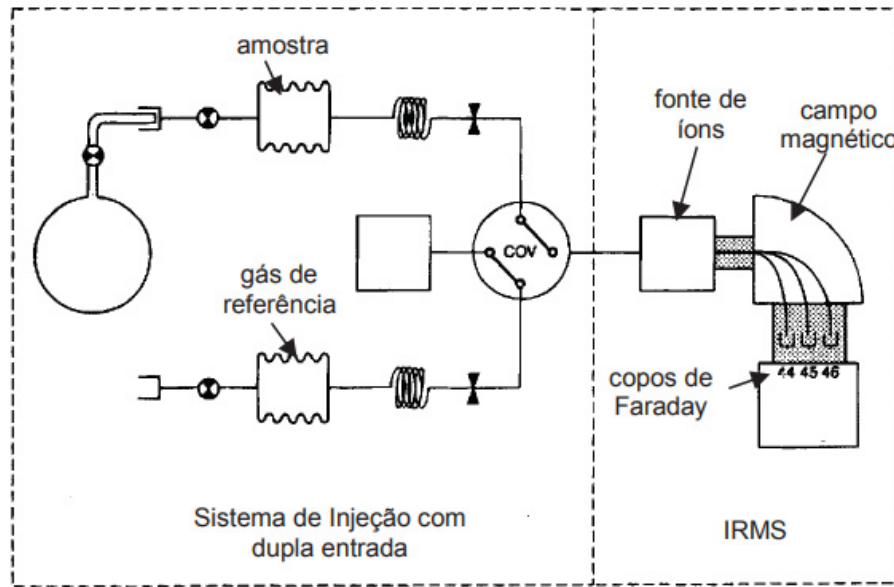


FIGURA 1 - Esquema simplificado dos mecanismos internos presentes em um espectrômetro de massa. Observa-se que átomos ou moléculas mais pesadas apresentam desvio menor de sua trajetória do que moléculas mais leves. Fonte: Mascarenhas (2019), adaptado de Brand (1996).

Estes íons alcançam, por fim, detectores posicionados estrategicamente, que os coletam e realizam sua medida como uma corrente que pode ser amplificada e determinada com alta precisão (Dunn, 2007). A partir disso, o equipamento pode determinar a quantidade de cada isótopo presente nas moléculas ionizadas e definir o valor da assinatura isotópica requisitada, conforme a equação:

$$\delta(\text{‰}) = \left\{ \frac{(R_{\text{amostra}} - R_{\text{padrão}})}{R_{\text{padrão}}} \right\}$$

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

$$\delta^{13}\text{C}(\text{‰}) = \left\{ \frac{\left(\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \right)_{\text{amostra}}}{\left(\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \right)_{\text{padrão}}} - 1 \right\}, \text{ para o carbono}$$

$$\delta^{15}\text{N}(\text{‰}) = \left\{ \frac{\left(\frac{^{15}\text{N}}{^{14}\text{N}} \right)_{\text{amostra}}}{\left(\frac{^{15}\text{N}}{^{14}\text{N}} \right)_{\text{padrão}}} - 1 \right\}, \text{ para o nitrogênio}$$

$$\delta^{18}_8O(\text{‰}) = \left\{ \frac{\left(\frac{^{18}O}{^{16}O} \right)_{amostra}}{\left(\frac{^{18}O}{^{16}O} \right)_{padr\tilde{a}o}} - 1 \right\}, \text{ para o oxig\~{e}nio}$$

Para resultar em valores com menor número de casas decimais, o resultado é multiplicado por mil, para isso sendo adotada a notac  o ‰.

2.2 Variação da composição isotópica de C, O e N na natureza

2.2.1 CICLO DO CARBONO

Durante o processo de fixação pelas plantas do CO₂ presente na atmosfera, os isótopos de ¹³C e ¹²C passam por processo de fracionamento e os tecidos vegetais adquirem uma assinatura isotópica empobrecida em ¹³C, como constatado por Smith e Epstein (1971). De modo geral, o CO₂ presente no ar já apresenta quantidades menores de ¹³C em relação ao padrão VPDB (*Vienna Pee Dee Belemnite*), calibrado para a mesma razão isotópica do padrão original, um f ssil marinho do cretáceo, proveniente da formação Pee Dee nos EUA, para o qual foi estabelecido o valor de 0‰. No processo de assimilação do CO₂ atmosférico para realização da fotossíntese, a assinatura isotópica resultante nos tecidos vegetais, se torna ainda mais depletada em ¹³C, processo este que não é o mesmo para todas as espécies de planta, pois o mesmo depende do tipo de ciclo fotossintético da espécie.

São três os principais ciclos fotossintéticos observados na natureza, como descrito por Smith e Epstein (1971), Ferreira (2008) e Kohn (2010): o ciclo de Calvin, o ciclo de Hatch-Slack e o ciclo de Metabolismo  cido das Crassuláceas (CAM). O primeiro   t pico das plantas denominadas C3, comumente espécies de regiões com temperaturas mais amenas. Neste ciclo, quando há absorção e fixação do CO₂, é formado um composto intermediário com três átomos de carbono. Alguns exemplos de alimentos deste grupo são a batata, arroz, feijão, o trigo e a soja. No ciclo de Hatch-Slack, das plantas C4, são formados compostos intermediários com quatro átomos de carbono. As espécies com este ciclo são t picas de regiões com clima tropical. Alguns exemplos incluem a cana-de-açúcar e o milho. Já as plantas CAM, como cactos e a baunilha, são mais comuns em climas áridos e apresentam ambos os ciclos das plantas C3 e C4 alternadamente, sendo o primeiro vigente durante o dia e o segundo no período noturno. Essas especificidades do ciclo metabólico fazem com que os

processos de fracionamento sejam diferentes de um grupo para o outro, portanto, as razões isotópicas desses vegetais são distintas, como resume a Figura 2, onde é possível observar um enriquecimento mais pronunciado em ^{13}C nas plantas C4.

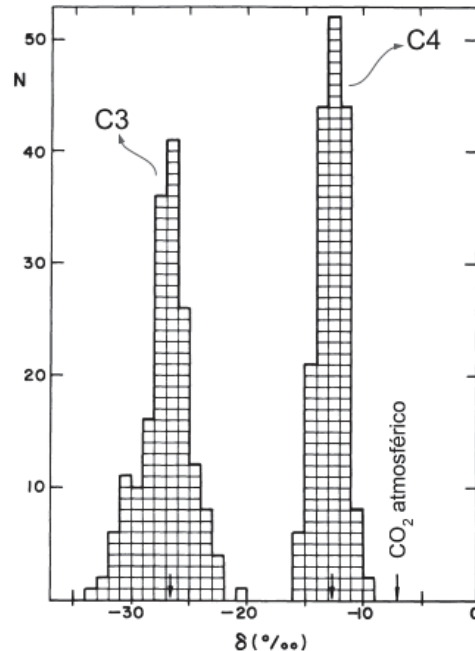


FIGURA 2 – Variação das assinaturas isotópicas do carbono em plantas de ciclo fotossintético C3 (-35‰ a -22‰) e C4 (-17‰ e -9‰). As plantas CAM, se representadas neste gráfico, ocupariam um *range* de -34 ‰ a -10‰. Adaptado de Vogel (1980).

É importante ressaltar que o ciclo metabólico não é o único fator de influência na assinatura isotópica de tecidos vegetais. Os estômatos presentes na estrutura foliar, quando fechados em situações de seca (stress hídrico) acabam por desencadear enriquecimento em ^{13}C em plantas C3 e empobrecimento deste isótopo em plantas C4 sob as mesmas condições. De qualquer forma, o processo de assimilação do CO_2 pelo vegetal vai definir sua assinatura isotópica, que será registrada nos animais que incluem estes alimentos em suas dietas. A Figura 3 exemplifica um modelo de assimilação do carbono por animais herbívoros a partir da ingestão de 50% de plantas C3 e 50% de plantas C4.

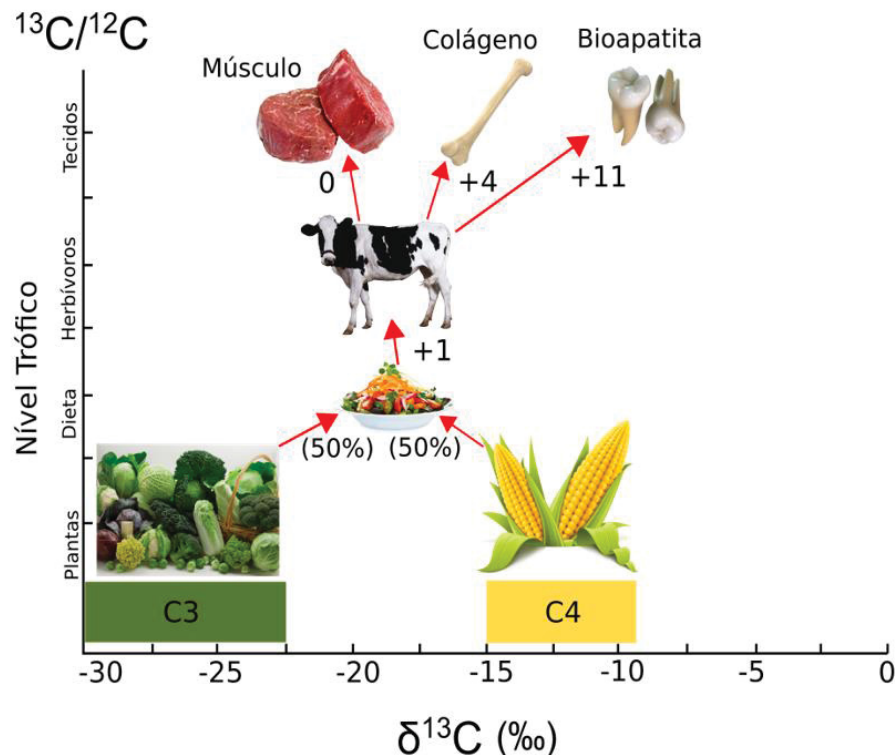


FIGURA 3 – Variação da assinatura isotópica do ^{13}C nos tecidos de animais herbívoros com dieta baseada em 50% de plantas C3 e 50% de plantas C4. Adaptada de Ferreira (2008).

2.2.2 CICLO DO NITROGÊNIO

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

De modo geral, há uma tendência a valores mais positivos de $\delta^{15}\text{N}$, em relação ao padrão N_2 atmosférico (que tem valor convencionado em 0‰), à medida que se dão as interações químicas nos organismos que compõem determinada cadeia trófica, em função da maior facilidade de eliminação do ^{14}N nos tecidos vegetais ou animais. A Figura 4 ilustra de maneira didática essa interação, onde é possível observar que indivíduos consumidores de alimento de origem animal possuem assinaturas isotópicas mais enriquecidas em ^{15}N que suas presas, ou seja, há uma sobreposição dos resultados dos processos de enriquecimento dos organismos no isótopo mais pesado, resultando em razões isotópicas significativamente mais positivas em espécies de topo de cadeia alimentar. Isso permite a caracterização de

especificidades nutricionais de animais, baseando-se nas assinaturas do nitrogênio em seus tecidos.

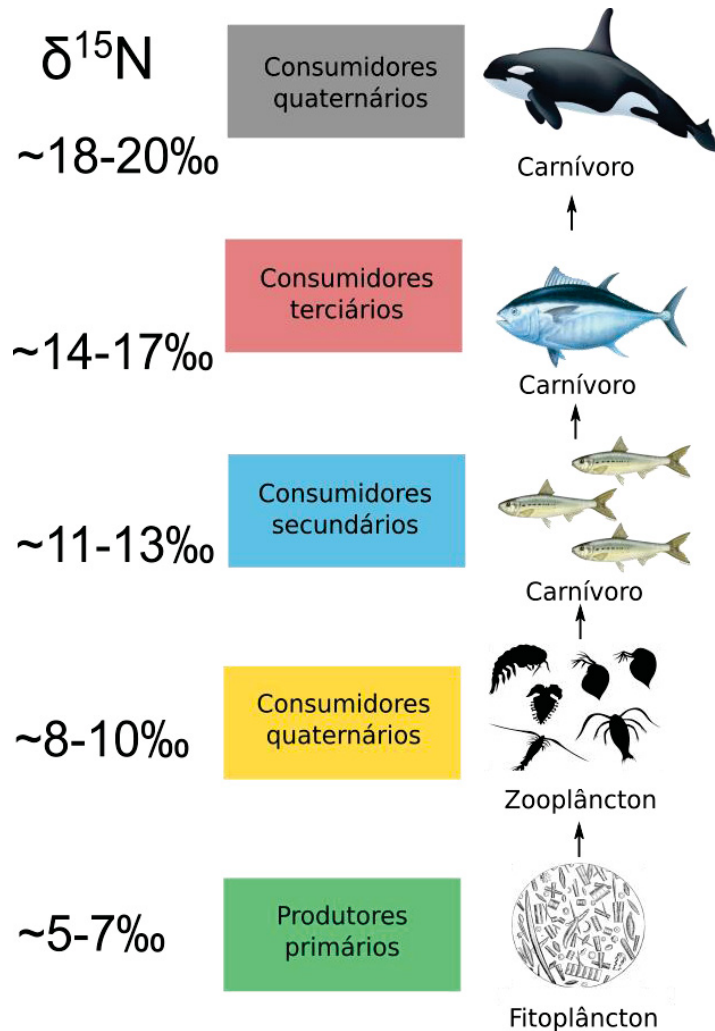


FIGURA 4 – Ilustração do aumento do valor da assinatura isotópica do ^{15}N em animais marinhos, de acordo com sua posição na cadeia alimentar. O mesmo comportamento é observado em animais carnívoros terrestres, quanto mais no topo da cadeia trófica estiverem. Adaptada de O'Brien (2015).

2.2.3 CICLO DO OXIGÊNIO

Elemento mais abundante na crosta terrestre, o oxigênio é encontrado sobretudo nas águas marinhas e meteóricas do planeta, associado ao hidrogênio. Estes dois elementos, portanto, apresentam o mesmo ciclo de fracionamento isotópico na natureza.

A origem dos estudos do padrão de variação da abundância dos isótopos de oxigênio no globo remonta a 1961, quando Craig verificou a existência de mudanças nos teores de ^{18}O em relação ao ^{16}O em amostras de diferentes lugares do mundo. Foi observada a maior abundância do isótopo mais pesado na região equatorial,

enquanto em localidades mais frias o ^{16}O apresentava-se em maior quantidade devido à maior facilidade de evaporação de moléculas de água com isótopos mais leves, fazendo com que, no equador, onde as temperaturas do ambiente são mais altas, as moléculas mais leves de H_2O sejam evaporadas mais rapidamente, desencadeando, nos oceanos, rios e lagos, a predominância de águas compostas por moléculas com isótopos mais pesados. Ao mesmo tempo, as moléculas com ^{18}O que alcançam a atmosfera precipitam mais facilmente por conta de sua massa maior, assim, as chuvas que alcançam latitudes mais frias ou regiões de maior altitude já se encontram bastante empobrecidas em oxigênio-18, como evidenciado na Figura 5.

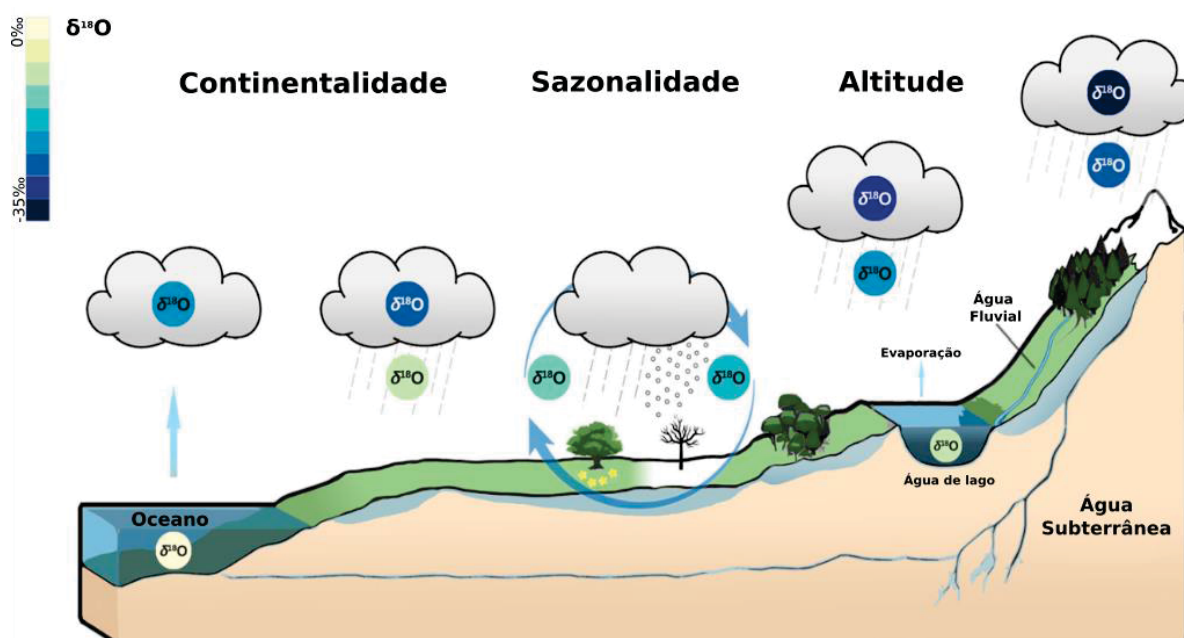


FIGURA 5 – Variação da assinatura isotópica de oxigênio em diferentes ambientes na natureza segundo os parâmetros de continentalidade, sazonalidade e altitude. Adaptado de Pederzani e Britton (2018).

Em resumo, as assinaturas isotópicas de amostras de água estão ligadas ao ciclo hidrológico, por sua vez dependente de fatores geográficos (Sulzman, 2007). A Figura 6 apresenta os valores $\delta^{18}\text{O}$ observados para a água meteórica em diferentes regiões, calculados em relação ao padrão V-SMOW (Vienna-Standard Mean Ocean Water), para o qual foi estipulado o valor de 0‰. Estes resultados, dependentes da latitude, altitude e continentalidade de uma determinada localidade, acabam assimilados pelo organismo de animais e plantas daquele ambiente, o que permite a correlação geográfica de suas assinaturas isotópicas de H e O.

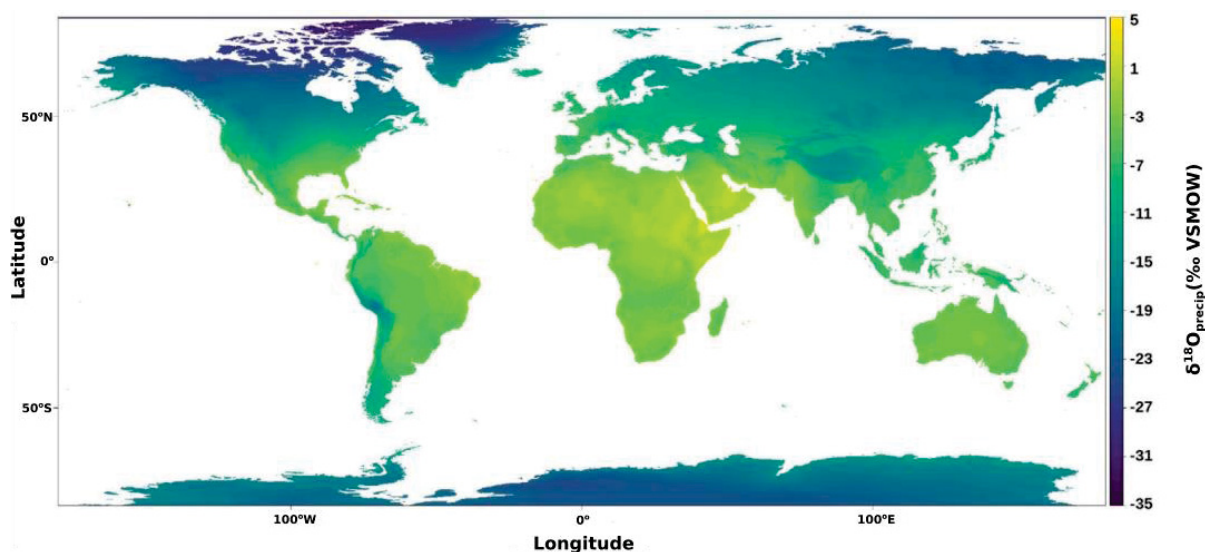


FIGURA 6 – Variação da assinatura isotópica de águas meteóricas no planeta. Mapa global de distribuição média de razões isotópicas de oxigênio-18 segundo dados do GNIP de 2017. IAEA/WMO. De Pederzani e Britton (2018).

2.3 Espectrometria de Massa de Razão Isotópica e ciência forense

Como descrito por Ehleringer e Matheson (2011), a espectrometria de massa de razões isotópicas pode ser utilizada no contexto forense para determinar se dois vestígios com mesma composição isotópica compartilham a mesma origem, bem como auxiliar na determinação da proveniência, fonte ou método de produção de uma amostra tendo como parâmetro bancos de dados do elemento de interesse. A lista de aplicações forenses da técnica analítica é extensa e inclui casos relacionados a bioterrorismo, contrabando de drogas, tráfico de animais, falsificação de fármacos, produção ilegal de material bélico, falsificação de notas e documentos, entre outros. De modo geral, por se tratar de uma técnica que permite a análise dos mais diversos tipos de material, a aplicação deste conhecimento em investigações criminais acaba podendo depender, em grande proporção, da perspicácia dos profissionais envolvidos no caso, considerando as perguntas que se busca responder, de modo a favorecê-los na identificação de características que demonstram que a AIE pode oferecer informações úteis acerca do material passível de análise isotópica no contexto em questão. Como apontado por Meier-Augenstein (2018), as ciências forenses são absolutamente dependentes da contextualização do caso, portanto os profissionais responsáveis pela aplicação de técnicas do gênero em exames periciais, devem assumir a responsabilidade de apresentar em seus laudos as interpretações confiáveis e a exposição de eventuais limitações das possíveis interpretações, por tratar-se de

assunto de natureza muitas vezes intangível a outros atores do processo de persecução penal, cujo entendimento errôneo pode conduzir a condenações ou absolvições injustas.

2.4 Espectrometria de Massa de Razão Isotópica aplicada à antropologia

Em estudos antropológicos, a AIE pode ser aplicada em diversas áreas, desde a antropologia social, arqueologia, até as aplicações forenses propriamente ditas, onde auxilia na identificação de restos humanos (Katzenberg e Krouse, 1989; Klepinger, 2006). Independentemente do fim, a maioria dos estudos se baseiam na análise de isótopos estáveis presentes nos tecidos humanos para determinação de proveniência geográfica e/ou hábitos de vida.

O corpo humano é composto por quatro tipos de tecidos: epiteliais, conjuntivos, musculares e nervosos, cada um caracterizado por um conjunto de especificidades morfológicas e funcionais (Gitirana, 2007; Souza, Medrado e Gitirana, 2010). Todos estes podem ser utilizados para obtenção de assinaturas isotópicas, porém, amostras de dentes e ossos (tecidos conjuntivos) e cabelos e unhas (derivados de tecidos epiteliais), são utilizados com maior frequência devido a sua maior estabilidade físico-química, que confere maior resistência a estes materiais. Ademais, estes apresentam diferentes taxas de crescimento e *turnover* isotópico no corpo humano, permitindo que o profissional que os estuda obtenha assinaturas isotópicas referentes a diferentes períodos de assimilação elementar da vida de um indivíduo. A taxa de *turnover* varia para cada tecido humano e pode ser compreendida como a velocidade que determinada razão isotópica ingerida pelo indivíduo será incorporada pelo organismo, e portanto detectável através da IRMS (Hobson e Clark, 1992; Martínez e Carleton, 2012; Davis e Munoz, 2016; Carter et al., 2019). A seguir, serão apresentadas informações acerca dos tecidos de maior interesse para o presente estudo: dentes, unhas e cabelos humanos.

2.4.1 DENTES HUMANOS

Além de componentes orgânicos como o colágeno (~40%), os dentes humanos (FIGURA 7) também são compostos pelo biomineral hidroxiapatita, fórmula

$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, que representa o principal composto inorgânico do órgão, apresentando em sua estrutura de 4 a 6% do íon poliatômico carbonato (CO_3^{2-}) (Leventouri et al., 2009) que ocorre em substituição ao fosfato (PO_4), resultando na composição $\text{Ca}_{4,5}[(\text{PO}_4)_{2,7}(\text{HPO}_4)_{0,2}(\text{CO}_3)_{0,3}](\text{OH})_{0,5}$ (Kubota, 2014)

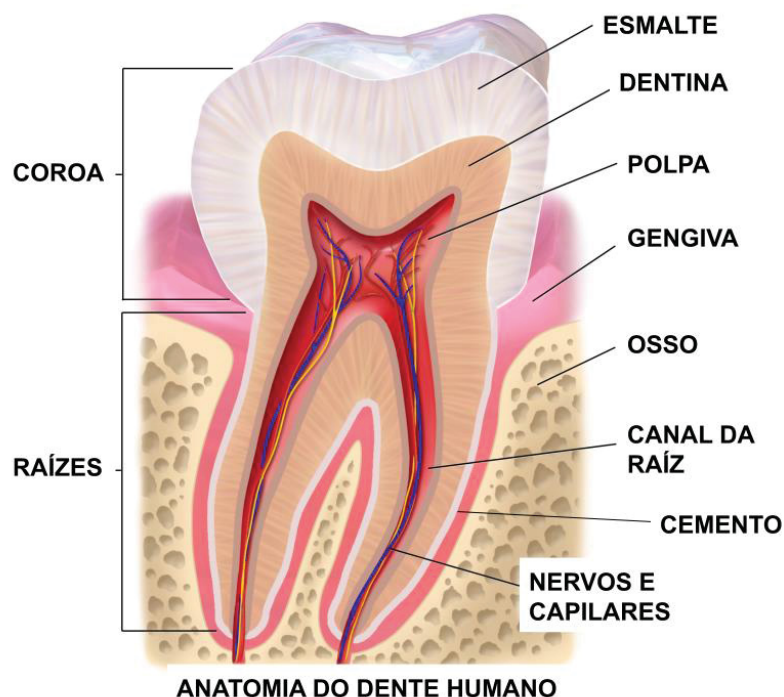


FIGURA 7 – Ilustração da morfologia de um dente humano, com indicação de cada componente. Adaptado de Blausen.com staff (2014). "Medical gallery of Blausen Medical 2014". WikiJournal of Medicine 1 (2). DOI:10.15347/wjm/2014.010. ISSN 2002-4436.

Anatomicamente, os dentes podem ser divididos em coroa e raízes, como indicado na Figura 7, e são compostos por esmalte, dentina, polpa e cemento. O esmalte é o tecido mais rígido do corpo humano e é composto por aproximadamente 95% de hidroxiapatita, que confere alta dureza ao material. A dentina, menos rígida, contém em torno de 70% de hidroxiapatita, proporção similar à do cemento, estrutura delgada presente na interface da raiz dentária com a gengiva e o maxilar ou mandíbula. A polpa, parte mais interior do dente, contém todas as terminações nervosas e capilares que mantém os dentes saudáveis.

A presença do ânion carbonato na estrutura da hidroxiapatita que compõe os dentes, como citado anteriormente, implica em variações morfológicas, afetando o índice de cristalinidade dos dentes que, quando determinado, possibilita inferências acerca da idade de um indivíduo (Souza, 2015). Sua presença também permite a aplicação da técnica de espectrometria de massa de razão isotópica (IRMS) para

obtenção da assinatura do C e O liberados com a exposição da molécula a ácido ortofosfórico, processo que será apresentado em maior detalhe adiante.

A taxa de *turnover* isotópico de dentes humanos é variável; estes órgãos, tanto em suas versões decíduas (dentes de leite) como permanentes, são produzidos e eclodem de maneira assíncrona durante a formação e crescimento do corpo humano, por isso, as assinaturas isotópicas de cada tipo de dente da arcada, decídua ou permanente, representam diferentes períodos da vida de um indivíduo.

Ao processo de formação dos dentes é dado o nome de odontogênese, dividida nas fases de dentinogênese (formação da dentina), primeira a ocorrer, e amelogênese, a formação do esmalte (Caruso et al., 2016). Ambos os processos são desencadeados por células responsáveis pela secreção de uma matriz proteica composta por moléculas hidrofílicas que atuam como “nucleadoras” na formação do biomíneral hidroxiapatita (Margolis et al., 2014). As células especializadas responsáveis pela secreção do material necessário para formação da dentina são denominadas odontoblastos enquanto as responsáveis pelo esmalte denominam-se ameloblastos (Silva e Alves, 2008). Após a formação do esmalte, os ameloblastos são consumidos, tornando o esmalte um material predominantemente inerte isotopicamente, com pouca atividade celular e por isso com assinatura isotópica fixa enquanto saudáveis. Já os odontoblastos se mantêm ativos na polpa dentária, fazendo com que haja uma lenta e constante reconstrução do material componente da dentina e que a mesma tenha suas assinaturas isotópicas modificadas ao longo da vida de um indivíduo, ainda que as taxas de *turnover* sejam bastante lentas. Em função disso, o esmalte de dentes decíduos é considerado um *proxy*³ isotópico das condições de vida intrauterina, enquanto em dentes permanentes registram as condições de vida até a idade máxima de 16 anos, período necessário para formação da coroa de terceiros molares, como apresentado na Tabela 2 a seguir, baseada em Ash e Nelson, 2003. A partir desta idade, o esmalte de nenhum dente passará por variações de suas razões isotópicas, salvo em caso de traumas físicos, como fraturas ou cáries, que podem vir a induzir o restabelecimento da atividade de ameloblastos.

³ Representante, em tradução livre.

TABELA 2 – Idade de formação da dentição permanente em humanos

<i>Dentes</i> <i>Etapas</i>	<i>Incisivos</i> <i>centrais</i>	<i>Incisivos</i> <i>laterais</i>	<i>Caninos</i>	<i>Primeiro</i> <i>pré-molar</i>	<i>Segundo</i> <i>pré-molar</i>	<i>Primeiro</i> <i>molar</i>	<i>Segundo</i> <i>molar</i>	<i>Terceiro</i> <i>molar</i>
Dentição superior (maxilar)								
Calcificação inicial	3 - 4 meses	10 - 12 meses	4 - 5 meses	1.5 - 1,75 anos	2 - 2.25 anos	Ao nascer	2.5 - 3 anos	7 - 9 anos
Coroa finalizada	4 - 5 anos	4 - 5 anos	6 - 7 anos	5 - 6 anos	6 - 7 anos	2.5 - 3 anos	7 - 8 anos	12 - 16 anos
Raiz finalizada	10 anos	11 anos	13 - 15 anos	12 - 13 anos	12 - 14 anos	9 - 10 anos	14 - 16 anos	18 - 25 anos
Dentição inferior (mandibular)								
Calcificação inicial	3 - 4 meses	3 - 4 meses	4 - 5 meses	1.5 - 2 anos	2.25 - 2.5 anos	Ao nascer	2.5 - 3 anos	8 - 10 anos
Coroa finalizada	4 - 5 anos	4 - 5 anos	6 - 7 anos	5 - 6 anos	6 - 7 anos	2.5 - 3 anos	7 - 8 anos	12 - 16 anos
Raiz finalizada	9 anos	10 anos	12 - 14 anos	12 - 13 anos	13 - 14 anos	9 - 10 anos	14 - 15 anos	18 - 25 anos

As informações acerca do processo e tempo de formação de dentes humanos é de suma importância para que seja feita uma boa preparação das amostras do tipo e seja realizada uma boa interpretação dos dados obtidos a partir dessas matrizes.

2.4.2 CABELOS E UNHAS HUMANOS

Cabelos (FIGURA 8) e unhas humanas (FIGURA 9) são tecidos derivados da epiderme, formados a partir da compactação e queratinização de células mortas da pele, apresentando em sua composição sobretudo a queratina, uma proteína secundária sintetizada pelo próprio corpo, portanto sendo caracterizados como materiais totalmente orgânicos que podem ser utilizados como provedores de assinaturas isotópicas recentes devido à rápida taxa de *turnover* destes tecidos (Fraser et al. 2006). Ademais, são ambos totalmente inertes, não passando por quaisquer modificações químicas após sua formação (LeBeau et al., 2011; Williams et al., 2011).

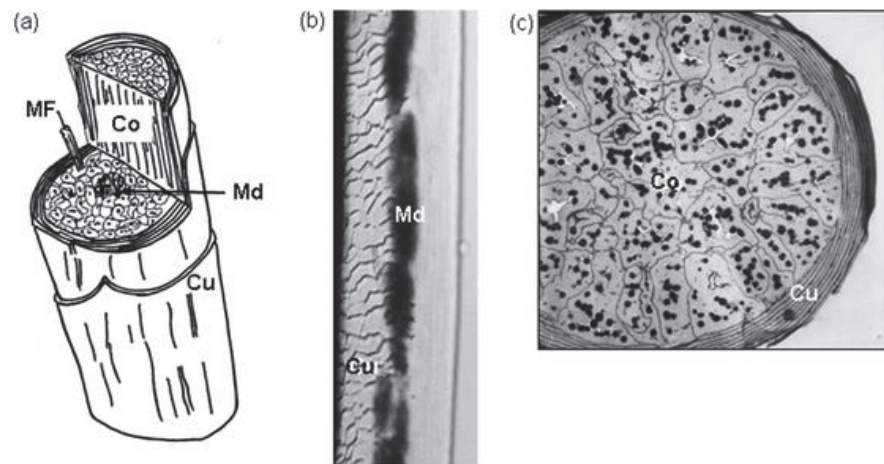


FIGURA 8 – Anatomia do fio de cabelo humano. (a) Ilustração com principais elementos: MF: microfibril; Co: Córtex; Md: Medula; Cu: Cutícula. (b) Vista longitudinal em microscópio. (c) Seção transversal em microscópio, por Tobin (2006).

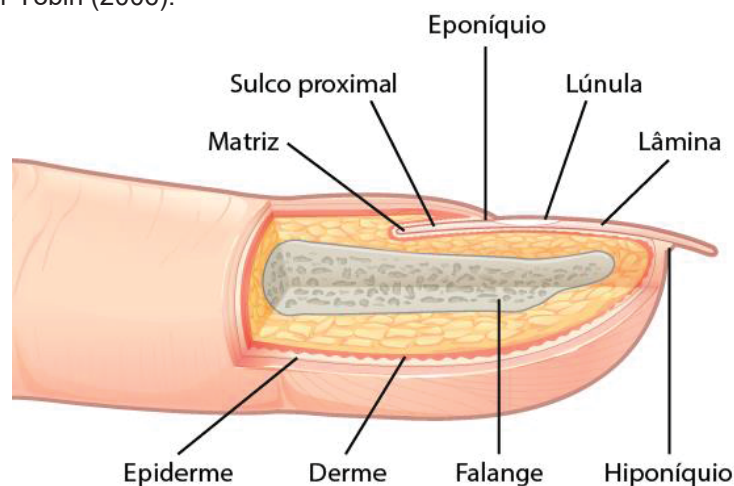


FIGURA 9 – Anatomia da lâmina ungueal humana. A matriz constitui a parte da unha a partir da qual células mortas queratinizadas são compactadas, adquirindo a estrutura foliar que compõe as unhas. Adaptado de Openstax CNX por Boaventura (2016).

2.4.3 TRABALHOS ANTERIORES

A aplicação do estudo de razões isotópicas em antropologia é bastante recente. Foi a partir do início dos anos 70 que a importância arqueológica desse tipo de análise passou a ser reconhecida (Tykot, 2006), só então a aplicação deste conhecimento para determinação da origem geográfica de restos humanos foi possibilitada. Em termos de aplicações forenses, nos últimos 15 anos a divulgação de investigações criminais nas quais as análises de isótopos estáveis em tecidos humanos foram utilizadas com sucesso, corroboram a necessidade do desenvolvimento da técnica no Brasil. Alguns exemplos destes casos são o assassinato de uma mulher ocorrido em Mammoth Lakes, nos Estados Unidos, em 2003 (Dostie, 2007) e o assassinato de Kenyan Noor em Dublin, Irlanda, em 2005 (Meier-Augenstein, 2007). Em ambos os

casos, foram realizadas análises de isótopos estáveis em amostras de ossos, dentes, cabelos e unhas, e os resultados permitiram a determinação da procedência geográfica dos indivíduos e uma estimativa do tempo de residência na região onde seus corpos foram encontrados, visto que as análises permitiram concluir também que, em ambos os casos, as vítimas haviam emigrado de seus países de origem após a idade adulta. Chesson et al., no livro *Treatise on Geochemistry*, de 2014, descreve a aplicação do estudo de razões isotópicas de carbono, nitrogênio, oxigênio e hidrogênio em antropologia forense. Estes elementos, como já apresentado, são os mais abundantes no corpo humano, portanto as razões isotópicas destes são os principais alvos da aplicação da AIE em estudos antropológicos. C e N são assimilados ao organismo através da dieta, portanto possibilitam a obtenção de informações sobre hábitos alimentares específicos de um indivíduo, como, por exemplo, se a mesma é composta predominantemente por alimentos de origem animal ou vegetal, ao passo que os valores para oxigênio e hidrogênio, assimilados aos tecidos humanos a partir das fontes de hidratação, oferecem indicações sobre sua origem geográfica.

Em 2016, foi apresentado por Someda et al. um trabalho onde os resultados de razões isotópicas de C e O de esmalte dentário permitiram a distinção entre dois grupos de pessoas, um de origem americana, outro de origem japonesa. Já no Brasil, existem trabalhos publicados voltados para a análise de isótopos estáveis em unhas humanas para obtenção de informações sobre hábitos alimentares de populações específicas, avaliando a possibilidade de distinção entre grupos de diferentes níveis socioeconômicos (Gragnani et al., 2013), de caracterização de padrões de dieta através da análise de unhas humanas (Nardoto et al., 2006) e também a mudança do padrão de dieta de indivíduos provenientes de áreas rurais, pequenas vilas e grandes cidades na Região Amazônica (Nardoto et al., 2011). Estes são exemplos recentes de aplicação da técnica, onde são apresentados resultados bastante favoráveis, que permitiriam enriquecer cientificamente eventuais investigações criminais relacionadas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os métodos adotados no presente estudo variaram de acordo com o tipo de material amostrado. Dentes humanos, como supracitado, são caracterizados como biominerais (Perry et al., 2007) e, para obtenção das assinaturas de ^{13}C e ^{18}O , são submetidos a processo de digestão em meio ácido da bioapatita que os compõem. Para isso, a amostra, depois de limpa em água deionizada e seca em temperatura ambiente ou em estufa, deve ser pulverizada. Para tanto, dois métodos distintos foram utilizados, a pulverização com panela de tungstênio em moinho de disco e a pulverização utilizando microdrill com ponteira diamantada.

Todos os dentes analisados foram doados por pacientes ao Banco de Dentes da Faculdade de Odontologia da UFPR mediante preenchimento de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que descreve que as amostras serão utilizadas para fins científicos, com anuência do doador. Após a doação, as amostras foram então cedidas ao Laboratório de Análise de Minerais e Rochas (LAMIR) que, assim como o Banco de Dentes, conta com cadastro na Plataforma Brasil (nº 485952.15.0.0000.0020) que autoriza a realização de análise de tecidos humanos.

Cada amostra recebeu um código de identificação para garantir que os doadores voluntários se mantivessem anônimos. Os critérios para seleção das amostras doadas foram baseados no estado de preservação do dente, selecionando apenas amostras hígdas, sem quaisquer cavidades ou restaurações. Ademais, optou-se por amostras de doadores que se dispuseram a fornecer o maior número de informações pessoais possíveis acerca de aspectos que poderiam auxiliar na interpretação das assinaturas isotópicas obtidas, incluindo idade, sexo, residência na época da extração e residência durante a infância.

Todos os dentes foram analisados no espectrômetro de massa Delta V Advantage® da Thermo Scientific em configuração online utilizando o preparador GasBench II®, para obtenção do $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{18}\text{O}$. As análises foram realizadas em CO_2 liberado a partir de digestão das amostras a 72°C em ácido ortofosfórico por 6 horas em *vial* de 11 mL. Para todas as análises foram utilizados aproximadamente 0,3 – 0,35 mg de amostra pulverizada e a cada lote destas (com até 28 vials) foram

analisados 4 padrões certificados, intercalados entre as mesmas para garantir o controle de qualidade ao longo de toda a sequência analítica. Os padrões certificados adotados foram NBS 19, IAEA-CO-1, IAEA-CO-8 e IAEA-CO-9, com composição isotópica conhecida, normalizados na escala VPDB. Foram analisados 10 dentes, a partir dos quais foram obtidos um total de 56 assinaturas isotópicas.

As amostras de cabelo e unhas humanas, totalmente orgânicas, passaram por procedimento analítico diferente das amostras biominerais. Ambas foram submetidas a limpeza em solução desengordurante de clorofórmio e metanol (2:1 v/v) por duas horas, com intervalo de 20 minutos para enxágue com água deionizada e troca da solução. Após este processo, as amostras permaneceram em estufa a 50°C para secagem por 15h. Já secas, foram, cortadas, pesadas (aproximadamente 700µg de cada amostra) e depositadas em cápsulas de estanho, inseridas no analisador elementar do espectrômetro de massa Delta V Advantage® onde foram transformadas em gás através de processo de combustão a 1.050°C. O sistema de espectrometria de massa de razão isotópica caracterizou-se por fluxo contínuo CF-IRMS (online) utilizando um analisador elementar (EA) de CHN, modelo Flash 2000 da Thermo Scientific®, acoplado ao IRMS por meio da interface Conflo IV.

Paralelamente, foram analisadas as tinturas utilizadas na preparação do experimento relatado no segundo artigo apresentado na próxima seção. Para estas, a única preparação envolveu a secagem do material a 50°C por 15 horas, sendo pesadas em torno de 1000µg de cada amostra nas cápsulas de estanho que procederam à análise como as amostras orgânicas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

STABLE ISOTOPE ANALYSIS OF HUMAN TEETH: ANALYTICAL PROCESSES AND INTERPRETATIONS

Taís Ribeiro Muniz^{1,2*}, Ricardo de Oliveira Mascarenhas^{1,3}; Diego Portela Fernandes¹; Vladimir Eliodoro Costa⁴; Anelize Manuela Bahniuk Rumbelsperger¹

¹ *Laboratory of Mineral and Rock Analysis (LAMIR), Department of Geology, Federal University of Paraná, PO Box 19062, 81531-980, Curitiba, PR, Brazil.*

² *Brazilian Federal Police, National Institute of Criminalistics, Setor Policial Sul, Lote 7, 706710-902, Brasília, DF, Brazil.*

³ *Brazilian Federal Police, Technical-Scientific Sector, R. Sandália Monzon 210, 82640-040, Curitiba, PR, Brazil.*

⁴ *Stable Isotopes Center (CIE), Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP), 18618-689, Botucatu, SP, Brazil.*

* *Corresponding author (e-mail: taisrmuniz@outlook.com ORCID iD 0009-0009-4281-9528)*

ABSTRACT

The stable isotope analysis of human tissues has become widely studied due to its potential as an information provider regarding human provenance and nutritional habits. Nonetheless, few of those studies evaluate and discuss the results for human dentin and enamel specifically regarding analytical procedures and how pulverization methods may influence the isotopic ratios of the samples, as well as the influence of cosmetic dyes in human hair. In this study, with isotopic ratio mass spectrometry (IRMS) we established the variation of carbon and oxygen isotopic signatures of human teeth, assessing the influence of pulverization depending on the pulverization method, as well as the influence of hair dyes in the determination of stable isotope signatures of carbon and nitrogen. The different methods for pulverizing tooth samples from the same individual indicate a difference in the isotopic composition for each sample depending on the adopted procedure. This promotes a better understanding of the importance of enamel pulverization from its outermost (cuspal) part and the dentin from the innermost, apical, portion (roots), both with microdrilling devices under slow rotation. The results provide information and promote guidelines in the process of adjusting analytical procedures for both anthropological or forensic purposes, while also enabling a more accurate interpretation of obtained values, as well as contributing to the building of isotopic national and worldwide databases.

KEYWORDS: CARBON; NITROGEN; OXYGEN; SAMPLE PREPARATION; FRACTIONATION

1 INTRODUCTION

The bulk stable isotope analysis (BBSIA) for isotope ratio determination can be used for a multitude of purposes, including human provenancing and dietary preferences determination, which can be useful in forensic anthropology. In this context, it allows the determination of a possible geographical origin of human corpses and remains as well as their previous nutritional habits, which can be extremely valuable information in cases of human identification where classic techniques, such as DNA profiling and fingerprint identification, cannot be properly utilized (Bartelink et al., 2016).

The available stable isotopes in the various tissues that comprise the human body are derived from sources of nutrition and hydration and are assimilated by the organism of individuals through biochemical processes (Tykot, 2004; Chesson et al., 2014). Assimilation allows, based on the interpretation of isotopic ratios of human tissues (obtained after analysis in a mass spectrometer), the geographic correlation of these values and the determination of specificities of the individual's life habits, which may come to assist in the process of identification (Meier-Augenstein and Fraser, 2008; Meier-Augenstein, 2018).

The tissues that constitute the human body are formed by groups of cells with specific functions, which can be classified into four types, among them epithelial tissues, from which the epidermis, nails and hair derive, and conjunctive tissues, from which human teeth derive (Ross and Pawlina, 2016). The carbon and nitrogen isotopes that comprise these tissues are derived from diet components, while the oxygen and hydrogen isotopes are derived from direct and indirect water sources. Based on this premise, the isotopic ratios in human tissues, both organic (skin, hair, nails, etc.) and biomineral (tooth enamel and dentin as well as bones), can vary according to the singularities of the individual's nutritional habits and their origins (Katzenberg and Krouse, 1989). A limitation of the application, however, may occur due to triggering of isotopic fractionation processes due to the influence of external factors or those directly linked to the analytical procedure, which would result in the low reliability of the obtained isotopic signatures. If this influence were to be confirmed, the determination of an individual's geographic origin and specificities of his or her life habits would be impaired (Fraser et al., 2008), as the values would be linked to secondary factors that would hinder the data interpretation within the scope of criminal expertise and anthropological research.

There are several publications worldwide that describe the process and outcomes of criminal investigations solved in part due to the contribution of results obtained from isotope ratio mass spectrometry (Schwarcz and Walker, 2006; Rauch et al., 2007; Font et al., 2015; Lehn et al., 2015). As well as various researches that rely on BSIA for general anthropological

findings and public policies development (Fraser et al. 2006; Dostie 2007; Valenzuela et al., 2012; Gragnani et al. 2013; Bartelink et al. 2016; Someda et al. 2016). However, fewer studies such as Snoeck and Pellegrini (2015), Pellegrini and Snoeck (2016) and Ventresca Miller et al. (2018), are dedicated to the evaluation and determination of ideal analytical protocols when it comes to applying the technique with modern human samples, for forensic purposes or not, and that meticulously address the various variables that can influence the process of assimilation of the isotopes of an element by the human body, as well as intrinsic aspects of the analytical procedures that can alter the original isotopic composition of analysed samples. The complete understanding and mitigation of the effects of these variables is an extremely important step for the correct interpretation of this type of data and, therefore, represents a great challenge for the correct establishment of protocols to determine a probable “isotopic profile” of an individual with the aid of BSIA.

The present work was motivated by the possibility of contributing to the consolidation of proper adoption of BSIA with human remains, specially by forensic experts, requiring the best of analytical practices due to the implications of the usage of BSIA in courts (Dunn and Carter, 2018; Ehleringer and Matheson, 2011), hence the need for establishment of suitable analytical procedures based on performed experiments with human teeth and hair samples, target materials for investigations within the scope of forensic anthropology.

The study was developed with the general objective of understanding patterns of induced fractionation of carbon and oxygen isotopes of human teeth bioapatites, in order to define ways to prevent these fractionations from being occasionally triggered throughout the analytical procedure.

2 MATERIALS AND METHODS

From the analysis of human teeth samples of three individuals with known background, isotopic carbon and oxygen signatures were determined in order to evaluate eventual changes due to the adoption of two different pulverization methods, based on the premise that they could influence the final result.

This study did not aim to determine the geographic origin of the analysed samples as their origin was previously informed, nor to interpret nutritional preferences, but rather to assess the reliability of specific analytical methods for these purposes.

Seeking to contribute to the solution of the aforementioned questions, the analyses described in this paper were carried out following specific procedures based on the hypothesis

that those could trigger controlled isotopic fractionation processes, easily identifiable when comparing the results for the same samples.

Isotopic fractionation processes are key for the use of BSIA in forensic anthropology (Reitesema, 2015), but one of the prerequisites is that there is a preponderance of the fractionation processes triggered *in vivo*, that is, inside the individual's body, therefore reflecting their life habits. Preliminary results obtained from the analysis of human teeth, suggest that there is the possibility of distinguishing isotopic signatures of teeth from different Brazilian regions (de Oliveira Mascarenhas et al., 2022), information of paramount importance in criminal investigations. However, even when confirming that there is a preponderance of the influence of internal factors, directly responsible for enabling the determination of a probable geographical origin and nutritional preferences of an individual by evaluating the results and comparing it to worldwide literature, it cannot be disregarded that external factors may play a role in the isotopic abundances of a sample, which would make the interpretation more challenging. Due to that, experiments are needed in order to evaluate the reliability of the analytical procedures that have been adopted up until now, in order to guarantee that the procedure itself would not be influencing the resulting isotopic signatures. Based on that, the present research was developed to evaluate the possibility of modifying the carbon and oxygen isotopic signature of human teeth due to the adoption of different pulverization techniques.

All analysed teeth samples were donated by patients to the Dental Bank of the Faculty of Dentistry at the Federal University of Paraná in the south of Brazil, by filling out an Informed Consent Form that described that the samples were to be used for scientific purposes, with the donor's consent. The samples were then transferred to the Laboratory of Mineral and Rock Analysis where the analyses took place after approval by an ethical committee. Each sample was assigned an identification code to ensure that voluntary donors were kept anonymous. The criteria for selecting donated samples were based on the state of preservation of the tooth, selecting only healthy samples, without any cavities or fillings, and samples for which the donors provided as much information as possible, including age, biological sex, residence at the time of extraction and residence during childhood, as well as general dietary patterns. The choice for information regarding state and city of residence during childhood is based on the premise that the dental enamel has an isotopic signature that corresponds to the period of its mineralization, hence during childhood or adolescence, and that this value is not modified throughout the individual's life, unlike human dentin and bones (Meier-Augenstein, 2018).

The received teeth were washed in deionized water and dried at room temperature (20 °C to 25 °C) for at least 24 hours in individual glass containers arranged inside the laboratory

chapel. After cleaning and drying, the samples were then pulverized and proceeded to analysis in a Thermo Scientific™ Delta V Advantage™ mass spectrometer in online configuration using GasBench II™, to obtain $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{18}\text{O}$ with the Isodat™ software suite. The analyses were performed in the CO_2 released from the digestion of the samples at 72°C in orthophosphoric acid for 6 hours in an 11 mL vial. This period was determined experimentally as it was shown that at least 6 hours were necessary to open the crystalline structure of the dental hydroxyapatite ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) which contains around 4% to 6% of carbonate in its crystalline structure (Leventouri et al., 2009). Approximately 0.30 - 0.35 mg of pulverized sample was used for each analysis and after each sequence of 28 samples, four certified standards were also analysed, interspersed between the 28 vials, to ensure quality control throughout the analytical routine. The certified standards were NBS 19, IAEA-CO-1, IAEA-CO-8 and IAEA-CO-9, all with a known isotopic composition, acquired through the International Atomic Energy Agency (IAEA), which markets the reference products. All of the results were presented in permil notation (‰), VPDB scale, according to the well-established equation $\delta^h\text{E}_{\text{sample/standard}} = ((\text{R}_{\text{sample}}/\text{R}_{\text{standard}}) - 1)$, where E is the element in question for a given sample, R being the isotope ratio of E for the sample or the standard and h the mass of the heavier isotope for a given element (Meier-Augenstein, 2018). The results are presented in 2D scatterplots and the data was also subjected to Hierarchical Cluster Analysis (HCA), ANOVA and MANOVA with MINITAB™ 14.

The material comprised seven third molars from three different individuals. Each tooth was longitudinally cut in half and each half was analysed three times, totalling two enamel results from the outermost portion of the crown and four results from the dentin: two from the dentin-enamel interface, in the medial portion, and two results from the roots (Figure 1). In summary, 7 teeth were analysed, 14 halves, from 3 different sites, totalling 42 results.

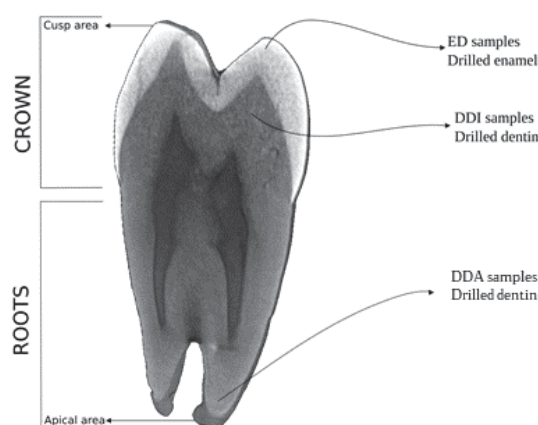


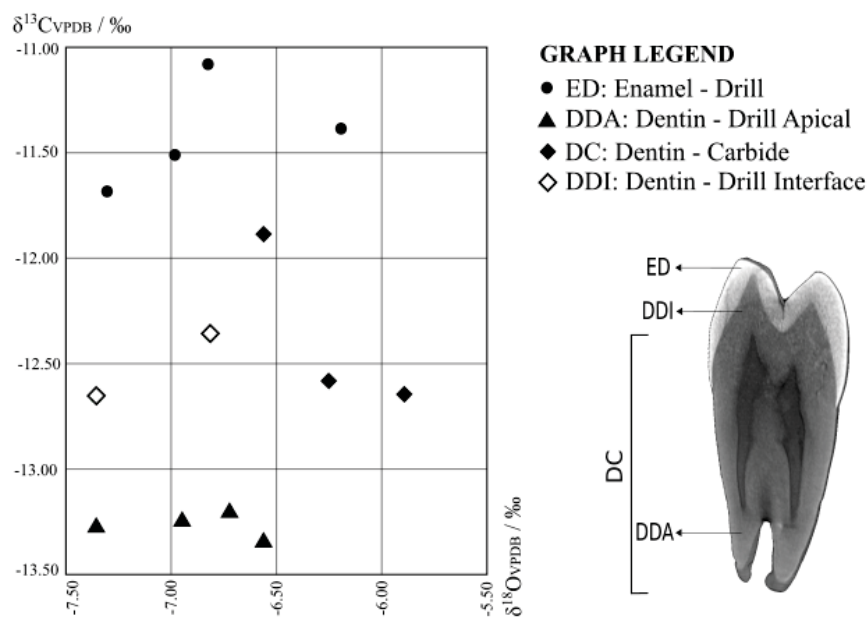
Figure 1 - Scheme indicating the selected site for tooth sampling. ED samples were obtained with microdrill at the crown end. DDI samples are from distal dentin, adjacent to the enamel. DDA samples were obtained with

microdrill from proximal dentin, at the root portion, in the apical area. The DC samples comprise those obtained by pulverizing the entire dentin, after enamel removal with microdrill (bulk dentin). Teeth image captured with a SkyScan Micro-CT.

3 RESULTS

The following graphs (Figures 2, 3 and 4) present the results for individuals H20, H21 and M25. The samples were pulverized either with a microdrill from the presented sampling sites or in a tungsten pan in a disc mill, from three different portions of the tooth, as previously explained.

A



B

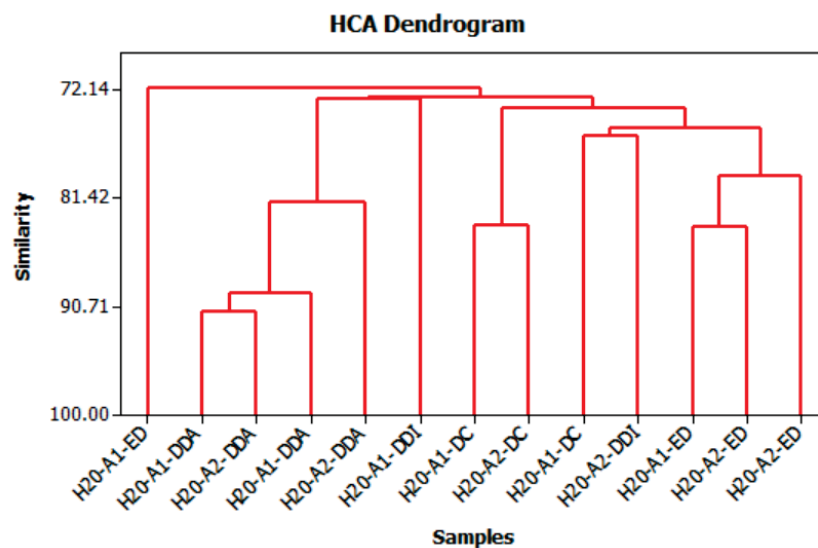
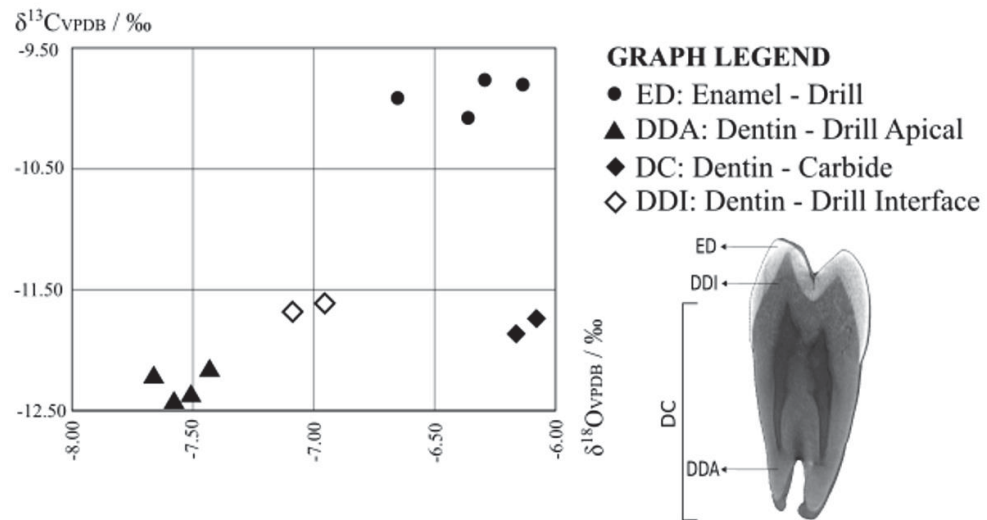


Figure 2 – A: Scatterplot representing the results for samples from individual H20. B: HCA resulting dendrogram.

A



B

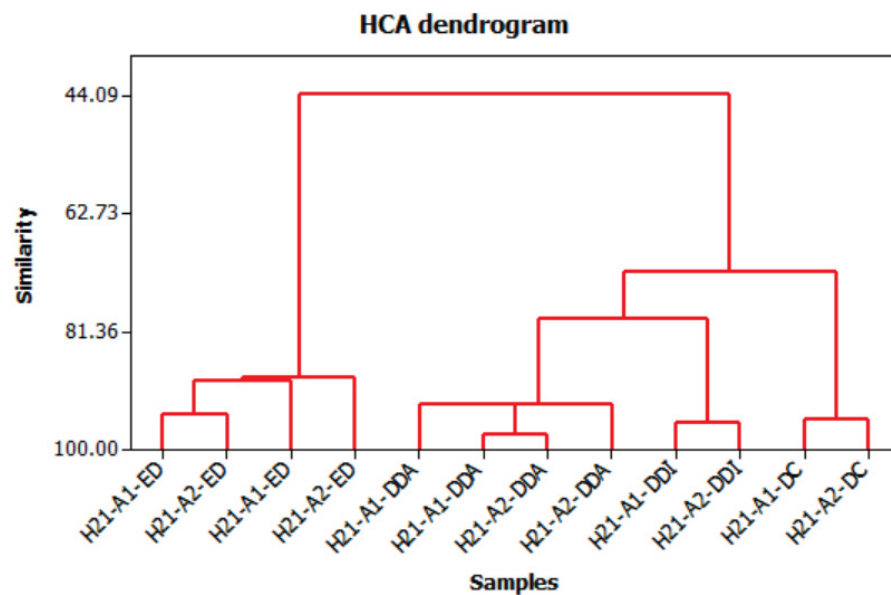


Figure 3 – A: Graph showing the results obtained from the analysis of teeth samples from individual H21. B: HCA resulting dendrogram.

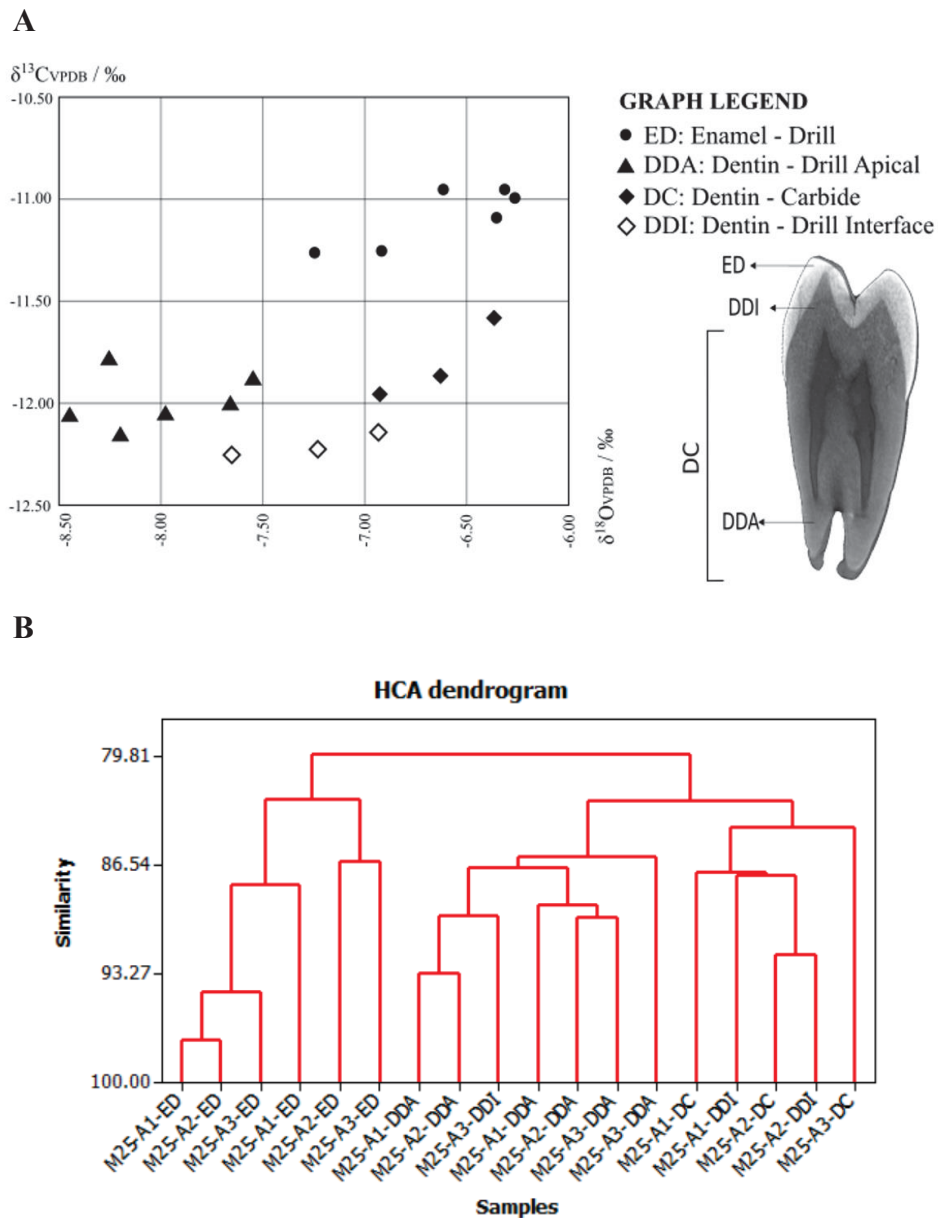


Figure 4 – A: Result obtained from three teeth of individual M25. B: HCA resulting dendrogram.

A one-way ANOVA was conducted for both $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{18}\text{O}$ of dentin samples DDA, DDI and DC, to determine if their values are actually distinguishable from each other, as presented in Table 1. A statistically significant difference for $\delta^{18}\text{O}$ was observed for individual H20 only, ($p = .066$). MANOVA was performed to evaluate the individualization of different dentin preparation procedures based not only in each stable isotope signature separately, but for $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{18}\text{O}$, simultaneously. Individualization of dentin groups was statistically significant for all three individuals (no p values greater than .05).

Table 1 – ANOVA and MANOVA results of teeth samples data analysis.

ANALYSIS	H20	H21	M25
ANOVA $\delta^{13}\text{C}$	F (2, 6) =	F (3, 8) =	F (2, 9) = 6.58
	11.37, p = .009	304.19 p = .000	p = .017
ANOVA $\delta^{18}\text{O}$	F (2, 6) =	F (3, 8) =	F (2, 9) =
	4.42, p = .066	59.93, p = .000	16.77 p = .001
MANOVA	Pillai's Trace	Pillai's Trace	Pillai's Trace
	1.2671 F 5.186 p = 0.012	1.8597 F 33.135 p = .000	1.4011 F 10.527 p = .000

4 DISCUSSIONS

From the graphs, heterogeneities in the isotopic composition of human dentin can be observed, judging by the intermediate results between ED and DDA. Overall, based on the dendrograms, it is possible to observe that ED samples are usually presented in separate clusters from the dentin samples, except for individual H20, for which ED samples share a greater similarity with DDI and DC samples. For all individuals, samples DDI and DC are presented with more similarity with each other than DDA samples.

From the boxplots in Figures 5 A and B, it is possible to observe that individual H20 presents a considerable variation in the carbon isotopic signature in the roots of their teeth in relation to those observed from the enamel results, reaching almost a 2‰ difference, indicating a possible change from childhood eating patterns. The oxygen isotopic signatures, in turn, remained stable, with most values within a range of 1‰ variation, possibly indicating that the individual did not migrate to a considerably further location from its place of origin until the teeth extractions.

Individual H21 presents a similar pattern for both carbon and oxygen, varying in the order of 2.5‰ and 1.5‰, respectively. Less overlapping results indicate not only the change in dietary pattern but also in geographic location. Once again, intermediate results are observed between enamel and apical dentin, indicating heterogeneity and, specifically for carbide pulverization (DC), possible mixing.

In the last graph, with results for M25, carbon signatures are in a range of less than 1.5‰ whilst a 2‰ range for oxygen can be observed, indicating little dietary variation throughout life and a possible migration to another location. Once again, intermediate values are observed as in the previous cases.

As aforementioned, no statistically significant difference for all three individuals, for both $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{18}\text{O}$, was observed, except for individual H20 $\delta^{18}\text{O}$ values (p = .066), which

could be a result from geographical location homogeneity from infancy until teeth extraction, as hypothesized.

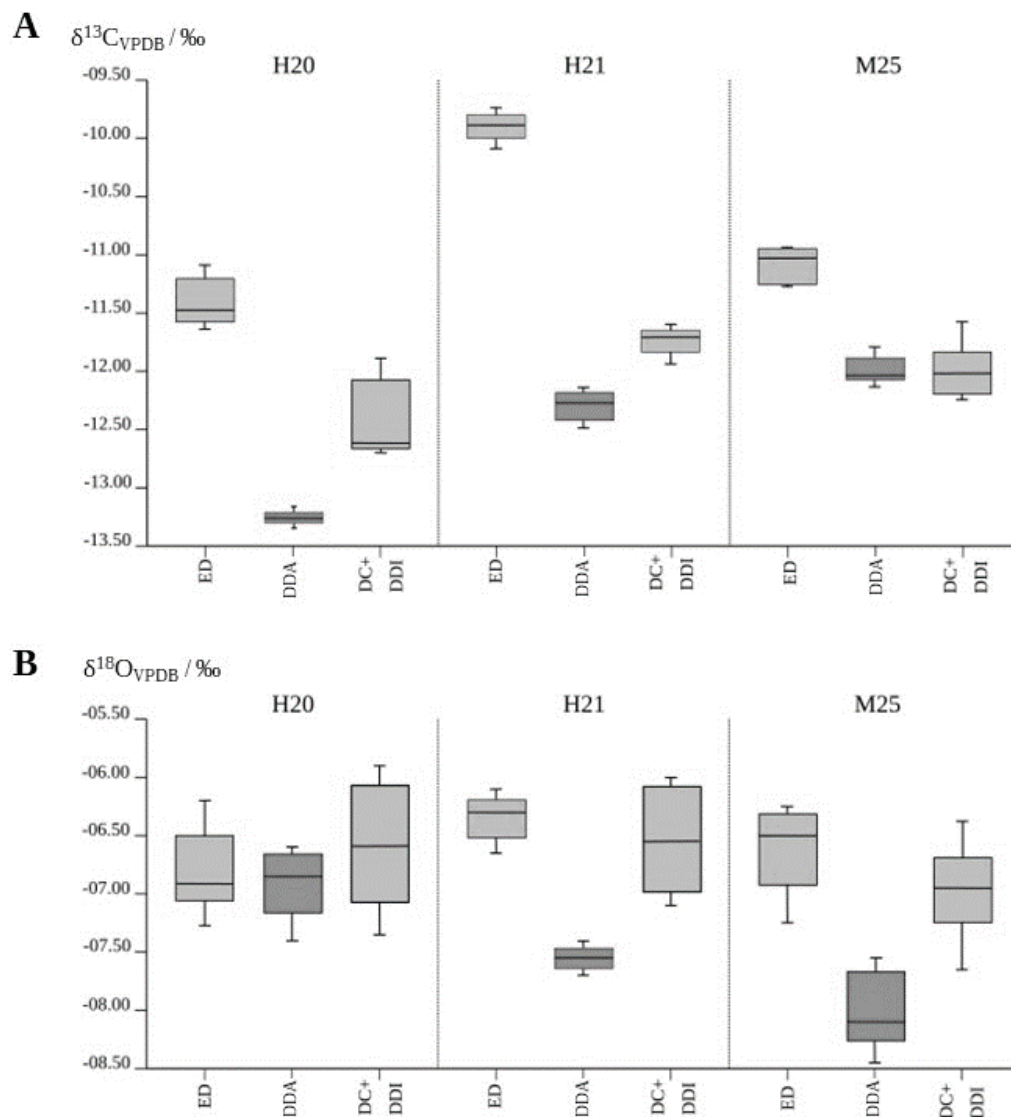


Figure 5 – (A): Boxplots presenting variations in carbon isotopic signatures of teeth samples from three individuals. Individual H21 showed the greatest variation, indicating a possible change in diet. (B): Boxplots presenting variations in oxygen isotopic signatures. It is noticeable that the results of individual H20 overlap, indicating a probable fixed location of residence from childhood until teeth extractions in adulthood.

It is worth noting that the behaviour observed from DC results (tungsten pan pulverization of entire dentin) was expected, considering the method's less precision when comparing it to microdrill pulverization. Due to this, in a case in which the pan is chosen as preferred pulverization method, the complete separation of enamel and dentin is mandatory, as the two isotopic compositions may mix, affecting the results. In general, a greater similarity is observed between DC and interface dentin.

5 CONCLUSIONS

The importance of separately pulverizing enamel and dentin became clear, as they present different isotopic signatures depending on the nutritional habits and geographical location variations throughout the individual's life. For that reason, pulverization using a microdrill device must be favoured, as it promotes more precision, preventing unwanted mixing and contamination, though it is worth noting that slower rotation velocities are necessary in order to prevent the impact of increased temperatures, which may lead to isotopic fractionation. In case of human dentin analysis, statistically significant differences in values for each pulverization method suggest sampling from the roots should be prioritized, as the results present less superposition with more intermediate values of DDI and DC samples, possible due to apical dentin regions representing the individual's most recent habits and place of origin. Dentin results from portions close to enamel may present intermediate values between the two materials, as observed, due to heterogeneities. Pulverization in a tungsten pan homogenizes the isotopic composition of the entire, possibly heterogeneous, dentin and is therefore unsuitable for a reliable interpretation.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Mineral and Rock Analysis Laboratory (LAMIR) of the Federal University of Paraná, Dr. Thiago Gomes da Silva, Dr. Bruno Barros Cunha, Ivan Arthur Bindo and Prof. Ricardo and Idalina from the university's Teeth Bank.

REFERENCES

- Bartelink E.J., Mackinnon A.T., Prince-Buitenhuis J.R., Tipple B.J., Chesson L.A. (2016). Stable Isotope Forensics As An Investigative Tool In Missing Persons Investigations. In: S.J. Morewitz, C. Sturdy Colls (Eds.), Handbook Of Missing Persons, Doi 10.1007/978-3-319-40199-7_29 P. 443-462.
- Chesson L.A., Tipple B.J., Howa J.D., Bowen G.J., Barnette J.E., Cerling T.E. E Ehleringer J.R. (2014). Stable Isotopes In Forensics Applications. In: Holland H.D. E Turekian K.K. (Eds.) Treatise On Geochemistry. 2a Ed., Vol. 14. Elsevier, Oxford, P. 285-317.
- Dostie P. (2007). Case Number 03-0929: Murder In Mammoth Lakes. Forensic Magazine. Disponível Em: <https://www.forensicmag.com/article/2007/01/case-number-03-0929-murder-mammoth-lakes>. Access in May, 2017.
- Dunn P. J. H. And J. F. Carter, Eds. (2018). Good Practice Guide For Isotope Ratio Mass Spectrometry, 2nd Edition. Firms. Isbn 978-0-948926-33-4

Ehleringer J R; Matheson Jr. S M. (2011). Stable Isotopes And Courts. Utah Law Review. No. 2. 58p

Font, L., Van der Peijl, G., Van Leuwen, C., Van Wetten, I., Davies, G. R. (2015) Identification of the geographical place of origin of an unidentified individual by multi isotope analysis, Science & Justice, Volume 55, Issue 1, Pages 34-42, ISSN 1355-0306, <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2014.06.011>.

Fraser, I.; Meier-Augenstein, W.; Kalin, R. M. (2006). The Role Of Stable Isotopes In Human Identification: A Longitudinal Study Into The Variability Of Isotopic Signals In Human Hair And Nails. Rapid Communications In Mass Spectrometry, V. 20, N. 7, P. 1109–1116.

Fraser I., Meier-Augenstein W., Kalin R.M. (2008). Stable Isotope Analysis Of Human Hair And Nail Samples: The Effects Of Storage On Samples. Journal Of Forensic Sciences. American Academy Of Forensic Sciences. Wiley, Medford, 53(1):95-99.

Gragani, J. G. ; Garavello, M. E. P. E. ; Silva, R. J. ; Nardoto, G. B. ; Martinelli, L. A. (2013). Can Stable Isotope Analysis Reveal Dietary Differences Among Groups With Distinct Income Levels In The City Of Piracicaba (Southeast Region, Brazil)?. Journal Of Human Nutrition And Dietetics, V. 10.

Katzenberg, M. A.; Krouse, H. R. (1989). Application Of Stable Isotope Variation In Human Tissues To Problems In Identification. Canadian Society Of Forensic Science Journal.

Lehn, C., Rossmann, A., Graw, M. (2015). Provenancing of unidentified corpses by stable isotope techniques – presentation of case studies, Science & Justice, Volume 55, Issue 1, Pages 72-88, ISSN 1355-0306, <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2014.10.006>.

Leventouri, T.; Antonakos, A.; Kuriacou, A.; Venturelli, R.; Liarokapes, E.; Perdikatsis, V. (2009). Crystal Structure Studies Of Human Dental Apatite As A Function Of Age. International Journal Of Biomaterials, Vol. 2009, 6p, Id 698547.

De Oliveira Mascarenhas, R.; Sena-Souza, J. P.; Bernasconi, S. M.; McKenzie, J. A.; Vasconcelos, C.; Muniz, T. R.; Nogueira E Silva, M. P.; Da Silva Salvador, F. A.; Bahniuk Rumbelsperger, A. M. (2022). Building An Isoscape Based On Tooth Enamel For Human Provenance Estimation In Brazil. Forensic Science International, V. 330, P. 111109.

Meier-Augenstein W., Fraser I. (2008). Forensic Isotope Analysis Leads To Identification Of A Mutilated Murder Victim. Journal Of The Forensic Science Society. Elsevier, Dublin, P. 153-159.

Meier-Augenstein W. (2018). Stable Isotope Forensics: Methods And Forensic Applications Of Stable Isotope Analysis. 2 A Ed. Wiley, Aberdeen, Uk, P. 370-397.

Pellegrini, M., Snoeck, C. (2016). Comparing bioapatite carbonate pre-treatments for isotopic measurements: Part 2 — Impact on carbon and oxygen isotope compositions, Chemical Geology, Volume 420, Pages 88-96, ISSN 0009-2541, <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2015.10.038>.

Rauch, E., Rummel, S., Lehn, C., Büttner, A. (2007). Origin assignment of unidentified corpses by use of stable isotope ratios of light (bio-) and heavy (geo-) elements—A case report, *Forensic Science International*, Volume 168, Issues 2–3, Pages 215-218, ISSN 0379-0738, <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2006.02.011>.

Reitesema L.J. (2015). Laboratory And Field Methods For Stable Isotope Analysis In Human Biology. *American Journal Of Human Biology*, Wiley Periodicals. Medford, 27:593-604.

Ross M.H., Pawlina W. (2016) *Histology: a text and atlas with correlated cell and molecular biology*, 7th edn. Wolters Kluwer, Philadelphia, PA.

Szwarcz H.P., Walker P.L. (2006). Characterization of a murder victim using stable isotopic analyses. *Am J Phys Anthropol.*;129:160

Snoeck, C., Pellegrini, M. (2015). Comparing bioapatite carbonate pre-treatments for isotopic measurements: Part 1—Impact on structure and chemical composition, *Chemical Geology*, Volume 417, Pages 394-403, ISSN 0009-2541, <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2015.10.004>.

Someda, H.; Gakuhari, T.; Akai, J.; Araki, Y.; Kadera, T.; Tsumatori, G.; Kobayashi, Y.; Matsunaga, S.; Hashimoto, M.; Saito, M.; Yoneda, M.; Ishida, H. (2016). Trial Application Of Oxygen And Carbon Isotope Analysis In Tooth Enamel For Identification Of Past-War Victims For Discriminating Between Japanese And Us Soldiers. *Forensic Science International*.

Tykot, R. H. (2004). Stable Isotopes And Diet: You Are What You Eat. *Proceedings Of The International School Of Physics*.

Valenzuela, L. O., Chesson, L. A., Bowen, G. J., Cerling, T. E., & Ehleringer, J. R. (2012). Dietary heterogeneity among Western industrialized countries reflected in the stable isotope ratios of human hair. *PLoS One*, 7(3), e34234.

Ventresca Miller A, Fernandes R, Janzen A, Nayak A, Swift J, Zech J, Boivin N, Roberts P. (2018). Sampling and Pretreatment of Tooth Enamel Carbonate for Stable Carbon and Oxygen Isotope Analysis. *J Vis Exp*. Aug 15;(138):58002. doi: 10.3791/58002. PMID: 30176003; PMCID: PMC6126827.

STABLE ISOTOPE ANALYSIS OF HUMAN HAIR: EVALUATING THE INFLUENCE OF ARTIFICIAL PIGMENTS

Taís Ribeiro Muniz^{1,2*}, Ricardo de Oliveira Mascarenhas^{1,3}; Vladimir Eliodoro Costa⁴; Anelize Manuela Bahniuk Rumbelsperger¹

¹ *Laboratory of Mineral and Rock Analysis (LAMIR), Department of Geology, Federal University of Paraná, PO Box 19062, 81531-980, Curitiba, PR, Brazil.*

² *Brazilian Federal Police, National Institute of Criminalistics, Setor Policial Sul, Lote 7, 706710-902, Brasília, DF, Brazil.*

³ *Brazilian Federal Police, Technical-Scientific Sector, R. Sandália Monzon 210, 82640-040, Curitiba, PR, Brazil.*

⁴ *Stable Isotopes Center (CIE), Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP), 18618-689, Botucatu, SP, Brazil.*

* *Corresponding author (e-mail: tais.trm@pf.gov.br)*

ABSTRACT

The stable isotope analysis of human tissues has become widely studied due to its potential as an information provider regarding human provenance and nutritional habits. Nonetheless, few of those studies evaluate and discuss the results according to adopted preparation procedures and how different methods may impact the results and interpretations. In the present work, isotopic ratio mass spectrometry (IRMS) was used to establish the variation of carbon and nitrogen isotopic signatures from hair samples, assessing the influence of hair dyes. Thirty human hair samples were analysed; four samples were kept natural, for control purposes, whilst the other 26 were dyed with three popular over the counter cosmetic hair dyes, which were also analysed by themselves for comparison purposes. The results showcase the irrelevance of such cosmetic procedures in the attainment of carbon and nitrogen stable isotope ratios, therefore exempting the need of submitting hair samples to cosmetic dye chemical extraction, which is of paramount relevance, as in the context of criminal investigations, simple and quick yet effective preparation procedures, are favoured over excessively complex ones. The results provide information and promote guidelines in the process of adjusting analytical procedures for both anthropological or forensic purposes, while also enabling a more accurate interpretation of obtained values, as well as contributing to the building of isotopic national and worldwide databases.

KEYWORDS: CARBON; NITROGEN; PIGMENT; DYE.

1 INTRODUCTION

Bulk stable isotope analysis (BSIA) can be used for a multitude of purposes, including human provenancing and dietary preferences determination, which can be useful in forensic anthropology. In this context, it allows the determination of a possible geographical origin of human corpses and remains as well as their previous nutritional habits, which can be extremely valuable information in cases of human identification where classic techniques, such as DNA profiling and fingerprint identification, cannot be properly utilized (Bartelink et al., 2016).

The available stable isotopes in the various tissues that comprise the human body are derived from sources of nutrition and hydration and are assimilated by the organism of individuals through biochemical processes (Tykot, 2004; Chesson et al., 2014). Assimilation allows, based on the interpretation of isotopic ratios of human tissues (obtained after analysis in a mass spectrometer), the geographic correlation of these values and the determination of specificities of the individual's life habits, which may come to assist in the process of identification (Meier-Augenstein and Fraser, 2008; Meier-Augenstein, 2018).

The tissues that constitute the human body are formed by cell groups with specific functions, which can be classified into four types, among them epithelial tissues, from which the epidermis, nails and hair derive, and conjunctive tissues, from which human teeth derive (Ross and Pawlina, 2016). The carbon and nitrogen isotopes that comprise these tissues are derived from diet components, while the oxygen and hydrogen isotopes are derived from direct and indirect water sources. Based on this premise, the isotopic ratios in human tissues, both organic (skin, hair, nails, etc.) and biomineral (tooth enamel and dentin as well as bones), can vary according to the singularities of the individual's nutritional habits and their origins (Katzenberg and Krouse, 1989). A limitation of the application, however, may occur due to triggering of isotopic fractionation processes due to the influence of external factors or those directly linked to the analytical procedure, which would result in the low reliability of the obtained isotopic signatures. If this influence were to be confirmed, the determination of an individual's geographic origin and specificities of his or her life habits would be impaired (Fraser et al., 2008), as the values would be linked to secondary factors that would hinder the data interpretation within the scope of criminal expertise and anthropological research.

There are several publications worldwide that describe the process and outcomes of criminal investigations solved in part due to the contribution of results obtained from isotope ratio mass spectrometry (Schwarcz and Walker, 2006; Rauch et al., 2007; Font et al., 2015; Lehn et al., 2015). As well as various researches that rely on SIA for general anthropological findings and public policies development (Fraser et al. 2006; Dostie 2007; Valenzuela et al.,

2012; Gragnani et al. 2013; Bartelink et al. 2016; Someda et al. 2016). However, fewer studies such as Snoeck and Pellegrini (2015), Pellegrini and Snoeck (2016) and Ventresca Miller et al. (2018), are dedicated to the evaluation and determination of ideal analytical protocols when it comes to applying the technique with modern human samples, for forensic purposes or not, and that meticulously address the various variables that can influence the process of assimilation of the isotopes of an element by the human body, as well as intrinsic aspects of the analytical procedures that can alter the original isotopic composition of analysed samples. The complete understanding and mitigation of the effects of these variables is an extremely important step for the correct interpretation of this type of data and, therefore, represents a great challenge for the correct establishment of protocols to determine a probable “isotopic profile” of an individual with the aid of BSIA.

The present work was motivated by the possibility of contributing to the consolidation of proper adoption of BSIA with human remains, specially by forensic experts in Brazil, who retain most of the demand for such analysis in the country, requiring the best of analytical practices due to the implications of the usage of BSIA in courts (Dunn and Carter, 2018; Ehleringer and Matheson, 2011), hence the need for establishment of suitable analytical procedures based on performed experiments with human teeth and hair samples, target materials for investigations within the scope of forensic anthropology.

1.2 Human hair analysis

The study was developed with the general objective of understanding the influence of hair dyes in the determination of carbon and nitrogen isotopic signatures in human hair samples and, in case the influence is confirmed, to establish measures to mitigate these effects, therefore enabling the obtention of reliable isotopic signatures regardless of the presence of hair colouring.

From the analysis of human hair samples, carbon and nitrogen isotopic signatures of natural and dyed hair strands were obtained, as well as the isotopic signatures of the utilized hair dyes themselves, for comparison purposes.

This study did not aim at determining the geographic origin and/or nutritional preferences based on the obtained results, but rather to evaluate the influence of a common aesthetic procedure in the determination of isotopic signatures of human hair. It is estimated that more than half of homes in Brazil have at least one individual who applies hair dyes on a regular basis (Nielsen, 2016). Being a very common trace evidence in crime scene

investigations, it is necessary to evaluate the influence of dyes in human hair isotopic composition, in order to ensure SIA is being utilized reliably.

2 MATERIALS AND METHODS

A hair sample comprised of 200 individual hair strands was cut close to the scalp of a donor. From these, strands with a thickness between 0.05 and 0.06 mm and similar length were selected, assuming that strands with similar thickness, texture and length would have the same growth rate and therefore the same interval along these strands would correspond to a similar period of formation and isotopic assimilation. After the selection, 08 hair strands were kept natural, whilst another 40 were artificially dyed according to the instructions presented with the product (apply the mixture of dye and revealing cream – hydrogen peroxide – to the hair strand and leave for 30 to 40 minutes) or solely discoloured with 12% hydrogen peroxide solution, as presented in Table 1.

Table 1 – Number of samples and respective procedures.

Number of hair strands	Procedure	Sample Code
8	Kept natural	HCTRL
4	Discoloured	HP
12	Dyed black, red and blonde	HB
12	Dyed black, red and blonde	HG
12	Dyed black, red and blonde	HK

B, G and K correspond to three different hair dye brands.

Both natural and dyed strands were cleaned in a degreasing solution of methanol and chloroform (2:1 v/v) for two hours, with a 20-minute interval for rinsing with deionized water and changing the cleaning solution. After this period, the samples remained in an oven at 50 °C to dry for 15h. Once dried, they were cut into 7 cm intervals, those corresponding to a period in which the donor's diet was controlled so that the isotopic stability of their tissues was maintained. After sectioning, the samples were weighed (500 µg each) and deposited in tin capsules, which were then inserted into the elemental analyser of a Thermo Scientific Delta V Advantage® isotope ratio mass spectrometer (IRMS), where they were transformed into gas through a combustion process. The isotope ratio mass spectrometry system was characterized by continuous flow CF-IRMS (online) using a CHN Flash 2000 combustion elemental analyser (EA) also from Thermo Scientific, coupled to the IRMS via a Conflo IV gas interface. The

samples were analysed interspersed with urea working standards with known values determined based on calibration curves with international certified standards USGS 42 and USGS 43. All of the results were presented in permil notation (‰), Air scale for $\delta^{15}\text{N}$ and VPDB scale for $\delta^{13}\text{C}$, according to the well-established equation $\delta^{\text{h}}\text{E}_{\text{sample/standard}} = ((\text{R}_{\text{sample}}/\text{R}_{\text{standard}}) - 1)$, where $^{\text{h}}\text{E}$ is the rarest isotope of the element in question (^{15}N or $\delta^{13}\text{C}$) for a given sample, R being the isotope ratio of E for the sample or the standard (Meier-Augenstein, 2018). The results are presented in 2D scatterplots and the data was also subjected to Hierarchical Cluster Analysis (HCA) with MINITAB™ 14, as well as ANOVA and MANOVA.

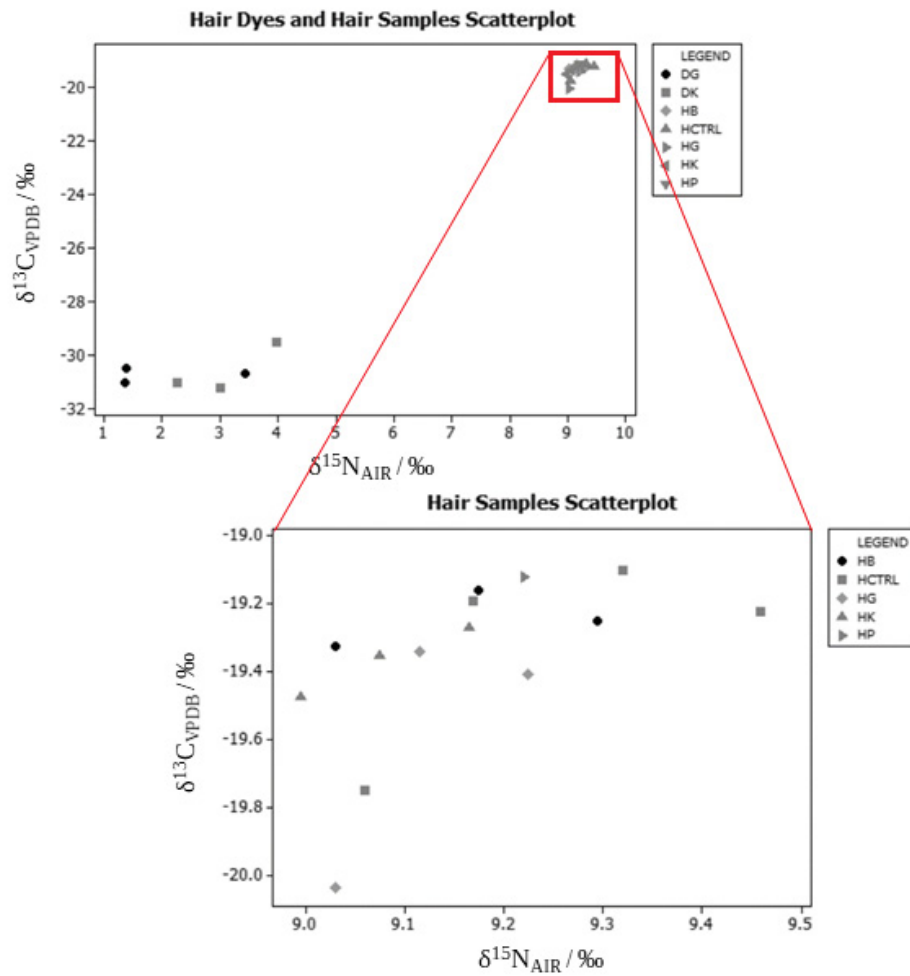
For the coloured samples, dyeing was carried out prior to their preparation, adopting the standard procedure as indicated on the product instructions. Nine dyes were selected from three different popular over the counter hair colouring brands. Four strands were also bleached, by regular removal of the natural pigments with 12% hydrogen peroxide coupled with bleaching powder, as often done in beauty salons.

The isotopic analysis of six of the utilized hair dyes was carried out so that the values could then be compared to those obtained from the dyed samples.

3 RESULTS

From the results is possible to observe that the hair strand results are not superimposed to those of the isolated hair dyes (Figure 1). The values for hair samples were grouped based on utilized hair dye brand, regardless of colour, based on the assumption that the company would use the same basic ingredients for all its products of this nature, which would then make the dyes' isotopic composition similar and graphically group them, as actually observed.

A



B

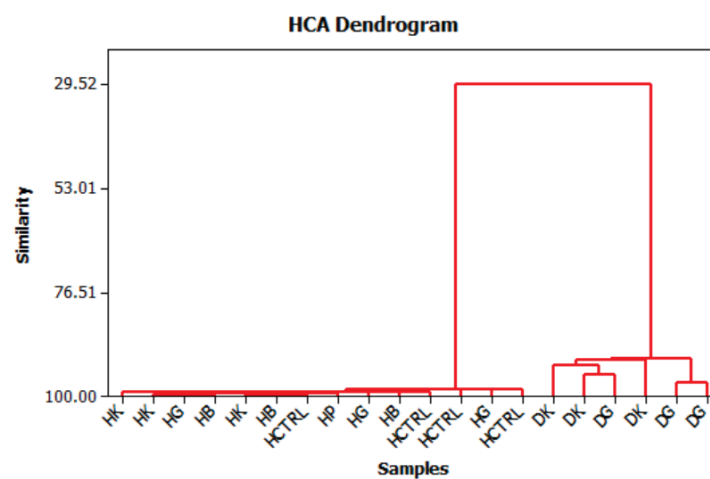


Figure 1 – A: Carbon and nitrogen results for natural and dyed hair samples. It can be observed that the isotopic signatures of the dyes present a difference of -10‰ for carbon in relation to hair strands. HB: hair dyed with code B brand dyes; HK: strand dyed with K code brand dyes; HG: strands dyed with G code brand dyes; HP: bleached samples. HCTRL: sample with strands kept natural. B: HCA resulting dendrogram.

4 DISCUSSIONS

Comparing the isotopic signatures obtained from the dyes and dyed hair strands, it is possible to observe that the variation in the results for the strands is not a consequence of hair dye influence, as these presented much more negative results for carbon and less positive results for nitrogen. If the isotopic signatures of the dyes eventually overlap with those of the hair strands, the results allow us to safely state that this overlap is undetectable and the variation between the strands could easily be a consequence of the heterogeneity of the isotopic ratios throughout the hair, which can occur naturally. The HCA dendrogram demonstrate a similarity close to 100% for the hair strand samples, both dyed and natural (control samples), and a similarity no greater than 30% between hair dyes and hair samples, individualized in a completely different cluster. Roughly speaking, the hair strand results present no relevant distinction between them, based on the distribution range of the Control samples, as indicated in Figure 2 A and B, which was confirmed by the ANOVA and MANOVA results presented in Table 2. ANOVA and MANOVA were performed to evaluate the significance of the different values for hair samples and between hair samples and hair dyes. No statistically significant differences were detected for hair strand samples, with both ANOVA and MANOVA (p values ranging from .416 to .522). When comparing hair samples and hair dyes, all p values are less than .05, indicating that their individualisation is statistically significant.

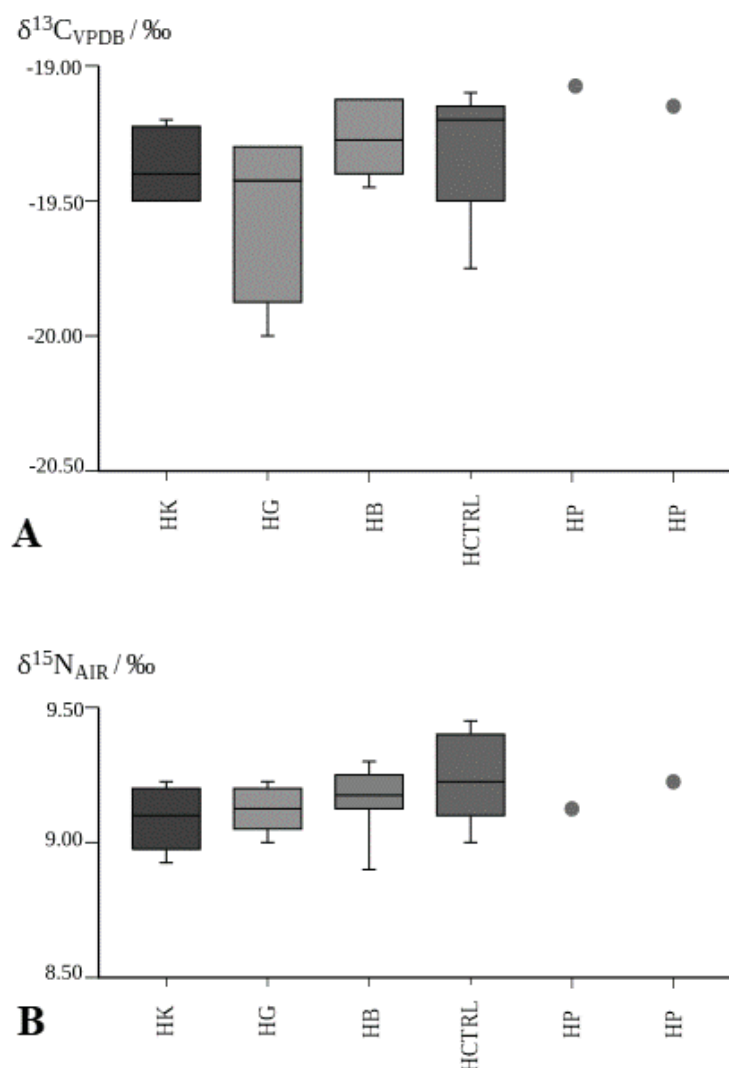


Figure 2 – Boxplots representing the results obtained from the analysis of natural hair samples, dyed hair strands and bleached ones. A: $\delta^{13}\text{C}$; B: $\delta^{15}\text{N}$.

Table 2 – ANOVA and MANOVA results of hair samples data analysis.

ANALYSIS	Hair and dye samples	Hair samples
ANOVA $\delta^{13}\text{C}$	F (6, 13) = 470.4, p = .000	F (4, 9) = 1.02, p = .445
ANOVA $\delta^{15}\text{N}$	F (6, 13) = 88.05, p = .000	F (4, 9) = 0.86, p = .522
MANOVA	Pillai's Trace 1.2849 F 3.893 p = 0.002	Pillai's Trace 0.6506 F 1.085 p = 0.416

5 CONCLUSIONS

Based on the results, it was possible to conclude that carbon and nitrogen isotopic compositions of hair dyes and treated hair samples are consistently different from each other, which is corroborated by the ANOVA, MANOVA and HCA results. Additionally, comparing the results for treated hair strands with those of control hair samples, kept natural, no significant

distinction between them could be detected. This conclusion indicated that it is unnecessary to carry out any procedures to remove artificial pigments from the hair shaft, as these pigments do not impact the final results. It is important to highlight, however, that, unlike what has already been stated in a related study (Fraser, 2007), the standard cleaning procedure with methanol and chloroform 2:1, is unable to remove either natural or artificial pigments present along the hair strands, which was evident by the presence of the hair dyes after cleaning, as the dyed samples maintained the artificial colouring.

ACKNOWLEDGMENTS: We thank the Stable Isotope Center (CIE) of the São Paulo State University and its entire team, specially Msc. Cibele de Souza Kruliski, as well as all the donors who made the research possible.

REFERENCES

- Bartelink E.J., Mackinnon A.T., Prince-Buitenhuis J.R., Tipple B.J., Chesson L.A. 2016. Stable Isotope Forensics As An Investigative Tool In Missing Persons Investigations. In: S.J. Morewitz, C. Sturdy Colls (Eds.), Handbook Of Missing Persons, Doi 10.1007/978-3-319-40199-7_29 P. 443-462.
- Chesson L.A., Tipple B.J., Howa J.D., Bowen G.J., Barnette J.E., Cerling T.E. E Ehleringer J.R. 2014. Stable Isotopes In Forensics Applications. In: Holland H.D. E Turekian K.K. (Eds.) Treatise On Geochemistry. 2a Ed., Vol. 14. Elsevier, Oxford, P. 285-317.
- Dostie P. 2007. Case Number 03-0929: Murder In Mammoth Lakes. Forensic Magazine. Disponível Em: <https://www.forensicmag.com/article/2007/01/case-number-03-0929-murder-mammoth-lakes>. Access in May, 2017.
- Dunn P. J. H. And J. F. Carter, Eds. 2018. Good Practice Guide For Isotope Ratio Mass Spectrometry, 2nd Edition. Firms. Isbn 978-0-948926-33-4
- Ehleringer J R; Matheson Jr. S M. 2011. Stable Isotopes And Courts. Utah Law Review. No. 2. 58p
- Font, L., Van der Peijl, G., Van Leuwen, C., Van Wetten, I., Davies, G. R., Identification of the geographical place of origin of an unidentified individual by multi isotope analysis, Science & Justice, Volume 55, Issue 1, 2015, Pages 34-42, ISSN 1355-0306, <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2014.06.011>.
- Fraser, I.; Meier-Augenstein, W.; Kalin, R. M. The Role Of Stable Isotopes In Human Identification: A Longitudinal Study Into The Variability Of Isotopic Signals In Human Hair And Nails. Rapid Communications In Mass Spectrometry, V. 20, N. 7, P. 1109–1116, 2006.
- Fraser, I., W. Meier-Augenstein, W., Stable ²H isotope analysis of modern-day human hair and nails can aid forensic human identification, Rapid Commun. Mass Spectrom. 21 (2007) 3279–3285.

Fraser I., Meier-Augenstein W., Kalin R.M. 2008. Stable Isotope Analysis Of Human Hair And Nail Samples: The Effects Of Storage On Samples. *Journal Of Forensic Sciences*. American Academy Of Forensic Sciences. Wiley, Medford, 53(1):95-99.

Gragnani, J. G. ; Garavello, M. E. P. E. ; Silva, R. J. ; Nardoto, G. B. ; Martinelli, L. A. 2013. Can Stable Isotope Analysis Reveal Dietary Differences Among Groups With Distinct Income Levels In The City Of Piracicaba (Southeast Region, Brazil)?. *Journal Of Human Nutrition And Dietetics*, V. 10.

Katzenberg, M. A.; Krouse, H. R. Application Of Stable Isotope Variation In Human Tissues To Problems In Identification. *Canadian Society Of Forensic Science Journal*, 1989.

Lehn, C., Rossmann, A., Graw, M. Provenancing of unidentified corpses by stable isotope techniques – presentation of case studies, *Science & Justice*, Volume 55, Issue 1, 2015, Pages 72-88, ISSN 1355-0306, <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2014.10.006>.

Leventouri, T.; Antonakos, A.; Kuriacou, A.; Venturelli, R.; Liarokapes, E.; Perdikatsis, V. 2009. Crystal Structure Studies Of Human Dental Apatite As A Function Of Age. *International Journal Of Biomaterials*, Vol. 2009, 6p, Id 698547.

De Oliveira Mascarenhas, Ricardo; Sena-Souza, João Paulo; Bernasconi, Stefano M.; Mckenzie, Judith A.; Vasconcelos, Crisógono; Muniz, Taís Ribeiro; Nogueira E Silva, Matheus Pereira; Da Silva Salvador, Fábio Augusto; Rumbelsperger, Anelize Manuela Bahniuk. Building An Isoscape Based On Tooth Enamel For Human Provenance Estimation In Brazil. *Forensic Science International*, V. 330, P. 111109, 2022.

Meier-Augenstein W., Fraser I. 2008. Forensic Isotope Analysis Leads To Identification Of A Mutilated Murder Victim. *Journal Of The Forensic Science Society*. Elsevier, Dublin, P. 153-159.

Meier-Augenstein W. 2018. *Stable Isotope Forensics: Methods And Forensic Applications Of Stable Isotope Analysis*. 2 A Ed. Wiley, Aberdeen, Uk, P. 370-397.

Nielsen. 2016. Infográfico: A Relação Do Uso Dos Salões Com Tinturas Dentro Do Lar. [Nielsen.Com/Br/Pt/Insights/Article/2016/Infografico-A-Relacao-Do-Uso-Dos-Saloes-Com-Tinturas-Dentro-Do-Lar/](https://nielsen.com/br/pt/insights/article/2016/infografico-a-relacao-do-uso-dos-saloes-com-tinturas-dentro-do-lar/). Access in January, 2020.

Pellegrini, M., Snoeck, C. Comparing bioapatite carbonate pre-treatments for isotopic measurements: Part 2 — Impact on carbon and oxygen isotope compositions, *Chemical Geology*, Volume 420, 2016, Pages 88-96, ISSN 0009-2541, <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2015.10.038>.

Rauch, E., Rummel, S., Lehn, C., Büttner, A. Origin assignment of unidentified corpses by use of stable isotope ratios of light (bio-) and heavy (geo-) elements—A case report, *Forensic Science International*, Volume 168, Issues 2–3, 2007, Pages 215-218, ISSN 0379-0738, <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2006.02.011>.

Reitesema L.J. 2015. *Laboratory And Field Methods For Stable Isotope Analysis In Human Biology*. American Journal Of Human Biology, Wiley Periodicals. Medford, 27:593-604.

Ross M.H., Pawlina W. (2016) Histology: a text and atlas with correlated cell and molecular biology, 7th edn. Wolters Kluwer, Philadelphia, PA.

Schwarcz H.P., Walker P.L. Characterization of a murder victim using stable isotopic analyses. *Am J Phys Anthropol* 2006;129:160

Snoeck, C., Pellegrini, M. Comparing bioapatite carbonate pre-treatments for isotopic measurements: Part 1—Impact on structure and chemical composition, *Chemical Geology*, Volume 417, 2015, Pages 394-403, ISSN 0009-2541, <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2015.10.004>.

Someda, H.; Gakuhari, T.; Akai, J.; Araki, Y.; Kadera, T.; Tsumatori, G.; Kobayashi, Y.; Matsunaga, S.; Hashimoto, M.; Saito, M.; Yoneda, M.; Ishida, H. Trial Application Of Oxygen And Carbon Isotope Analysis In Tooth Enamel For Identification Of Past-War Victims For Discriminating Between Japanese And Us Soldiers. *Forensic Science International*, 2016.

Tykot, R. H. Stable Isotopes And Diet: You Are What You Eat. *Proceedings Of The International School Of Physics*, 2004.

Valenzuela, L. O., Chesson, L. A., Bowen, G. J., Cerling, T. E., & Ehleringer, J. R. (2012). Dietary heterogeneity among Western industrialized countries reflected in the stable isotope ratios of human hair. *PLoS One*, 7(3), e34234.

Ventresca Miller A, Fernandes R, Janzen A, Nayak A, Swift J, Zech J, Boivin N, Roberts P. Sampling and Pretreatment of Tooth Enamel Carbonate for Stable Carbon and Oxygen Isotope Analysis. *J Vis Exp*. 2018 Aug 15;(138):58002. doi: 10.3791/58002. PMID: 30176003; PMCID: PMC6126827.

VARIAÇÕES DAS ASSINATURAS ISOTÓPICAS DE AMOSTRAS DE UNHA E CABELOS DE CRIANÇAS COM DIFERENTES HÁBITOS ALIMENTARES

Taís Ribeiro Muniz^{1*}, Ricardo de Oliveira Mascarenhas^{1 2}; Vladimir Eliodoro Costa³; Anelize Manuela Bahniuk Rumbelsperger¹

¹ *Laboratório de Análise de Minerais e Rochas (LAMIR), Departamento de Geologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil;*

² *Setor Técnico-Científico da Superintendência de Polícia Federal no estado do Paraná, Curitiba, Brasil;*

³ *Centro de Isótopos Estáveis, UNESP, Botucatu/SP, Brasil.*

⁴ *Instituto Nacional de Criminalística, Diretoria Técnico-Científica da Polícia Federal, Setor Policial Sul, Brasília/DF.*

** Autor para correspondência (e-mail: tais.trm@pf.gov.br)*

RESUMO: Este trabalho consistiu na realização de análise de isótopos estáveis de carbono e nitrogênio presente nas unhas de crianças brasileiras com origem geográfica conhecida e hábitos alimentares específicos, de modo a identificar eventuais variações dessas assinaturas nestes indivíduos de mesma faixa etária e com modos de vida similares. Foram analisadas amostras de unha e cabelo de 06 indivíduos diferentes com idades entre 2 meses e 5 anos. 41 amostras foram analisadas, a maioria destas coletadas ao longo de um período de três meses. Observou-se assinaturas isotópicas do carbono entre os valores -16.5‰ e -19.0‰ enquanto para o nitrogênio foram observados valores entre 8.5‰ e 12.5‰. A maior dispersão de valores foi observada nas unhas do indivíduo de 9 meses de idade, o único com dieta baseada em leite materno, com inserção de alimentos sólidos diversos. O indivíduo vegetariano apresentou assinaturas bastante diferentes dos indivíduos onívoros, com assinatura isotópica do carbono mais negativa e assinatura do nitrogênio menos positiva. Os valores obtidos permitiram observar a variação das razões isotópicas em crianças com dieta controlada, possibilitando a distinção dos indivíduos com especificidades nutricionais como vegetarianismo ou dieta baseada em leite materno.

PALAVRAS-CHAVE: CARBONO; NITROGÊNIO; FRACIONAMENTO; DIETA

1 INTRODUÇÃO

Utilizada para os mais diversos fins, a análise de isótopos estáveis (AIE) para determinação de razões isotópicas pode ser considerada como uma técnica analítica de extrema importância em estudos antropológicos. A AIE vem agregando conhecimento à antropologia,

tanto física como social há alguns anos. No Brasil, já foram publicadas pesquisas onde a técnica analítica permitiu a distinção de grupos indígenas e populações urbanas (Nardoto, 2011), assim como já possibilitou a distinção entre indivíduos de classes econômicas diversas (Gagnani, 2013).

Derivados das fontes de nutrição e hidratação, os isótopos estáveis são assimilados pelo organismo de indivíduos através de processos bioquímicos. A assimilação permite, a partir da interpretação das razões isotópicas de tecidos humanos (obtidas após análise em espectrômetro de massa), a correlação geográfica destes valores e a determinação de especificidades dos hábitos de vida do indivíduo, o que pode vir a auxiliar no processo de identificação deste, bem como na distinção de grupos e culturas, conferindo maior robustez a pesquisas antropológicas e arqueológicas do gênero.

Os tecidos que compõem o corpo humano são formados por agrupamentos celulares com funções específicas, podendo ser classificados em quatro tipos, dentre estes os tecidos epiteliais, dos quais derivam a epiderme, unhas e pelos (Gitirana, 2007). Os isótopos dos diversos elementos que constituem esses tecidos são provenientes da alimentação e fonte de hidratação dos indivíduos, como descrito por Chesson et al. (2014). Mais especificamente, os isótopos de carbono e nitrogênio são derivados dos alimentos, enquanto os isótopos de oxigênio são provenientes de fontes de água diretas e indiretas. Partindo dessa premissa, observa-se a possibilidade de variação das razões isotópicas nos tecidos humanos, tanto orgânicos (pele, cabelo, unha etc.) quanto biominerais (dentes e ossos), de acordo com as singularidades dos hábitos nutricionais do indivíduo e suas origens geográficas. Uma limitação pouco discutida dessa aplicação, entretanto, trata-se da eventual variação das assinaturas isotópicas de indivíduos devido a processos de fracionamento isotópico associados a fatores externos, o que resultaria na pouca confiabilidade das assinaturas isotópicas obtidas. Se confirmada essa influência, a determinação da origem geográfica de um indivíduo e especificidades de seus hábitos de vida seriam prejudicadas, pois os valores estariam atrelados a fatores secundários que dificultariam a interpretação dos dados no âmbito de uma pesquisa antropológica ou arqueológica, para fins forenses ou não.

O presente trabalho teve como motivação a possibilidade de contribuição na consolidação de métodos de utilização da AIE em tecidos humanos no Brasil, compreendendo e estabelecendo procedimentos analíticos mais viáveis a partir da realização de experimentos com amostras de unhas humanas, um dos materiais-alvo de investigações em antropologia. O estudo foi desenvolvido com o objetivo geral de compreensão da variação das assinaturas

isotópicas de unhas e cabelos de indivíduos com dieta e origens conhecidas, ainda que estes façam parte da mesma família.

A partir da análise de amostras de unhas humanas cabelo, foram obtidas assinaturas isotópicas de carbono e nitrogênio.

Este estudo não teve como objetivo a determinação da origem geográfica das amostras analisadas, mas sim avaliar as mudanças de assinaturas isotópicas do tipo de material em questão, ao longo do tempo.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras de unha e cabelo utilizadas foram doadas pelos responsáveis legais das 06 crianças das quais o material foi coletado. A doação foi realizada mediante preenchimento de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), garantindo que as amostras seriam utilizadas apenas para fins científicos, no âmbito da pesquisa aqui descrita. 41 amostras foram analisadas, destas, 37 (referentes a quatro dos seis indivíduos) foram coletadas ao longo de três meses, de março a abril de 2019, as outras quatro tendo sido coletadas apenas em maio do mesmo ano. As mechas de cabelo foram cortadas rentes à raiz, garantindo maior densidade de material para realização da análise. As amostras de unha foram coletadas a partir dos dedos de todas as mãos, com uma frequência semanal. Tanto as unhas quanto os fios de cabelo foram limpos em solução desengordurante de metanol e clorofórmio (2:1 v/v) por duas horas, com intervalo de 20 minutos para enxágue com água deionizada e troca da solução de limpeza. Após este período, as amostras permaneceram em estufa a 50°C para secagem por 15h. Já secas, estas foram cortadas, pesadas ($\pm 700\mu\text{g}$) e depositadas em cápsulas de estanho, inseridas no analisador elementar do espectrômetro de massa Delta V Advantage® onde foram transformadas em gás através de processo de combustão. O sistema de espectrometria de massa de razão isotópica caracterizou-se por fluxo contínuo CF-IRMS (online) utilizando um analisador elementar (EA) de CHN combustão modelo Flash 2000 da Thermo Scientific acoplado a um IRMS por meio da interface de gás Conflo IV.

As amostras de unha passaram por etapa de limpeza física antes de procederem à limpeza com solução desengordurante, garantindo que nenhum material aderido na amostra interferiria nos resultados obtidos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados evidenciam que há um padrão de assinaturas isotópicas de carbono e nitrogênio para indivíduos onívoros, estes representados pelas siglas A, N, H, J e V, na Figura 1. Destes, apenas A é oriundo da região sudeste do Brasil, todos os outros sendo originários do Paraná, Região Sul do país.

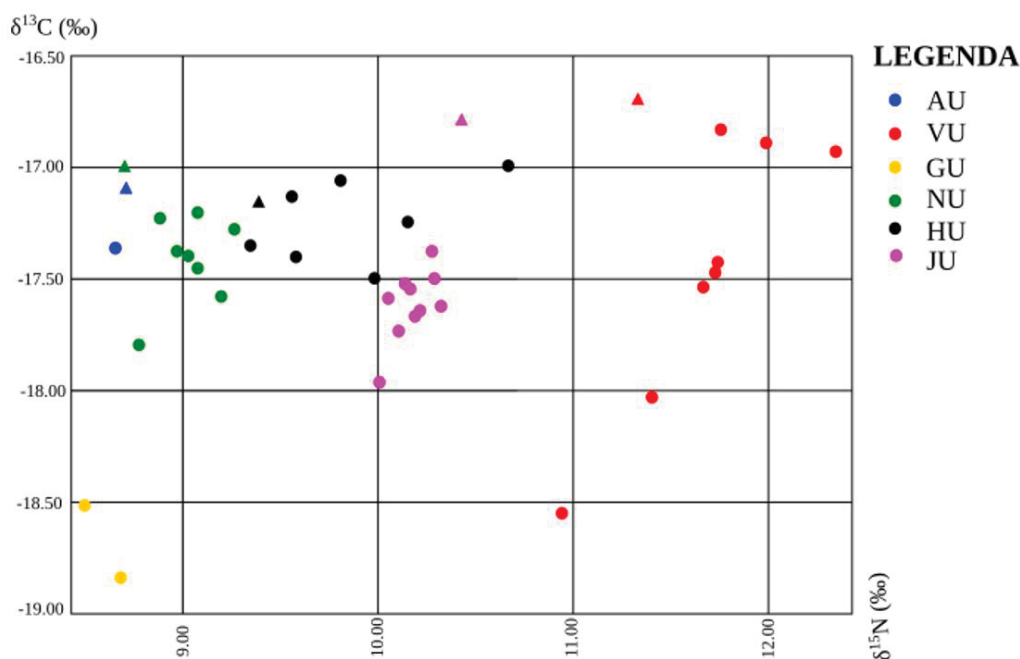


Figura 1 – Assinaturas isotópicas de carbono e nitrogênio obtidas a partir da análise de unhas (círculos) e cabelos (triângulos) de crianças com dieta e origem conhecidas.

Os indivíduos H e V são os únicos que apresentam leite materno presente em suas dietas, porém, observa-se que apenas o indivíduo V apresenta em suas amostras enriquecimento significativo em ^{15}N , evidenciado pelas suas assinaturas isotópicas mais positivas para este elemento. Enquanto isso, o indivíduo H, que ia completar dois meses de vida quando suas amostras foram coletadas, tinha dieta baseada exclusivamente em leite materno, e mesmo assim não apresentou o mesmo padrão de enriquecimento em ^{15}N observado em V, pelo contrário, apresenta razões similares à de seu irmão, N, com dieta onívora sólida. As amostras de H representam um período de assimilação isotópica de quando este ainda se encontra de condição de vida intrauterina, evidenciando um possível equilíbrio isotópico entre a mãe e o bebê, justificando a assinatura isotópica de nitrogênio mais similar à do irmão, provavelmente valores análogos àqueles observados em sua mãe. Ademais, o indivíduo V apresenta uma grande dispersão de suas assinaturas, comparadas com os outros resultados, o que pode ser explicado

pelo fato de ser o único que, no período referente à assimilação das razões observadas, estava em período de inserção de alimentos sólidos em sua dieta baseada em leite materno.

Observa-se, também, que o indivíduo vegetariano (G), conta com assinaturas isotópicas mais negativas para o carbono, como demonstra a Figura 2, indicando a ingestão de plantas C3 em maior proporção que os outros indivíduos, o que é esperado para uma dieta vegetariana em que há diversificação de legumes e verduras para compensar a ausência de proteína animal. Entretanto, seus resultados para o nitrogênio se mantiveram similares aos outros, consequência da ingestão de ovos, leite e derivados, tornando a assinatura, para o nitrogênio, similar àquelas de onívoros. Caso este indivíduo adotasse uma dieta vegana, estima-se que os valores resultantes para o nitrogênio fossem reduzidos para cerca de 7‰.

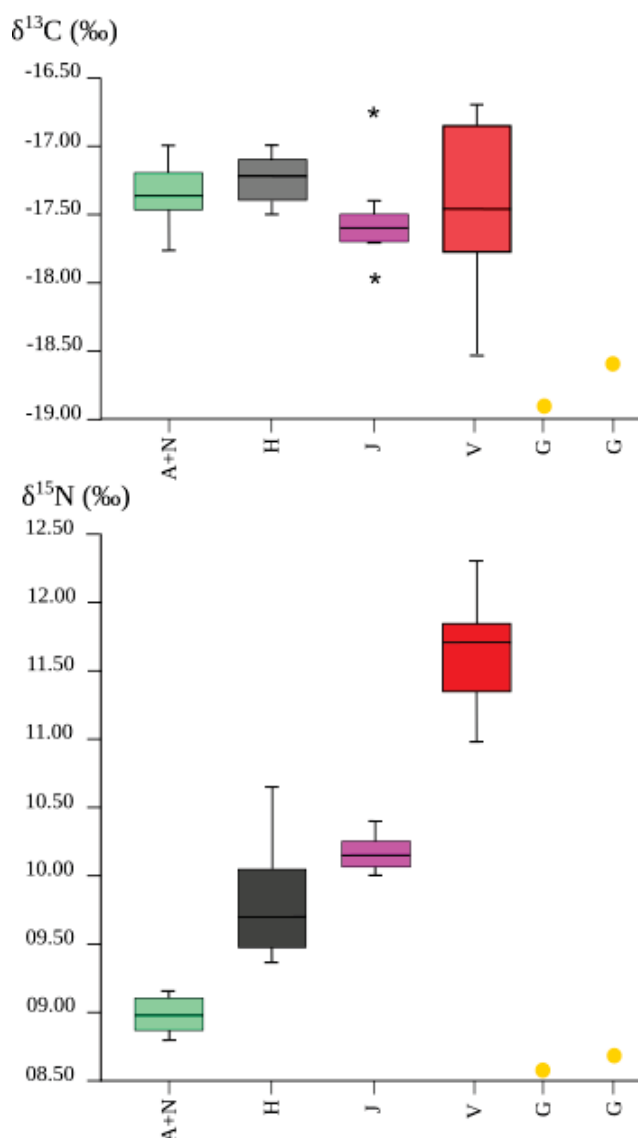


Figura 2 – Boxplots das assinaturas de carbono e nitrogênio das amostras, evidenciando o padrão dos resultados para o carbono, de onívoros e de nitrogênio, para crianças que ainda contam com leite materno em sua dieta.

4 CONCLUSÕES

A partir dos resultados, foi possível distinguir as assinaturas do indivíduo vegano dos indivíduos onívoros, além de ter sido possível observar o impacto do leite materno de mães onívoras na assinatura isotópica de nitrogênio de seus filhos. Esperava-se que o indivíduo H apresentasse tecidos enriquecidos em ^{15}N , como observado no indivíduo V, porém, não foi o observado, o que se deve, possivelmente, ao fato de as unhas e cabelos analisados representarem um período de assimilação de quando o bebê ainda encontrava-se no útero, portanto no que pode ser entendido como um equilíbrio isotópico dos tecidos de mãe e filho. Os resultados, portanto, sugerem que o enriquecimento em ^{15}N passa a ocorrer partir do nascimento, quando a assimilação das razões isotópicas maternas se dá de maneira indireta, através do leite, ao invés de diretamente através do fluxo sanguíneo. Ademais, o indivíduo V, que sabia-se ser o único com dieta baseada em leite materno, com inserção paulatina de alimentos sólidos, apresentou assinaturas dispersas tanto para o carbono quanto para o nitrogênio, possivelmente devido à inserção de elementos de outra natureza, com dados corroborando então este período de transição nutricional.

AGRADECIMENTOS: Ao Laboratório de Análise de Minerais e Rochas (LAMIR) da Universidade Federal do Paraná, ao Centro de Isótopos Estáveis (CIE) da Universidade Estadual Paulista de Botucatu e toda sua equipe, com destaque especial à MSc. Cíbele de Souza Kruliski. Aos doadores das amostras aqui analisadas e seus responsáveis.

REFERÊNCIAS

- Chesson L.A., Tipple B.J., Howa J.D., Bowen G.J., Barnette J.E., Cerling T.E. E Ehleringer J.R. 2014. Stable Isotopes In Forensics Applications. In: Holland H.D. E Turekian K.K. (Eds.) Treatise On Geochemistry. 2a Ed., Vol. 14. Elsevier, Oxford, P. 285-317.
- Gitirana, L.B. 2007. Histologia: Conceitos Básicos Dos Tecidos. 2aed. Atheneu, Rio De Janeiro. 307p.
- Gragnani, J. G. ; Garavello, M. E. P. E. ; Silva, R. J. ; Nardoto, G. B. ; Martinelli, L. A. 2013. Can Stable Isotope Analysis Reveal Dietary Differences Among Groups With Distinct Income Levels In The City Of Piracicaba (Southeast Region, Brazil)?. Journal Of Human Nutrition And Dietetics, V. 10.
- Nardoto, G.B. ; Murrieta, R.S.S. ; Prates, L.E.G.; Adams, C.; Garavello, M.E.P.E.; Schor, T.; De Moraes, A.; Rinaldi, F.D.; Gragnani, J.G.; Moura, E.A.F.; Duarte-Neto, P.J.; Martinelli, L.A. 2011. Frozen Chicken For Wild Fish: Nutritional Transition In The Brazilian Amazon Region Determined By Carbon And Nitrogen Stable Isotope Ratios In Fingernails. American Journal Of Human Biology, V. 23, P. 642-650.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E RECOMENDAÇÕES

O presente trabalho teve como objetivo geral a compreensão de processos de fracionamento isotópico em tecidos humanos de modo a auxiliar na determinação de procedimentos analíticos padrões para adoção da técnica de análise de isótopos estáveis em estudos antropológicos, sobretudo no âmbito das Ciências Forenses. Foram apresentados resultados isotópicos obtidos a partir da análise de dentes, unhas e cabelos humanos, cada uma das matrizes tendo sido utilizada para um objetivo específico.

Os resultados permitiram estabelecer como padrão a pulverização das amostras de dente com uso do microdrill, evitando submeter as amostras a temperaturas superiores a 40°C e armazenando-as em dessecadores a vácuo para evitar a interferência de umidade nos resultados. O procedimento de análise de cabelos humanos é satisfatório, não havendo necessidade de ataque químico para retirada de quaisquer pigmentos, sendo suficiente a limpeza com solução desengordurante. Os resultados obtidos a partir das unhas humanas ofereceram *insights* acerca da taxa de *turnover* isotópico destes tecidos, em indivíduos na primeira infância, evidenciando a nova fronteira no estudo da nutrição pediátrica e detecção de hábitos alimentares específicos.

Os procedimentos de preparação e análise de amostras de tecido humano, como descrevem os artigos relacionados ao assunto, são bastante criteriosos e devem seguidos rigorosamente de modo a evitar contaminação, perda de material, fracionamento induzido, entre outros fatores que possam vir a dificultar a interpretação dos dados ou até mesmo inutilizá-los. Devido à alta precisão da técnica de IRMS, até mesmo a forma de armazenamento do material, antes de sua preparação, deve ser escolhida com cautela, como apresentado por Fraser et al. (2008). A *Forensic Isotope Ratio Mass Spectrometry Network* (FIRMS) publicou, em 2018, a segunda edição do Guia de Boas Práticas em espectrometria de massa de razões isotópicas e é extremamente recomendado que todos os profissionais envolvidos em pesquisas com isótopos estáveis, para aplicações forenses, dediquem tempo para leitura do guia de modo a avaliar e aperfeiçoar suas próprias práticas. Como afirmado por Meier-

Augenstein (2018), a conformidade dos laboratórios e experimentos com as orientações da IUPAC é um pré-requisito para desenvolvimento de pesquisas na área, e não um luxo. A apresentação de dados isotópicos não confiáveis, passíveis de questionamento, em um laudo a ser apresentado a um juiz, pode eliminar as chances de adoção da técnica por peritos criminais, impactando negativamente o avanço das ciências forenses no Brasil, caracterizando uma perda lastimável para a segurança pública nacional. Por isso, deve-se sempre buscar o aperfeiçoamento e compatibilidade com padrões internacionais de excelência, tendo sempre a conformidade com a ISO 17025 como uma meta.

De modo geral, tanto o Laboratório de Análise de Minerais e Rochas da UFPR como o Centro de Isótopos Estáveis da UNESP contam com infraestrutura para análise isotópica de evidências, com insumos necessários, incluindo dessecadores, estufas e equipamentos para pulverização e pesagem precisa das amostras. Entretanto, destaca-se que ambos os laboratórios não contam com a AIE em Ciências Forenses como carro chefe das pesquisas que desenvolvem, o que compromete a estrutura dedicada à aplicação, que demanda utilização exclusiva de alguns materiais específicos de preparação para que a contaminação cruzada seja evitada. Diante disso, é recomendada que quaisquer análises realizadas para fins de construção de corpo probatório, sejam acompanhadas pelo perito criminal responsável. Ademais, sugere-se o desenvolvimento de uma plataforma de registro on-line e construção de local específico para armazenamento de amostras caracterizadas como evidência forense, para que seja garantida a preservação de matéria não consumida nas análises e de modo a impedir a quebra da cadeia de custódia das provas, garantindo também a idoneidade das análises, como preconizado no texto do Pacote Anticrime, Lei 13.964/2019.

REFERÊNCIAS

- Ash, M. M.; Nelson, S. J. Wheeler's Dental Anatomy, Physiology, And Occlusion. Philadelphia: W.B. Saunders, 2003.
- Bartelink E.J., Mackinnon A.T., Prince-Buitenhuis J.R., Tipple B.J., Chesson L.A. 2016. Stable Isotope Forensics As Aninvestigative Tool In Missing Persons Investigations. In: S.J. Morewitz, C. Sturdy Colls (Eds.), Handbook Of Missing Persons, Doi 10.1007/978-3-319-40199-7_29 P. 443-462.
- Benson, S.; Lennard, C.; Maynard, P.; Roux, C. Forensic Applications Of Isotope Ratio Mass Spectrometry - A Review. Forensic Science International, V. 157, N. 1, P. 1–22, 2006.
- Boaventura, G. 2016 Um Pouco Sobre A Fisiologia Das Unhas. <https://Cosmeticaemfoco.Com.Br/Artigos/Um-Pouco-Sobre-A-Fisiologia-Das-Unhas/>
- Brand, W. A. High Precision Isotope Ratio Monitoring Techniques In Mass Spectrometry. Journal Of Mass Spectrometry : Jms, V. 31, N. 3, P. 225–235, 1996.
- Brum, N B. Requisitos Retóricos Da Sentença Penal. São Paulo: Revista Dos Tribunais, 1980.
- Bowen, G J. 2010. Isoscapes: Spatial Pattern In Isotopic Biogeochemistry. Annual Review Of Earth And Planetary Sciences, 38, 161-187.
- Carter W A, Bauchinger U, McWilliams S R. 2019. The Importance Of Isotopic Turnover For Understanding Key Aspects Of Animal Ecology And Nutrition. Diversity 2019, 11, 84; Doi:10.3390/D11050084
- Caruso, S.; Bernardi, S.; Pasini, M.; Giuca, M. R.; Docimo, R.; Continenza, M. A.; Gatto, R. The Process Of Mineralisation In The Development Of Human Tooth. European Journal Of Paediatric Dentistry, V. 17, N. 4, P. 322–326, 2016.
- Chesson L.A., Tipple B.J., Howa J.D., Bowen G.J., Barnette J.E., Cerling T.E. E Ehleringer J.R. 2014. Stable Isotopes In Forensics Applications. In: Holland H.D. E Turekian K.K. (Eds.) Treatise On Geochemistry. 2a Ed., Vol. 14. Elsevier, Oxford, P. 285-317.
- Código De Processo Penal. 1942. [Http://Www.Planalto.Gov.Br /Ccivil_03/Decreto-Lei/Del3689.Htm](http://Www.Planalto.Gov.Br /Ccivil_03/Decreto-Lei/Del3689.Htm)
- Coplen, T. B.; Böhlke, J. K.; De Bièvre, P.; Ding, T.; Holden, N. E.; Hopple, J. A.; Krouse, H. R.; Lamberty, A.; Peiser, H. S.; Revesz, K.; Rieder, S. E.; Rosman, K. J. R.; Roth, E.; Taylor, P. D. P.; Vocke, R. D.; Xiao, Y. K. Isotope-Abundance Variations Of Selected Elements (Iupac Technical Report). Pure And Applied Chemistry, V. 74, N. 10, P. 1987–2017, 2002. Disponível Em:

Craig, H. 1961. Isotopic Variations In Meteoric Waters. Science Magazine, 133(3465):1702-3.

Davis, M.; Munoz, S.P. The Temporal Scale Of Diet And Dietary Proxies. Ecol. Evol. 2016, 6, 1883–1897

De Oliveira Mascarenhas, R.; Sena-Souza, J. P.; Bernasconi, S. M.; McKenzie, J. A.; Vasconcelos, C.; Muniz, T. R.; Nogueira E Silva, M. P.; Da Silva Salvador, F. A.; Bahniuk Rumbelsperger, A. M. (2022). Building An Isoscape Based On Tooth Enamel For Human Provenance Estimation In Brazil. Forensic Science International, V. 330, P. 111109.

Dostie P. 2007. Case Number 03-0929: Murder In Mammoth Lakes. Forensic Magazine. Disponível Em: <https://www.Forensicmag.com/Article/2007/01/Case-Number-03-0929-Murder-Mammoth-Lakes>. Acessado Em 21 De Maio De 2017.

Dunn, S. 2007. Gas Source Mass Spectrometry: Stable Isotope Geochemistry. Geochemical Instrumentation And Analysis. Science Education Resource Center, Carleton College. Northfield, Minesota/Eua.

Dunn P. J. H. And J. F. Carter, Eds. 2018. Good Practice Guide For Isotope Ratio Mass Spectrometry, 2nd Edition. Firms. Isbn 978-0-948926-33-4

Ehleringer J.R., Cerling T.E., West J.B. 2007. Forensic Science Applications Of Stable Isotope Ratio Analysis. In: Blackledge R.D.(Ed). Forensic Analysis On The Cutting Edge: New Methods For Trace Evidence Analysis. Wiley, New Jersey, P. 399-422.

Ehleringer J R, Bowen G J, Chesson L. 2008. Hydrogen And Oxygen Isotope Ratios In Human Hair Are Related To Geography. Proceedings Of The National Academy Of Sciences 105(8):2788-93 Doi: 10.1073/Pnas.0712228105.

Ehleringer J R; Matheson Jr. S M. 2011. Stable Isotopes And Courts. Utah Law Review. No. 2. 58p

Emsley J. 2001. Nature's Building Blocks: An A-Z Guide To The Elements. Oxford University Press. 720p. Isbn 978-0-19-960563-7.

Ferreira, A.I.A.J.V. 2008. Espectrometria De Massa De Razões Isotópicas. Tese De Doutorado Em Química. Universidade De Lisboa, Especialidade Em Química Analítica. Departamento De Química E Bioquímica. Lisboa, Portugal. 299p.

França, S. A. 2014. Caracterização Dos Cabelos Submetidos Ao Alisamento/Relaxamento E Posterior Tingimento. Dissertação De Mestrado. Faculdade De Ciências Farmacêuticas. Universidade De São Paulo. São Paulo, Sp. 147p.

Fraser, I.; Meier-Augenstein, W.; Kalin, R. M. The Role Of Stable Isotopes In Human Identification: A Longitudinal Study Into The Variability Of Isotopic Signals In Human Hair And Nails. Rapid Communications In Mass Spectrometry, V. 20, N. 7, P. 1109–1116, 2006.

Fraser I., Meier-Augenstein W., Kalin R.M. 2008. Stable Isotope Analysis Of Human Hair And Nail Samples: The Effects Of Storage On Samples. *Journal Of Forensic Sciences*. American Academy Of Forensic Sciences. Wiley, Medford, 53(1):95-99.

Gitirana, L.B. 2007. *Histologia: Conceitos Básicos Dos Tecidos*. 2aed. Atheneu, Rio De Janeiro. 307p.

Glen, Stephanie. 2021. ANOVA Test: Definition, Types, Examples. *StatisticsHowTo.com: Elementary Statistics for the rest of us!* <https://www.statisticshowto.com/probability-and-statistics/hypothesis-testing/anova/> Acesso em 23/08/2021.

Gragnani, J. G. ; Garavello, M. E. P. E. ; Silva, R. J. ; Nardoto, G. B. ; Martinelli, L. A. 2013. Can Stable Isotope Analysis Reveal Dietary Differences Among Groups With Distinct Income Levels In The City Of Piracicaba (Southeast Region, Brazil)?. *Journal Of Human Nutrition And Dietetics*, V. 10.

Hobson Ka, Clark Rg. 1992. Assessing Avian Diets Using Stable Isotopes .2. Factors Influencing Diet-Tissue Fractionation. *Condor*. 94:189–97

Katzenberg, M. A.; Krouse, H. R. Application Of Stable Isotope Variation In Human Tissues To Problems In Identification. *Canadian Society Of Forensic Science Journal*, 1989.

Khandasammy, S. R.; Fikiet, M. A.; Mistek, E.; Ahmed, Y.; Halámková, L.; Bueno, J.; Lednev, I. K. Bloodstains, Paintings, And Drugs: Raman Spectroscopy Applications In Forensic Science. *Forensic Chemistry*, 2018.

Klepinger L.L. 2006. *Fundamentals Of Forensic Anthropology*. Foundations Of Human Biology Series. John Wiley & Sons, New Jersey. 185 P.

Klepinger L.L., Mintel R.W. 1986. Metabolic Considerations In Reconstructing Past Diet From Stable Carbon Isotope Ratios Of Bone Collagen. In: *Proceedings Of The 24th International Archaeometry Symposium*. Smithsonian Institution Press. Washington, P. 43-48.

Kohn, M. J. Carbon Isotope Compositions Of Terrestrial C3 Plants As Indicators Of (Paleo) Ecology And (Paleo) Climate. V. 107, N. 46, P. 19691–19695, 2010.

Kubota, T.; Nakamura, A.; Toyoura, K.; Matsunaga, K. The Effect Of Chemical Potential On The Thermodynamic Stability Of Carbonate Ions In Hydroxyapatite. *Acta Biomaterialia*, V. 10, N. 8, P. 3716–3722, 2014. Disponível Em:

Lebeau, M. A., Montgomery, M. A., & Brewer, J. D. (2011). The Role Of Variations In Growth Rate And Sample Collection On Interpreting Results Of Segmental Analyses Of Hair. *Forensic Science International*, 210(1–3), 110–116

Lei 13.964 De 24 De Dezembro De 2019. Http://Www.Planalto.Gov.Br/Ccivil_03/_Ato2019-2022/2019/L13964.Htm

Leventouri, T.; Antonakos, A.; Kuriacou, A.; Venturelli, R.; Liarakapes, E.; Perdikatsis, V. 2009. Crystal Structure Studies Of Human Dental Apatite As A Function Of Age. *International Journal Of Biomaterials*, Vol. 2009, 6p, Id 698547.

Margolis, H. C.; Kwak, S. Y.; Yamazaki, H. Role Of Mineralization Inhibitors In The Regulation Of Hard Tissue Biomineralization: Relevance To Initial Enamel Formation And Maturation. *Frontiers In Physiology*, V. 5, N. Sep, P. 1–10, 2014.

Martínez Del Rio, C.; Carleton, S.A. How Fast And How Faithful: The Dynamics Of Isotopic Incorporation Into Animal Tissues. *J. Mammal*. 2012, 93, 353–359.

Mascarenhas R.O. 2019. Estudo Isotópico Para Determinação Da Proveniência De Dentes Humanos. Dissertação De Mestrado. Programa De Pós-Graduação Em Geologia. Universidade Federal Do Paraná. Curitiba/PR.

Meier-Augenstein W., Fraser I. 2007. Forensic Isotope Analysis Leads To Identification Of A Mutilated Murder Victim. *Journal Of The Forensic Science Society*. Elsevier, Dublin, P. 153- 159.

Miller, J. N.; Miller, J. C. 2005. Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry. Pearson Prentice Hall. 5ª Edição. Página 183 a 223.

MINITAB SUPPORT. 2019a. What is ANOVA? Statistical Modeling, ANOVA. <https://support.minitab.com/> Acesso em 23/08/2021.

MINITAB SUPPORT. 2019b. What is MANOVA? Statistical Modeling, ANOVA. <https://support.minitab.com/> Acesso em 23/08/2021.

Meier-Augenstein W. 2018. Stable Isotope Forensics: Methods And Forensic Applications Of Stable Isotope Analysis. 2 A Ed. Wiley, Aberdeen, Uk, P. 370-397.

Muniz T.R., Salvador F.A.S., Ozahata L.K.M., Silva T.G., Reis Neto J.M., Bahniuk A.M. 2016. C & O Isotope Signatures In Human Teeth: Correlation With Geographic Provenance In Brazil. In: Anzfss 23rd International Symposium On The Forensic Sciences. Australian And New Zealand Forensic Science Society. Auckland, P. 115-116.

Muniz T.R. 2017. Análise De Isótopos Estáveis Em Tecidos Humanos Orgânicos E Biominerais Aplicada À Antropologia Forense. 49f. Trabalho De Conclusão De Curso. Bacharelado Em Geologia. Departamento De Geologia, Setor De Ciências Da Terra, Universidade Federal Do Paraná. Curitiba/Pr.

Nardoto, G.B. ; Murrieta, R.S.S. ; Prates, L.E.G.; Adams, C.; Garavello, M.E.P.E.; Schor, T.; De Moraes, A.; Rinaldi, F.D.; Gragnani, J.G.; Moura, E.A.F.; Duarte-Neto, P.J.; Martinelli, L.A. 2011. Frozen Chicken For Wild Fish: Nutritional Transition In The Brazilian Amazon Region Determined By Carbon And Nitrogen Stable Isotope Ratios In Fingernails. *American Journal Of Human Biology*, V. 23, P. 642-650.

Nardoto, G. B.; Silva, S.; Kendall, C.; Ehleringer, J. R.; Chesson, L. A.; Ferraz, E. S. B.; Moreira, M. Z.; Ometto, J. P. H. B.; Martinelli, L. A. 2006. Geographical Patterns Of Human Diet Derived From Stable-Isotope Analysis Of Fingernails. *American Journal Of Physical Anthropology*, V. 131, N. 1, P. 137–146.

Nielsen. 2016. Infográfico: A Relação Do Uso Dos Salões Com Tinturas Dentro Do Lar. Nielsen.Com/Br/Pt/Insights/Article/2016/Infografico-A-Relacao-Do-Uso-Dos-Saloes-Com-Tinturas-Dentro-Do-Lar/. Acesso Em Janeiro. 2020.

O'brien D. M. (2015). Stable Isotope Ratios As Biomarkers Of Diet For Health Research. *Annual Review Of Nutrition*, 35, 565–594. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071714-034511>

Perry, R. S.; Mcloughlin, N.; Lynne, B. Y.; Sephton, M. A.; Oliver, J. D.; Perry, C. C.; Campbell, K.; Engel, M. H.; Farmer, J. D.; Brasier, M. D.; Staley, J. T. Defining Biominerals And Organominerals: Direct And Indirect Indicators Of Life. *Sedimentary Geology*, V. 201, N. 1–2, P. 157–179, 2007.

Pederzani S, Britton K, Oxygen Isotopes In Bioarchaeology: Principles And Applications, Challenges And Opportunities. *Earth* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2018.11.005>

Reitesema L.J. 2015. Laboratory And Field Methods For Stable Isotope Analysis In Human Biology. *American Journal Of Human Biology*, Wiley Periodicals. Medford, 27:593-604.

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

Sartori, M. M. P.; Denadai, J. C.; Gracia, A. M. L.; Carrijo, A. S. e Ducatti, C. 2012. Multivariate analysis of stable isotope data in the traceability process of birds. *Acta Scientiarum. Animal sciences*. V. 34, n. 4, p 437-442. Maringá/PR.

Sharp Z. 2017. Principles Of Stable Isotope Geochemistry. University Of New Mexico. 2nd Ed.

Silva E R, Alves J B. 2008. A Genética Da Odontogênese. *Biosciences Journal*, V.24, N. 2, P. 113-124.

Smith, B.N., Epstein, S. 1971. Two Categories Of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Ratios In Higher Plants. *Journal Of Plant Physiology*, 47(3): 380–384.

Someda, H.; Gakuhari, T.; Akai, J.; Araki, Y.; Koderu, T.; Tsumatori, G.; Kobayashi, Y.; Matsunaga, S.; Hashimoto, M.; Saito, M.; Yoneda, M.; Ishida, H. Trial Application Of Oxygen And Carbon Isotope Analysis In Tooth Enamel For Identification Of Past-War Victims For Discriminating Between Japanese And Us Soldiers. *Forensic Science International*, 2016.

Souza D S., Medrado L., Gitirana L B. 2010. Histologia. In: Molinaro, Etelcia Moraes; Caputo, Luzia Fátima Gonçalves; Amendoeira, Maria Regina Reis (Org.). Conceitos E Métodos Para A Formação De Profissionais Em Laboratórios De Saúde, V. 2. Rio De Janeiro: Epsjv; loc. V. 2. 254 P.

Souza, P.C. 2015. Análise De Apatita De Dentes Humanos Por Difractometria De Raios X E Microscopia Eletrônica De Varredura: Aplicação Em Ciências Forenses Para Estimativa De Idades De Indivíduos. 50f. Trabalho De Conclusão De Curso. Curso De Graduação Em Geologia. Universidade Federal Do Paraná, Curitiba/Pr.

Sulzman E.W. 2007. Stable Isotope Chemistry And Measurement: A Primer. In: Michener R., Lajtha K. (Eds.) Stable Isotopes In Ecology And Environmental Science. Blackwell Publishing, Oxford, P. 1-21.

Tobin, D.J., 2006. Biochemistry Of Human Skin—Our Brain On The Outside. *Chem. Soc. Rev.* 35: 52–67. Retrieved On January 10, 2007

Tykot, R. H. Stable Isotopes And Diet: You Are What You Eat. Proceedings Of The International School Of Physics, 2004.

Tykot R.H. 2006. Isotope Analysis And The Histories Of Maize. In: Benz B., Tykot R.H. E Staller J. (Eds.) Histories Of Maize In Mesoamerica: Multidisciplinary Approaches. Routledge, New York, P. 131-142.

Urey, H.C. 1947. The Thermodynamic Properties Of Isotopic Substances. Journal Of The Chemical Society, Issue 0, 562-581p.

Vogel J C. 1980. Fractionation Of The Carbon Isotopes During Photosynthesis. Sitzungsberichte Der Heidelberger Akademie Der Wissenschaften Mathematisch-Naturwissenschaftliche Klasse Jahrgang 1980, 3. Abhandlung. 28p.

Williams, L. J., White, C. D., & Longstaffe, F. J. (2011). Improving Stable Isotopic Interpretations Made From Human Hair Through Reduction Of Growth Cycle Error. *American Journal Of Physical Anthropology*, 145(1), 125–136.

ANEXO 1 – RESULTADOS ANALÍTICOS

Tipo de amostra	Identificação	d15N	d13C	d18O	MÉDIA N	MÉDIA C
CABELOS	HK20	8.87	-19.51	-	8.995	-19.475
	HK20 2	9.12	-19.44			
	HK66	8.97	-19.2	-	9.075	-19.35
	HK66 2	9.18	-19.5			
	HK81	9.14	-19.36	-	9.165	-19.27
	HK81 2	9.19	-19.18			
	HG21	8.97	-19.85	-	9.03	-20.035
	HG21 2	9.09	-20.22			
	HG66	9.22	-19.48	-	9.225	-19.405
	HG66 2	9.23	-19.33			
	HG81	9.06	-19.29	-	9.115	-19.34
	HG81 2	9.17	-19.39			
	HB20	8.9	-19.25	-	9.03	-19.325
	HB20 2	9.16	-19.4			
	HB66	9.21	-19.12	-	9.175	-19.16
	HB66 2	9.14	-19.2			
	HB81	9.28	-19.36	-	9.295	-19.25
	HB81 2	9.31	-19.14			
	HP	9.18	-19.04	-	9.22	-19.12
	HP 2	9.26	-19.2			
	HCTRL1	9.17	-19.19	-		
	HCTRL2	9.32	-19.1	-		
	HCTRL3	9.06	-19.75	-		
	HCTRL4	9.46	-19.22	-		
TINTAS	DK20	2.1	-30.72	-	2.265	-31.03
	DK20 2	2.43	-31.34			
	DK66	2.38	-30.81	-	3.01	-31.2
	DK66 2	3.64	-31.59			
	DK81	3.2	-29.37	-	3.985	-29.51
	DK81 2	4.77	-29.65			
	DG21	1.14	-30.67	-	1.36	-31.035
	DG21 2	1.58	-31.4			
	DG66	0.64	-30.44	-	1.37	-30.49
	DG66 2	2.1	-30.54			
	DG81	2.24	-30.32	-	3.445	-30.695
	DG81 2	4.65	-31.07			
Dentes (Indivíduo H20)	H20-A1-ED1	-	-11.38	-6.2		
	H20-A1-DD1	-	-13.19	-6.73		
	H20-A1-DC1	-	-12.64	-5.91		
	H20-A1-DC2	-	-11.88	-6.58		
	H20-A1-ED2	-	-11.51	-6.99		
	H20-A1-DD2	-	-13.23	-6.96		
	H20-A1-DA2	-	-12.65	-7.36		
	H20-A2-ED1	-	-11.08	-6.83		

	H20-A2-DD1	-	-13.32	-6.58
	H20-A2-DC1	-	-12.58	-6.27
	H20-A2-ED2	-	-11.68	-7.31
	H20-A2-DD2	-	-13.26	-7.37
	H20-A2-DA2	-	-12.36	-6.82
Dentes (Indivíduo H21)	H21-A1-ED1	-	-9.79	-6.13
	H21-A1-DD1	-	-12.21	-7.67
	H21-A1-DC1	-	-11.87	-6.16
	H21-A1-ED2	-	-10.07	-6.36
	H21-A1-DD2	-	-12.36	-7.52
	H21-A1-DA2	-	-11.66	-7.08
	H21-A2-ED1	-	-9.75	-6.29
	H21-A2-DD1	-	-12.16	-7.44
	H21-A2-DC1	-	-11.75	-6.08
	H21-A2-ED2	-	-9.9	-6.65
	H21-A2-DD2	-	-12.41	-7.57
	H21-A2-DA2	-	-11.63	-6.96
Dentes (Indivíduo M25)	M25-A1-ED1	-	-10.95	-6.32
	M25-A1-DD1	-	-12	-7.66
	M25-A1-DC1	-	-11.86	-6.64
	M25-A1-ED2	-	-10.95	-6.62
	M25-A1-DD2	-	-12.06	-8.45
	M25-A1-DA2	-	-12.22	-7.24
	M25-A2-ED1	-	-10.99	-6.27
	M25-A2-DD1	-	-11.88	-7.55
	M25-A2-DC1	-	-11.95	-6.94
	M25-A2-ED2	-	-11.25	-6.92
	M25-A2-DD2	-	-12.04	-7.98
	M25-A2-DA2	-	-12.14	-6.94
	M25-A3-ED1	-	-11.09	-6.36
	M25-A3-DD1	-	-12.15	-8.2
	M25-A3-DC1	-	-11.58	-6.38
	M25-A3-ED2	-	-11.26	-7.25
	M25-A3-DD2	-	-11.78	-8.26
	M25-A3-DA2	-	-12.25	-7.66
Unha	AU01	8.66	-17.37	-
Cabelo	AC02	8.71	-17.1	-
Unha	GU01	8.68	-18.86	-
Unha	GU02	8.5	-18.53	-
Unha	NU01	9.19	-17.58	-
	NU02	8.78	-17.81	-
	NU03	9.26	-17.28	-
	NU04	8.97	-17.38	-
	NU05	9.03	-17.4	-
	NU06	9.07	-17.46	-
	NU07	9.08	-17.21	-
	NU08	8.88	-17.23	-

Cabelo	NC09	8.7	-17	-
Unha	VU01	11.75	-16.83	-
	VU02	11.97	-16.89	-
	VU03	12.33	-16.93	-
	VU04	11.72	-17.43	-
	VU05	11.66	-17.54	-
	VU06	11.4	-18.04	-
	VU07	10.93	-18.57	-
	VU08	11.71	-17.48	-
Cabelo	VC09	11.32	-16.69	-
Unha	HU01	9.98	-17.5	-
	HU02	10.14	-17.25	-
	HU03	9.56	-17.13	-
	HU04	9.34	-17.35	-
	HU05	9.8	-17.06	-
	HU06	9.58	-17.41	-
	HU07	10.66	-17	-
Cabelo	HC08	9.39	-17.16	-
Unha	JU01	10.19	-17.68	-
	JU02	10.01	-17.97	-
	JU03	10.28	-17.51	-
	JU04	10.05	-17.59	-
	JU05	10.1	-17.74	-
	JU06	10.27	-17.38	-
	JU07	10.32	-17.63	-
	JU08	10.21	-17.65	-
	JU09	10.13	-17.54	-
	JU10	10.16	-17.55	-
Cabelo	JC11	10.42	-16.79	-